

COMPARAÇÃO DE DIFERENTES TEMPERATURAS DE ARMAZENAMENTO DE SÊMEN REFRIGERADO DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR E QUARTO DE MILHA*

Marcel Cavalcanti Farrás¹
Eduardo Gorzoni Fioratti²
Carlos Ramires Neto³
Marcio Teoro do Carmo⁴
Rogério Antônio de Oliveira⁵
Frederico Ozanan Papa⁶
José Nicolau Próspero Puoli Filho⁷
Marco Antônio Alvarenga⁶

RESUMO

Pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de prolongar a longevidade espermática por meio da refrigeração ou criopreservação do sêmen equino e com isso melhorar as taxas de fertilidade. Muitas dessas pesquisas têm como objetivo desenvolver diluidores, aditivos, curvas e protocolos de refrigeração, assim como tempos e temperaturas de estocagem que garantam a motilidade e integridade do sêmen equino submetido à refrigeração e com isso índices de fertilidade melhores e menos variáveis. Nos últimos anos, houve um aumento considerável na utilização de sêmen equino refrigerado, principalmente devido à aceitação de grande parte das associações de criadores de cavalos. A raça Mangalarga Marchador, de origem nacional, tem se mostrado extremamente sensível ao processo de manipulação, refrigeração e transporte de sêmen. Como em outras espécies de produção, o sucesso da inseminação artificial nos equinos depende da manutenção da viabilidade e fertilidade do sêmen durante o armazenamento. Além disso, quanto maior o tempo ao qual se mantém o potencial fertilizante do sêmen refrigerado, maior flexibilidade terá o médico veterinário para coletar e enviar o sêmen aos haras em que as éguas se encontram, resultando num maior êxito da técnica. O presente experimento teve por objetivo comparar as raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM) quanto à resistência à refrigeração em duas temperaturas de armazenamento de sêmen refrigerado (5°C e 15°C). Os resultados deste trabalho demonstraram que não houve diferença entre as temperaturas de armazenamento (5°C e 15°C), mostrando que ambas são eficientes na manutenção da viabilidade espermática pelo período de 24 horas para ambas as raças estudadas. Além disso, foi observada uma característica espermática superior dos garanhões da raça Quarto de Milha quando comparada aos da raça Mangalarga Marchador, tanto nos parâmetros de velocidade espermática, avaliado pelo CASA, revelando uma maior sensibilidade dos animais da raça Mangalarga ao processo de refrigeração do sêmen.

Palavras-chave: garanhão, sêmen refrigerado, Mangalarga Marchador e Quarto de Milha

* Entidade Financiadora: FAPESP (2009/06835-1; 2010/09387-7)

¹ Mestrando do Departamento de Reprodução da FMVZ, Unesp, Campus de Botucatu, mcfvet@hotmail.com (Correio)

² Doutorando do Departamento de Reprodução da FMVZ, Unesp, Campus de Botucatu

³ Aluno de graduação da FMVZ, Unesp, Campus de Botucatu

⁴ Pós-doutorando do Departamento de Reprodução da FMVZ, Unesp, Campus de Botucatu

⁵ Professor do Departamento de Bioestatística do IBB, Unesp, Campus de Botucatu

⁶ Professor do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ, Unesp, Campus de Botucatu

⁷ Professor do Departamento de Produção Animal da FMVZ, Unesp, Campus de Botucatu

COMPARISON OF DIFFERENCES STORAGE TEMPERATURES IN COOLING SEMEN OF MANGALARGA MARCHADOR AND QUARTER HORSES STALLIONS

ABSTRACT

Studies have been conducted in order to prolong sperm longevity using cooling or frozen-thawed equine semen and in that way improve fertility rates. Many of these studies have focused on developing extenders, additives, cooling curves and protocols, as well as storage times and temperatures to ensure the integrity and motility of equine semen exposed to cooling. Recent years have increased the use of cooled equine semen, mainly due to the acceptance of the horse breeders associations. The Brazilian breed called "Mangalarga Marchador" has proven to be extremely sensitive to the cooling semen. As in other species, the success of artificial insemination in horses depends on maintaining the viability and fertility of semen during storage. Moreover, the longer you keep the cooling semen fertilizing potential, more flexibility will have the veterinarian to collect and send the semen samples, resulting in higher technique success. The aim of this study was to compare breeds Mangalarga Marchador (MM) and Quarter Horses (QM) for resistance to cooling in two semen storage systems (5°C and 15°C). The results showed no difference between the storage temperatures (5°C and 15°C), showing that both are effective in maintaining sperm viability for a period of 24 hours for both breeds studied. In addition, we observed superior sperm characteristics for Quarter Horse stallions when compared to the Mangalarga Marchador, evaluated by CASA, revealing a higher sensitivity for the cooling process by Mangalarga Marchador stallions.

Keywords: stallion, cooled semen, Mangalarga Marchador e Quarter Horse

COMPARACIÓN DE DIFERENTES TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO DE SEMEN REFRIGERADO DE CABALLOS MANGALARGA MARCHADOR Y CUARTO DE MILLA.

RESUMEN

Últimamente, varios estudios se han realizado con el fin de prolongar la longevidad de los espermatozoides mediante refrigeración o criopreservación del semen equino y de esa manera mejorar las tasas de fecundidad. Muchos de estos estudios se han centrado en los diluyentes, aditivos, curvas de enfriamiento y protocolos, así como los tiempos y temperaturas de almacenamiento para garantizar la integridad y la motilidad del semen equino expuestos al enfriamiento. En los últimos años han aumentado el uso de semen refrigerado equino, principalmente debido a la aceptación de las asociaciones de criadores de caballos. La raza brasileña "Mangalarga Marchador" ha demostrado ser extremadamente sensible a la refrigeración del semen. Como en otras especies, el éxito de la inseminación artificial en los caballos depende del mantenimiento de la viabilidad y fertilidad del semen durante el almacenamiento. Por otra parte, cuanto más tiempo se mantenga el potencial fertilizante, más flexibilidad tendrá el veterinario para coleccionar y enviar las muestras de semen, lo que resulta en mejores resultados de la técnica. El objetivo de este estudio fue comparar las razas Mangalarga Marchador (MM) y Caballos Cuarto de Milla (CM) para la resistencia a la refrigeración en dos temperaturas de almacenamiento de semen (5°C y 15°C). Los resultados no mostraron diferencia entre las temperaturas de almacenamiento (5°C y 15°C), mostrando que ambos son efectivos en el mantenimiento de la viabilidad espermática por un período de

24 horas para ambas las razas estudiadas. Además, se observó características espermáticas superiores de los sementales Cuarto de Milla en comparación con los Mangalarga Marchadores, evaluada por CASA, indicando una mayor sensibilidad para el proceso de refrigeración para la raza Mangalarga Marchador.

Palabras clave: semental, semen refrigerado, Mangalarga Marchador y Cuarto de Milla

INTRODUÇÃO

Atualmente, a comercialização e o transporte de sêmen, tanto refrigerado como congelado, se tornaram uma das atividades mais frequentes dentre as realizadas pelas centrais de reprodução equina no Brasil. Não só devido à aceitação das associações de criadores de cavalos, como também ao desenvolvimento de novas tecnologias permitindo com que o sêmen seja transportado da propriedade em que o garanhão se encontra até a propriedade em que a égua está alojada (1). O fato de se transportar o sêmen até as éguas, ao invés de transportá-las até o garanhão oferece inúmeras vantagens, como a eliminação de gastos com transporte, a diminuição do estresse animal, a diminuição dos riscos impostos aos potros e as próprias matrizes de possíveis acidentes e de adquirir doenças, como resultado da exposição a patógenos em seu novo ambiente, além, destas propriedades serem, na grande maioria, distantes e dispenderem altos custos com a hospedagem dos animais (2). O armazenamento do sêmen em baixas temperaturas tem como objetivo prolongar a viabilidade espermática por reduzir o consumo de energia (3). Porém, durante o processo de redução de temperatura, ocorre reorganização nos lipídeos da membrana plasmática, e a formação de alguns subprodutos indesejáveis o que acarreta diretamente na diminuição da longevidade dos espermatozoides (4). A raça Mangalarga Marchador, de origem nacional, tem se mostrado extremamente sensível ao processo de manipulação, refrigeração e transporte de sêmen diferentemente de garanhões das raças Quarto de Milha, Brasileiro de Hipismo e outras de origem internacional (5). O objetivo deste estudo foi comparar a resistência do sêmen refrigerado de garanhões da raça Mangalarga Marchador (MM) com indivíduos da raça Quarto de Milha (QM), e definir qual a melhor temperatura de armazenamento de sêmen para os cavalos destas raças.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente experimento avaliou duas temperaturas de armazenamento de sêmen refrigerado, 5°C e 15°C, de garanhões das raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM) quanto aos padrões de velocidade computadorizada e integridade de membrana.

Animais

Foram utilizados dois ejaculados de 27 garanhões (n=54 ejaculados), com idade entre 4 e 12 anos, sendo 11 da raça Mangalarga Marchador (MM) e outros 16 da raça Quarto de Milha (QM).

Colheita dos Ejaculados

A colheita de sêmen foi realizada com vagina artificial. Foi empregada a metodologia da colheita fechada, com a temperatura da vagina artificial em torno de 45°C. Para que o garanhão efetuasse a monta, utilizou-se de uma égua no cio, devidamente contida, ou de manequim próprio para a monta de garanhões.

Processamento do Sêmen

Após a colheita dos ejaculados, estes foram filtrados, para que fosse descartada a fração gel, o volume mensurado em proveta graduada e uma alíquota do sêmen foi separada para avaliação da motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP), percentual de espermatozoides rápidos (RAPID) pela análise computadorizada (CASA - Hamilton Thorn – HTMIVOS 10), bem como a integridade de membrana plasmática (Iodeto de Propídeo), integridade acrossomal (FITC-PSA) e potencial mitocondrial (JC-1) segundo Celeghini et al. (6). A avaliação da concentração espermática foi realizada em microscópio de luz (200x) com auxílio de uma câmera de Neubauer após diluição de 10 μ L de sêmen em 190 μ L de água destilada (1:20).

Após análise, o sêmen foi diluído em meio comercial (Botusemen[®]), em proporções que variaram de 2:1 a 5:1 a fim de se conseguir uma concentração de 50x10⁶ spz/mL e então se iniciou o processo de refrigeração nas caixas térmicas conhecidas por Botutainer[®] (5°C) e Botubox[®] (15°C). As análises foram realizadas nos momentos 0, após 12 e 24 horas de refrigeração.

Análise Estatística

Para cada variável avaliada, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de um delineamento em blocos, sendo cada animal considerado um bloco e os tratamentos no esquema fatorial com os fatores: raça, caixas térmicas, tempo de armazenamento e ejaculado. A comparação entre as médias dos níveis de cada fator foi realizada pelo teste de Tukey, com nível de 5% de significância.

RESULTADOS

As temperaturas de armazenamento de sêmen refrigerado (5°C e 15°C), avaliados independentemente do fator raça, não demonstraram qualquer diferença em todos os parâmetros avaliados, conforme pode ser observado nas tabelas de 1 a 5.

Ao se comparar as raças Mangalarga Marchador e Quarto de Milha, independente dos sistemas e tempo de armazenamento observou-se diferença estatística (P<0,05) favorável à raça Quarto de Milha, para os parâmetros de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP) e percentual de espermatozoides rápidos (RAPID), conforme descrito nas Tabelas 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Com relação à integridade das membranas não foi encontrada diferença (P>0,05) nos subtipos celulares que apresentavam membrana plasmática e acrossomal íntegra, com alto potencial mitocondrial (PIAIA) (Tabela 5).

Ao se avaliar somente o tempo em que o sêmen foi acondicionado nos dois sistemas de armazenamento, observou-se que a motilidade total (Tabela 1) e o percentual de espermatozoides rápidos (Tabela 4) apresentaram diferença em todos os momentos avaliados, ou seja, conforme esperado o sêmen no momento 0 apresentou melhores resultados que o sêmen armazenado por um período de 12 horas, que por sua vez se apresentou melhor que o acondicionado por um período de 24 horas.

A motilidade progressiva (Tabela 2) e o VAP (Tabela 3) mostraram um mesmo comportamento com relação ao tempo. Em ambos os casos, o sêmen no momento 0 não mostrou diferença (P>0,05) do sêmen refrigerado no momento 12 horas, porém foi diferente do refrigerado no momento 24 horas (P<0,05). Em contrapartida, o sêmen refrigerado por 12 horas não mostrou diferença do armazenado por 24 horas (P>0,05).

Quando da avaliação da integridade das membranas espermáticas, os subgrupos celulares PIAIA foram diferentes no momento 0 ($P<0,05$) quando comparado ao sêmen armazenado por 12 e por 24 horas nos sistemas de armazenamento de sêmen refrigerado.

Tabela 1. Média e Desvio Padrão (%) da Motilidade Total (MT) dos garanhões das raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM), nos sistemas térmicos de 5 e 15°C, nos tempos 0, 12 e 24, e no TTR (37°C por 4 horas) nos momentos 12 e 24 horas.

VARIÁVEL	RAÇA	CAIXA TÉRMICA	TEMPO		
			0 ^a	12 ^b	24 ^c
MT	MM	5 ^A	75,00±12,08	65,17±18,86	55,72±24,18
		15 ^A	75,00±12,08	67,17±14,20	58,61±26,06
	QM	5 ^B	80,44±8,39	76,81±10,81	72,72±13,52
		15 ^B	80,44±8,39	76,97±11,82	73,22±14,54

Letras maiúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes.

Letras minúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes, ao longo dos tempos avaliados.

Conforme demonstrado na Tabela 1, não foi observada diferença estatística ($P>0,05$) com relação às temperaturas de armazenamento. Porém pode-se verificar diferença estatística ($P<0,05$), com superioridade da raça Quarto de Milha, no parâmetro de motilidade total. Os tempos de armazenamento foram diferentes no momento 0, 12 e 24 horas de refrigeração.

Tabela 2. Média e Desvio Padrão (%) da Motilidade Progressiva (MP) dos garanhões das raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM), nos sistemas térmicos de 5 e 15°C, nos tempos 0, 12 e 24.

VARIÁVEL	RAÇA	CAIXA TÉRMICA	TEMPO		
			0 ^a	12 ^{ab}	24 ^b
MP	MM	5 ^A	32,50±11,21	28,72±14,93	25,00±18,64
		15 ^A	32,50±11,21	26,28±12,03	22,17±16,07
	QM	5 ^B	41,84±11,84	41,81±13,17	39,69±14,49
		15 ^B	41,84±11,84	38,81±13,92	34,47±14,35

Letras maiúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes. Letras minúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes, ao longo dos tempos avaliados.

Foi observada diferença estatística ($P<0,05$) na motilidade progressiva (MP) entre as raças estudadas, com superioridade para os animais da raça Quarto de Milha. Entre as temperaturas de armazenamento não houve diferença ($P>0,05$). Em relação aos tempos de armazenamento não houve diferença ($P>0,05$) entre o sêmen no momento 0 e o armazenado por 12 horas e entre os tempos de 12 e 24 horas, porém houve diferença ($P<0,05$) entre os momentos 0 e 24.

Tabela 3. Média e Desvio Padrão da velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP), medida em $\mu\text{m/s}$ pelo HTMA, dos garanhões das raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM), nos sistemas térmicos de 5 e 15°C, nos tempos 0, 12 e 24.

VARIÁVEL	RAÇA	CAIXA TÉRMICA	TEMPO		
			0 ^a	12 ^{ab}	24 ^b
VAP	MM	5 ^A	132,83±19,31	113,89±28,54	108,67±36,63
		15 ^A	132,83±19,31	121,00±22,89	106,78±39,21
	QM	5 ^B	130,06±19,51	127,02±12,27	115,29±19,82
		15 ^B	130,06±19,51	124,81±26,37	122,53±16,32

Letras maiúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes. Letras minúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes, ao longo dos tempos avaliados.

Quando avaliada a velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP), medida em $\mu\text{m/s}$ pelo CASA, foi observada diferença ($P < 0,05$) entre as raças. As temperaturas de armazenamento não apresentaram diferença ($P > 0,05$). Em relação aos tempos de armazenamento, não houve diferença ($P > 0,05$) entre os momentos 0 e 12 horas e para os momentos 12 e 24 horas, e houve diferença ($P < 0,05$) entre os momentos 0 e 24, conforme pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 4. Média e Desvio Padrão (%) do percentual de espermatozoides rápidos (RAP) dos garanhões das raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM), nos sistemas térmicos de 5 e 15°C, nos tempos 0, 12 e 24, e no TTR (37°C por 4 horas) nos momentos 12 e 24 horas.

VARIÁVEL	RAÇA	CAIXA TÉRMICA	TEMPO		
			0 ^a	12 ^b	24 ^c
RAP	MG	5 ^A	66,94±13,76	55,78±24,22	45,50±23,80
		15 ^A	66,94±13,76	56,44±17,76	49,56±23,79
	QM	5 ^B	74,22±10,61	69,78±12,79	64,34±15,67
		15 ^B	74,22±10,61	69,13±14,93	64,44±17,21

Letras maiúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes. Letras minúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes, ao longo dos tempos avaliados.

Observou-se também, conforme demonstrado na Tabela 4, diferença estatística ($P < 0,05$) no percentual de espermatozoides rápidos (RAP) entre as raças, com superioridade dos indivíduos da raça Quarto de Milha. Entre as temperaturas de armazenamento não foi demonstrado diferença ($P > 0,05$). Os tempos de armazenamento foram diferentes em todos os momentos avaliados ($p < 0,05$).

Tabela 5. Média e Desvio Padrão (%) do percentual de espermatozoides que apresentam Membrana Plasmática Inteira, Acrossomo íntegro e Alto potencial mitocondrial (PIAIA) dos garanhões das raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM), nos sistemas térmicos de 5 e 15°C, nos tempos 0, 12 e 24.

VARIÁVEL	RAÇA	CAIXA TÉRMICA	TEMPO		
			0 ^a	12 ^b	24 ^c
PIAIA	MM	5 ^A	64,06±8,54	50,72±9,86	44,50±12,20
		15 ^A	64,06±8,54	51,78±8,91	42,06±12,20
	QM	5 ^A	57,69±13,13	49,56±12,55	43,91±12,40
		15 ^A	57,69±13,13	52,09±11,36	44,91±11,79

Letras maiúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes. Letras minúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes, ao longo dos tempos avaliados.

Conforme demonstrado na Tabela 5, não houve diferença estatística ($P > 0,05$) na avaliação de integridade de membrana plasmática, potencial mitocondrial e integridade acrossomal para a variável PIAIA (Membrana Plasmática Inteira, Acrossomo Íntegro e Alto Potencial Mitocondrial) entre as raças, assim como nos sistemas térmicos avaliados. Já os tempos de armazenamento foram diferentes ($P < 0,05$) em todos os momentos avaliados.

DISCUSSÃO

O sucesso da preservação espermática, pela refrigeração está diretamente relacionado a fatores como: diluição, curva de refrigeração lenta e temperatura de armazenamento que reduza o metabolismo espermático minimizando os danos à membrana plasmática (7). Squires e Brisko (8) recomendam uma diluição do ejaculado a uma concentração de 25 e 50 x 10⁶

sptz/ml, principalmente pelo fator deletério do plasma seminal sobre o resfriamento e armazenamento do sêmen equino a 5° C.

A utilização das biotecnologias do sêmen, tanto refrigerado como congelado, viabiliza o uso de um reprodutor em momentos nos quais não seria possível a monta natural, devido, principalmente às grandes distâncias encontradas entre o haras em que este se encontra e as propriedades das éguas (1), além disso, com a grande procura do sêmen de alguns garanhões geneticamente superiores, podemos otimizar seu uso pela possibilidade de um ejaculado ser fracionado em varias doses, que podem ser enviadas a distintas regiões do país, além disso, preservamos a saúde destes garanhões, eliminamos os gastos inerentes ao transporte tanto do macho como da fêmea, diminuimos o estresse animal, os riscos do transporte de potros e matrizes de possíveis acidentes e adquirir novas doenças (2), e ainda aumentamos o número de animais a serem acasalados com um determinado reprodutor.

Sabe-se que a capacidade fertilizante, usualmente é associada à qualidade da motilidade e a morfologia espermática (9, 10), porém estas não possuem uma correlação absoluta, dessa forma, pode se dizer que o parâmetro da motilidade é menos preciso do que a real fertilidade das amostras de sêmen para se estimar a viabilidade espermática (11). Assim, buscando uma maior correlação entre as características de movimento e a capacidade fertilizante, Jasko et al. (12) verificaram que a motilidade total, progressiva e velocidade média (VAP) podem prever melhor sobre a fertilidade, demonstrando a importância do uso da análise computadorizada para se obter uma maior acuidade nas avaliações.

O presente experimento teve por objetivo central avaliar e determinar o efeito do processo de refrigeração de sêmen sobre a qualidade espermática. Os indivíduos da raça Mangalarga Marchador mostraram de uma forma geral maior sensibilidade ao processo de refrigeração quando comparado aos da raça Quarto de Milha tanto no armazenamento a 5°C, quanto no de 15°C, nos momentos 12 e 24 horas. Esta maior sensibilidade foi observada nos parâmetros de MT (Tabela 1), MP (Tabela 2), VAP (Tabela 3), RAP (Tabela 4).

No parâmetro motilidade total foram observados valores de aproximadamente 77% para os Quarto de Milha e 67% para os garanhões da raça Mangalarga Marchador no período de 12 horas e de aproximadamente 73% versus 57% quando armazenado por 24 horas em ambos os sistemas de armazenamento, ou seja, do momento 0 para o 12 horas e do 12 para o 24 horas, houve uma queda de 10 pontos percentuais para os MM e 4 para os QM em ambos os períodos.

Apesar de a literatura ser omissa na comparação entre raças e sua relação com resistência à refrigeração de sêmen, uma maior sensibilidade dos garanhões da raça Mangalarga foi observada quando comparou sêmen submetido à congelação de garanhões das raças MM, QM e HIPISMO (5). Este mesmo autor verificou que os indivíduos da raça MM foram os menos resistentes, onde somente 11,7% dos garanhões avaliados apresentaram uma MT maior que 40% após o processo de descongelação, enquanto no grupo das raças QM e HIPISMO, 50 e 53,8% apresentaram uma MT maior que 40%.

Uma queda marcante na motilidade progressiva no sêmen refrigerado de cavalos da raça MM foi observada, conforme observado na Tabela 2. Concordando com o estudo de Alvarenga (5) que verificou que 5,8% dos garanhões obtiveram MP>20%, enquanto foi observado 41,6% dos cavalos da raça QM e 30,7% dos garanhões de Hipismo.

Além da MT e MP, o presente estudo demonstrou que a raça MM foi mais sensível ao processo de refrigeração do que a raça Quarto de Milha com relação às velocidades espermáticas e porcentagem de espermatozoides rápidos (Tabela 4).

As temperaturas de armazenamento, 5°C e 15°C, não apresentaram diferenças significativas entre si ($P>0,05$), em todos os parâmetros avaliados para todos os indivíduos tanto dos garanhões da raça MM quanto para os QM, demonstrando que ambos os sistemas de

armazenamento de sêmen são adequados para a manutenção das características da qualidade do sêmen, corroborando com os achados de outros pesquisadores (13, 14).

Alguns estudos demonstram que a manutenção da temperatura em torno de 5°C é preferencial a de 20°C (15, 16), ressaltando que o intervalo entre 4-6°C é o mais adequado para a manutenção da motilidade e da fertilidade (17, 18). Avanzi et al. (13) não encontraram diferenças entre os sistemas de armazenamento. Neste trabalho, foram comparadas duas temperaturas de refrigeração a 5°C e 15°C, à temperatura ambiente de 25°C. As características de motilidades total e progressiva, bem como a integridade de membrana não foram afetadas pela temperatura de armazenamento, assim como em outros estudos (14, 19) que não encontraram diferenças quando compararam os sistemas de armazenamento de sêmen a 5°C e 15°C.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados e nas condições em que o experimento foi realizado, pode-se concluir que as temperaturas de armazenamento de sêmen refrigerado equino a 5°C e 15°C são eficientes tanto na manutenção das características de motilidade e integridade de membrana e se comportam de maneira similar por um período de até 24 horas. Além disso, a raça Mangalarga Marchador apresentou uma maior sensibilidade quanto à manutenção da qualidade seminal após refrigeração do sêmen quando comparada à raça Quarto de Milha.

REFERÊNCIAS

1. Squires EL, Brubaker JK, Mccue PM, Pickett BW. Effect of sperm number and frequency of insemination on fertility of mares inseminated with cooled semen. *Theriogenology*. 1998;28:709-18.
2. Brinsko SP, Varner DD. Artificial insemination and preservation of semen. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 1992;8:205-18.
3. Althouse GC, Wilson ME, Kuster C, Parsley M. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. *Theriogenology*. 1998;50:535-46.
4. Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*. 2000;53:47-58.
5. Alvarenga MA. Melhoria da resistência espermática à congelação e diminuição das variações entre raças e indivíduos com o uso da dimetilformamida para sêmen de garanhões [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2003.
6. Celeghini CCC, Arruda RP, Silva FHA, Faria DE, Andrade AFC, Raphael CF. Utilization of fluorescent probe association for membrane simultaneous assessment of plasmatic, acrossomal and mitochondrial membrane of rooster spermatozoa. *Rev Bras Cienc Avic*. 2007;9:143-9.
7. Loomis PR. Factors affecting the success of artificial insemination with cooled, transported semen. In: *Proceedings of the 38° Annual Convention of American Association of Equine Practitioners*; 1992, Orlando. Orlando: AAEP; 1992. p.629-47.

8. Squires EL, Brinsko SP. Factors affecting fertility of cooled semen. In: Proceedings of the Annual Meeting of Equine Nutrition and Physiology Society; 1997, Fort Worth. Fort Worth: Colorado State University; 1997. p.4-9.
9. Parks J, Graham J. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 1992;38:209-22.
10. Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*. 2000;62:3-22.
11. Carvalho GA, Papa FO. Estudo de diferentes diluentes sobre a viabilidade espermática utilizando-se diversas formas de refrigeração com sêmen equino. *Rev Bras Reprod Anim*. 2003;27:332-34.
12. Jasko J, Little TV, Lein DH, Foote RH. Comparison of spermatozoa movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987–1988). *J Am Vet Med Assoc*. 1992;200:979-85.
13. Avanzi BR, Farrás MC, Melo CM, Alvarenga MA, Dell’acqua Jr JA, Medeiros ASL, et al. Efficiency of different cooling and storage systems for maintaining equine semen viability in a hot environment. *Anim Reprod Sci*. 2006;94:152-4.
14. Machado MS, Leão KM, Gomes GM, Macedo LP, Alvarenga MA. Efeitos de diferentes sistemas de transporte sobre a qualidade do sêmen refrigerado equino. *Rev Bras Reprod Anim*. 2002;26:194-6.
15. Kayser JP, Amann RP, Shideler EL, Jasko DJ, Pickett BW. Effect of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 1992;38:601-14.
16. Varner DD, Blanchard TL, Love CL, Garcia MC, Kenney RM. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoa motility parameters. *Theriogenology*. 1988;29:1043-54.
17. Palmer E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: Proceeding of the 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination; 1984, Illinois. Illinois: USDA; 1984. p.377-9.
18. Squires EL, Amann RP, Mckinnon AO, Pickett BW. Fertility of equine spermatozoa cooled to 5oC or 20oC. In: Proceedings of the 11º International Congress in Animal Reproduction and Artificial Insemination; 1988, Dublin. Dublin: University College Dublin; 1988. p.297-9.
19. Farrás MC, Avanzi BR, Melo CM, Dell’Aqua JA, Papa FO. Efeito de diferentes diluentes na manutenção das características do sêmen equino em dois sistemas de refrigeração passiva. *Cienc Anim Bras*. 2008;9:693-9.

Recebido em: 05/02/2012

Aceito em: 12/05/2014