

## **AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN OBTIDOS DE QUATROS GARANHÕES, SUBMETIDOS AO MESMO PROTOCOLO DE CRIOPRESERVAÇÃO.**

EVALUATION OF THE SPERM QUALITY PARAMETERS OF THE SEMEN OBTAINED FROM FOUR STALLIONS SUBMITTED TO THE SAME CRYOPRESERVATION PROTOCOL.

**Matheus Xavier Simões<sup>1</sup>, Andrielle Cunha<sup>2</sup>**

1 Aluno do Curso de Medicina Veterinária

2 Professora do Curso de Medicina Veterinária

### **RESUMO**

A criopreservação de sêmen equino é uma biotecnologia, que vem proporcionando maior aproveitamento reprodutivo de um animal, com a utilização na técnica de reprodução assistida, armazenamento do material genético, comercialização e banco de reserva genética. No presente trabalho foi realizado a criopreservação de sêmen de quatro garanhões da raça Mangalarga Marchador, com idade entre 8 a 15 anos, que foram submetidos ao mesmo protocolo de criopreservação. O objetivo foi avaliar os parâmetros de qualidade espermática, observando a resposta individual dos animais diante do mesmo protocolo de criopreservação. Para isto, foram realizadas análises microscópicas ao pré-congelamento e pós-descongelamento, onde observou-se os parâmetros de qualidade espermática, através da análise da motilidade total, vigor e concentração dos espermatozoides de cada garanhão. Foi observado uma diferença individual dos garanhões diante a criopreservação, no entanto, essas diferenças não impossibilitaram a criopreservação de nenhum dos animais avaliados neste estudo.

**Palavras-Chaves:** Congelamento; biotecnologia; mangalarga; microscopia.

### **ABSTRACT**

Equine semen cryopreservation is a biotechnology that has been providing greater reproductive use of an animal, using the assisted reproduction technique, storage of genetic material, commercialization and genetic reserve bank. In the present work, the semen cryopreservation of four stallions of the Mangalarga Marchador breed, aged between 8 and 15 years, which were submitted to the same cryopreservation protocol, was carried out. The objective was to evaluate sperm quality parameters, observing the individual response of the animals to the same cryopreservation protocol. For this, microscopic analyzes were carried out pre-freezing and post-thawing, where the parameters of sperm quality were observed, through the analysis of total motility, vigor and concentration of spermatozoa of each stallion. There was an individual difference between the stallions before cryopreservation, however, these differences did not preclude the cryopreservation of any of the animals evaluated in this study.

**Keywords:** Freezing; biotechnology; mangalarga; microscopy.

## INTRODUÇÃO

No Brasil a equinocultura tem se desenvolvido muito nos últimos anos, em segmentos como os esportes, lazer e também no uso destes animais para tração, essa cultura possui representatividade internacional, sendo observado em outros países, que além das utilidades mencionadas, equinos também são utilizados na alimentação. Aumentando as opções de renda com a utilização do cavalo (LIMA et al., 2012).

O aumento da demanda nos sistemas de criação equina levou a necessidade do desenvolvimento de técnicas que possibilitaram um maior e melhor aproveitamento do potencial produtivo e reprodutivo de várias espécies domésticas (BRANDÃO, 2008).

Uma biotecnologia utilizada é a criopreservação do sêmen, essa é uma das técnicas que vieram para facilitar e otimizar a produção. A criopreservação do sêmen proporciona inúmeras vantagens, a maior disponibilidade de espermatozoide, trazendo facilidade aos trabalhos de reprodução assistida. A otimização do uso de garanhões com comprovada superioridade genética, com a possibilidade do armazenamento do sêmen, mesmo fora do período de estação de monta e a quebra das barreiras geográficas, fazendo com que a remessa de sêmen seja enviada para qualquer parte do mundo (BARRETO et al., 2008).

A biotecnologia da reprodução é uma importante ferramenta a serviço da equinocultura mundial, como instrumento direto do melhoramento genético. Levando em consideração a utilização da inseminação artificial (IA), esta talvez seja a biotecnologia com maior impacto na produção equina, pois um reprodutor pode deixar centenas de descendentes ao longo de sua vida reprodutiva por meio da IA usada eficientemente (LOOMIS, 2006).

Além do melhoramento genético, o congelamento de sêmen serve como banco de reserva genética para animais de alto padrão racial e comercial, propicia maior intercâmbio entre criatórios das mais variadas regiões e países, e seleciona indivíduos e linhagens quanto à sua fertilidade e congelabilidade. A criopreservação também contribui para minimizar perdas econômicas advindas da morte inesperada de reprodutores de alto valor comercial (WATSON, 2000).

Devido a recente liberação do uso da criopreservação de sêmen por grande parte das associações de criadores, a equinocultura mundial é cada vez maior a utilização do sêmen congelado (VIDAMENT, 2005; MILLER, 2008).

Ao observar o uso de sêmen criopreservado, as taxas de concepção de éguas inseminadas variam bastante. Isso se dá devido à alta variação na qualidade do congelamento do sêmen, observada entre os diferentes garanhões, sendo que essa variação entre indivíduos chega a oscilar entre 25 e 40% (VIDAMENT, 2005). Adicionalmente, sabe-se que boa parte dos garanhões não respondem bem a essa biotécnica, o que faz com que o número de pesquisas nesse sentido venha aumentando cada vez mais, com o intuito de superar a variação individual (COTORELO; HENRY, 2002).

Este trabalho, relata a coleta, criopreservação e avaliação dos parâmetros de qualidade espermática do sêmen obtido de quatro garanhões, que foram submetidos ao mesmo protocolo de criopreservação.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Animais utilizados.**

Foi realizado a criopreservação de sêmen de quatro garanhões da raça Mangalarga Marchador, com idade entre 8 a 15 anos, criados em sistema intensivo, alimentados com feno (tifton), ração granulada, sal mineral e água. Previamente foi realizado uma anamnese do histórico reprodutivo do garanhão, depois exame físico, avaliação do sistema reprodutivo do garanhão, foi verificado se apresentavam alguma anormalidade no sistema reprodutivo.

### **Coleta e avaliação inicial do ejaculado.**

Foi utilizada uma fêmea em fase estral para auxiliar a coleta de sêmen do garanhão (Figura 1). A coleta foi realizada com a vagina artificial Botupharma® (Botupharma- Produtos veterinários, Botucatu, SP, Brasil), (Figura 1).

A vagina artificial foi revestida internamente com uma luva de palpação retal, contendo um coletor na extremidade oposta associado a um filtro de nylon para reter a fração gel do ejaculado (Figura 1). No momento em que o garanhão realizou a montar na fêmea, o pênis foi desviado manualmente para o interior da vagina artificial,

a ejaculação foi constatada a partir das observações: movimento de cauda para cima e para baixo, contração dos músculos perianais, e fluxo pulsátil uretral da ejaculação.



Figura 1- Fêmea contida para auxiliar a coleta (A); Vagina artificial (B) (Arquivo pessoal).

As amostras foram avaliadas imediatamente após a coleta.

1ª avaliação pré-diluição: inicialmente foram analisados os aspectos físicos do ejaculado como volume, coloração, presença de sujidades e odor. Em seguida foram analisadas as análises microscópicas (motilidade, vigor, concentração) conforme ilustra a figura 2.

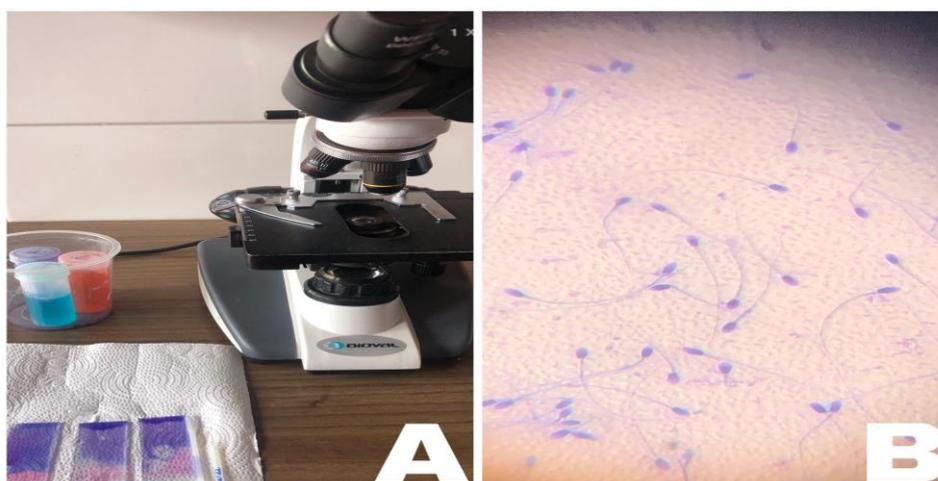


Figura 2- Análise microscópica (A); Morfologia espermática (B) (Arquivo pessoal).

Após essas análises imediatas, o sêmen foi diluído 1:1, adicionando o diluente crioprotetor para transporte, esse diluidor era composto por leite-açúcares-conservantes, BotuSÊMEN® (Botupharma-Produtos veterinários, Botucatu, SP, Brasil). Os tubos com o sêmen contendo as amostras já diluídas, foram acondicionados em uma caixa de isopor própria para o transporte de sêmen equino

(Figura 3), onde ocorreu o transporte das amostras para ser realizado a criopreservação no laboratório, em até 1 hora de intervalo de transporte.



Figura 3- Amostra de sêmen armazenada para transporte (Arquivo pessoal).

### **Manipulação, avaliação e criopreservação do ejaculado.**

No laboratório, as amostras do sêmen diluído foram para a centrífuga, separadas em tubos de 15 ml, sendo submetidas à rotação de 1.200rpm por 10 minutos, conforme ilustra a figura 4.

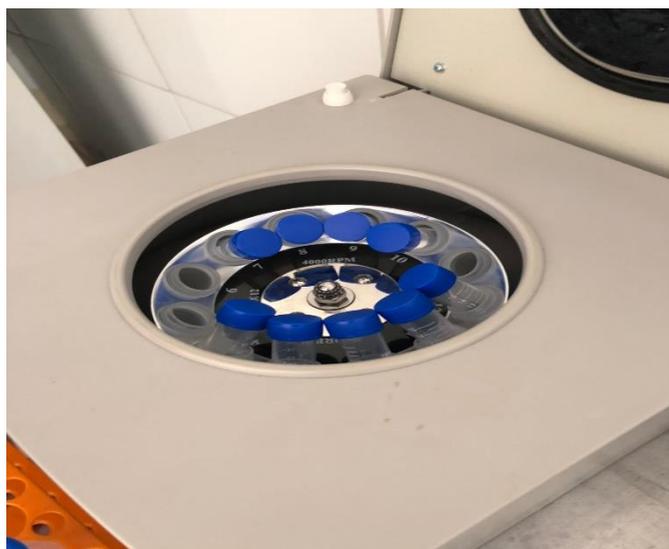


Figura 4- Amostras de sêmen diluídas e separadas na centrifugação (Arquivo pessoal).

Avaliações pré-diluição: Enquanto as amostras permaneciam na centrifugação, as análises microscópicas foram preparadas. Para realizar a contagem da concentração espermática, foi utilizado uma diluição de 1:20, que correspondia a 19 uL de água e 1 uL de sêmen, (Figura 5). Após a diluição e homogeneização, foi

colocado 1 amostra em cada lado da câmara de Neubauer, e foi realizado a contagem dos espermatozoides presentes, sendo contado de 5 quadrados na coluna horizontal e 5 quadrados na coluna vertical (Figura 5), calculando uma média aritmética, somando as duas colunas e dividindo por 2, resultando a quantidade de milhões de espermatozoides por ml.

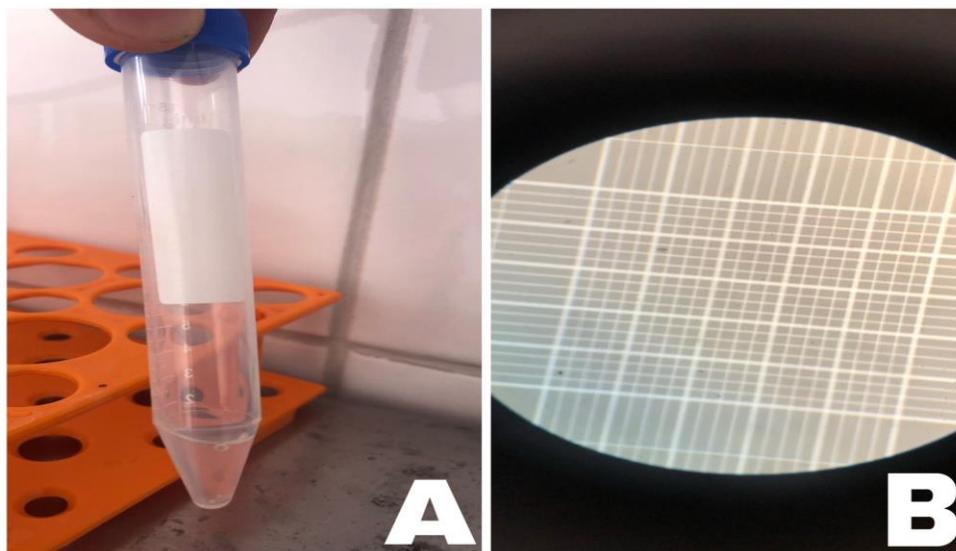


Figura 5- Diluição 1:20 para concentração espermática (A); Câmera de Neubauer (B) (Arquivo pessoal).

Após o cálculo da concentração espermática foi realizado o cálculo da quantidade de palhetas, e calculado a quantidade de espermatozoides a serem envasados dentro de cada palheta, que seriam posteriormente congeladas. O cálculo realizado foi: volume X concentração X motilidade / por 100 e depois dividido por 100 milhões de espermatozoides por palhetas.

Depois dos 10 minutos de centrifugação, as amostras foram processadas de maneira que a fração espermática fosse separada da fração que continha o plasma seminal (Figura 6), e desta forma o sobrenadante contendo o plasma seminal foi retirado e desprezado.

Após a separação da fração espermática, foi adicionado o diluente crioprotetor para a criopreservação de sêmen equino, esse diluidor era composto por açúcares - antioxidantes - aminoácidos - gema - crioprotetor, BotuCRIO® (Botupharma-Produtos veterinários, Botucatu, SP, Brasil) (Figura 6), realizando o cálculo de números de palhetas dividido por 2, sabendo assim a quantidade de crioprotetor que foram adicionados.

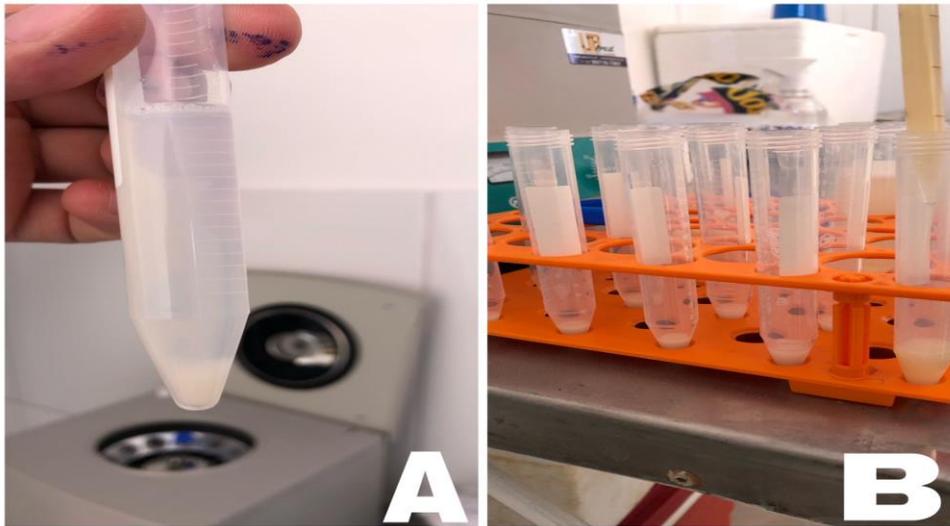


Figura 6- Plasma seminal na parte superior do tubo, e a fração espermática na parte inferior (A); Plasma seminal desprezado, seguido da adição do crioprotetor (B) (Arquivo pessoal).

Avaliações pós diluição: após o crioprotetor ser adicionado nas amostras, foi realizado uma segunda avaliação microscópica, sendo analisados os parâmetros de: motilidade e vigor. Após a imediata análise pós-diluição, foi realizado o envasamento das palhetas, onde utilizou-se palhetas no volume de 0,5 ml, previamente identificadas com nome do garanhão e data da criopreservação, conforme ilustra a figura 7. As palhetas foram envasadas com a amostra seminal já diluída, e em seguida foram lacradas com esferas de metal (Figura 7).

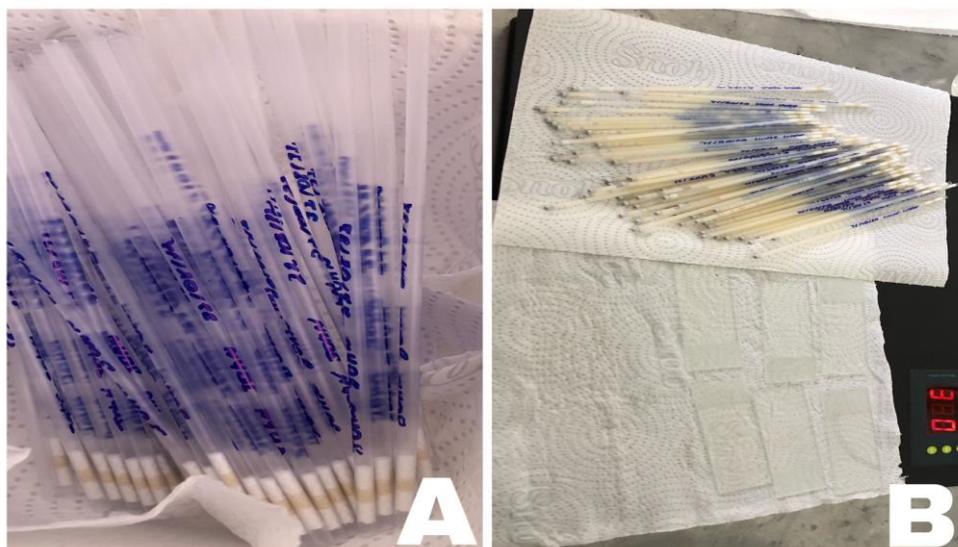


Figura 7- Palhetas identificadas (A); Palhetas envasadas com amostra seminal (B) (Arquivo pessoal).

Após o sêmen ser envasado nas palhetas, as amostras foram colocadas no suporte de criopreservação conforme pode ser observado na Figura 8, e então o sêmen foi mantido sob refrigeração em temperatura estabilizada entre 5°C a 6°C, por

25 minutos, sendo esta temperatura foi controlada através de um termômetro digital (Figura 8).



Figura 8- Suporte com as amostras (A); Geladeira estabilizada (B) (Arquivo pessoal).

Após os 25 minutos de refrigeração, as palhetas foram para uma caixa de isopor térmica tampada, onde foi colocado 6 cm de nitrogênio líquido e as amostras ficaram no suporte, flutuando acima do nitrogênio líquido, a uma distância de 3 cm, apenas em contato com o vapor, por 15 minutos (Figura 9).



Figura 9- Suporte com as amostras no vapor do nitrogênio (Arquivo pessoal).

Depois das etapas de resfriamento e vapor do nitrogênio, foi realizada a imersão total das palhetas no nitrogênio líquido, a  $-196^{\circ}\text{C}$ , e foi finalizado o congelamento (Figura 10).



Figura 10- Palhetas no nitrogênio líquido (Arquivo pessoal).

### **Descongelamento, avaliação e armazenamento.**

O descongelamento foi realizado em banho-maria na temperatura de  $38^{\circ}\text{C}$ , por 60 segundos e imediatamente avaliado.

Avaliação pós-descongelamento: após o descongelamento foram realizadas novamente as mesmas análises microscópicas que foram feitas nas análises pré-diluição. Após as análises, foi realizado o armazenamento com o auxílio de uma pinça. As palhetas contendo as amostras de sêmen foram armazenadas em um botijão de nitrogênio (Figura 11).



Figura 11. Botijão de nitrogênio (Arquivo pessoal).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo da coleta destas amostras foi avaliar a qualidade do sêmen criopreservado para ser utilizado na inseminação artificial, bem como a conservação dos gametas para posterior uso e comercialização e armazenamento do material genético. Posteriormente, foi analisado o efeito individual dos ganhões diante do mesmo processo de criopreservação.

As amostras coletadas dos quatro ganhões, foram submetidas ao mesmo protocolo de criopreservação, realizando uma análise individual de cada gação, avaliando os parâmetros espermáticos de pré-congelamento e pós-descongelamento.

O protocolo para a refrigeração utilizado, foi realizado a uma temperatura controlada entre 5°C a 6°C por 25 minutos, esta fase teve como objetivo a diminuição do metabolismo celular, bem como a estabilização da membrana plasmática. Segundo Soares e Guerra (2009) o estresse inicial se dá devido a transição da membrana plasmática do estado líquido para o estado gel, quando o espermatozoide é submetido a temperatura de refrigeração a 5°C. A literatura descreve vários tipos de refrigeração, como lentas (menor que 0,33°C/min); médias (0,33°C/min a 1,0°C/min) e rápidas (maior que 1,0°C/min). De acordo com Douglas e Hamilton et al. (1984) a melhor técnica, que mostra resultados mais eficientes, é o protocolo de refrigeração média que é realizado por volta dos 35°C, até que ocorra estabilização da temperatura 5°C. O mesmo protocolo foi utilizado neste estudo, e também foram observados resultados eficientes.

No processo de congelamento neste trabalho, as palhetas contendo as amostras ficaram 3cm acima do nitrogênio líquido, mantidas sob o vapor por 15 minutos até a imersão completa das palhetas dentro do nitrogênio líquido, semelhante a utilizada por Amann e Pickett (1987) que realizaram o congelamento com uma curva de -60°C/min sendo obtida a exposição das palhetas horizontalmente, 6 cm acima do vapor de nitrogênio por 15 a 20 minutos.

Tabela 1- Apresenta dados do volume do ejaculado; concentração espermática (Arquivo pessoal).

	Ejaculado/ml	Concentração	MI/crioprotetor
--	--------------	--------------	-----------------

Garanhão 1	50 ml	255 milhões p/ml	51ml
Garanhão 2	35ml	267 milhões p/ml	37ml
Garanhão 3	60ml	277 milhões p/ml	58ml
Garanhão 4	40ml	215 milhões p/ml	34ml

Conforme pode ser observado na tabela 1, os garanhões apresentaram uma concentração superior a 200 milhões de espermatozoides/ml. Observado por Nascimento (2006) em outras literaturas, os melhores resultados são com concentração de 100 ou 200 milhões de espermatozóides/ml.

Tabela 2- Apresenta dados da avaliação individual de cada garanhão; idade, 1º avaliação pré-diluição e pós-descongelamento, avaliando os parâmetros espermático: motilidade total e vigor (Arquivo pessoal).

	idade	1º Avaliação pré-diluição	Avaliação pós-descongelamento
Garanhão 1	8 anos	Motilidade 80 % Vigor 5	Motilidade 70% Vigor 5
Garanhão 2	15 anos	Motilidade 80 % Vigor 5	Motilidade 60% Vigor 4
Garanhão 3	11 anos	Motilidade 70% Vigor 4	Motilidade 50% Vigor 3

Garanhão 4	9 anos	Motilidade 80% Vigor 4	Motilidade 70% Vigor 4
------------	--------	---------------------------	---------------------------

Diante das avaliações microscópicas analisadas, foi possível observar nas análises pós-descongelamento que os garanhões 1 e 4 responderam positivamente ao processo de criopreservação, perdendo apenas 10% em sua motilidade.

Os garanhões 2 e 3 tiveram um dano maior ao serem submetidos à criopreservação, foi possível identificar uma variação de 20% de motilidade e 1 de vigor. Isso pode ser justificado por fatores como estresse aos espermatozoides devido ao processo de refrigeração, danos causados pelos cristais de gelo e mudanças intracelulares devido à desidratação (AMANN; PICKETT, 1987). Também de acordo com Nunes et al. (2006) os danos aos espermatozoides são resultado de lesões na membrana plasmática devido a mudanças na sua permeabilidade, que resulta em alterações funcionais e metabólicas, prejudicando a motilidade e a capacidade fecundante dos espermatozoides. A resposta dos espermatozoides ao congelamento é diferente entre as espécies de animais, e também entre os indivíduos da mesma espécie. E isto ocorre devido às variações encontradas no metabolismo individual, podendo ser então observado uma maior quantidade de danos durante a criopreservação (LOOMIS; GRAHAM, 2008).

Podendo considerar que os animais 2 e 3, são garanhões mais velhos 11 e 15 anos de idade, estudos realizados por Morel e Mina (1999) apontam que qualidade do sêmen começa a diminuir entre os 15 e 20 anos de idade, acompanhada pelo aumento de incidência de anomalias morfológicas e diminuição da motilidade.

Após o descongelamento, os garanhões 2 e 3 tiveram uma qualidade espermática inferior aos que foram observados nos garanhões 1 e 4. Embora tenha sido observado esta diminuição na qualidade do sêmen destes animais após a criopreservação, estes animais são considerados aptos à criopreservação. Conforme o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal CBRA (2013) só serão considerados fora do padrão de qualidade o sêmen pós-descongelamento que apresentar motilidade progressiva menor que 30%, vigor abaixo de 3 e acima de 40% de anormalidades espermáticas.

Os crioprotetores utilizados visam proteger e diminuir os danos que podem ser causados nas células espermáticas durante o processo de criopreservação. Conforme Alvarenga et al., (2000) a busca pelos estudos acerca dos crioprotetores tem sido bastante expressiva, impulsionada ao fato de somente uma parte dos garanhões apresentarem sêmen com uma boa resposta ao congelamento, com os meios utilizados disponíveis até o momento. Assim, os estudos que avaliam os efeitos individuais de garanhões nos processos de criopreservação são de extrema importância.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Foram observado uma diferença individual entre os garanhões nas avaliações dos parâmetros de qualidade espermática, avaliando-se a motilidade total, vigor e concentração, nas análises microscópica pré-congelamento e pós-descongelamento, submetidos ao mesmo protocolo de criopreservação. Diante que estas diferenças não foram suficientes para impossibilitar a criopreservação de nenhum dos animais avaliados neste estudo.

## **REFERÊNCIAS**

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal Equine Veterinary Science*, v.7, p.145-173, 1987.

ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MOREIRA, R.M.; CESARINO, M.M. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using packaging systems. *Equine Veterinary Journal*, 32, (6) p. 541-45, 2000.

Barreto, M. A. P., Silva, J. F. S., Fagundes, B., Caiado, J. R. C., Souza, G. V., & Shimoya, A. (2008). Efeito de proteínas do plasma seminal equino com massa superior a 10 kDa concentradas 10 vezes sobre a congelabilidade do sêmen. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37(12), 2115-2119.

BRANDÃO, A. C. Efeito do laser diodo sobre as características de motilidade, de integridade das membranas plasmáticas e acrossomal e de potencial de membrana mitocondrial de espermatozoide criopreservados de equinos. Tese apresentada ao programa de pós graduação em reprodução animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2008.

CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2ª Ed. Belo horizonte, 1998. 49p.

COTORELLO, A.C.P; HENRY, M. Princípios da criopreservação, congelação e avaliação do sêmen eqüino (revisão de literatura). Rev. Bras. Reprod. Anim. v. 26, p. 14-25, 2002.

DOUGLAS-HAMILTON, D. H.; OSOL, R.; OSOL, G.A. Field study of the fertility of transported equine semen. Theriogenology, v. 22, p. 291 - 303, 1984.

Loomis, P. R. (2006). Advanced methods for handling and preparation of stallion Semen. Veterinary Clinics North American Equine Practice, 22(3), 663-676.

LOOMIS, P. R.; GRAHAM, J. K. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. Animal Reproduction Science, Amsterdam, v. 105, n. 1-2, p. 119-128, apr. 2008.

Lima, R. A. S., Oliveira, R. A., Mendes, C. Q., & Júnior, P. G. Perfil e Tendências da Equideocultura Brasileira. Anais da 49ª Reunião Anual 40 da Sociedade Brasileira de Zootecnia. A produção animal no mundo em transformação. Brasília, 23 a 26 de julho de 2012.

Morel D, Mina CG. 1999. Equine Artificial Insemination. Cabi Publishing. Oxfordshire: CAB International, 406 p.

MILLER, C.D. Optimizing the use of frozen-thawed equine semen. Theriogenology, v.70, p.463-468, 2008.

NASCIMENTO, J. Efeitos da concentração espermática e volume sobre as características do movimento espermático (CASA) e sobre membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial (microscopia e epifluorescência) de espermatozoides eqüinos criopreservados. 2006. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade de São Paulo.

NUNES, D. B.; ZUCCART, C. E. S. N. e SILVA, E. V. C. Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.30, n.1/2, p.42-56, jan./jun. 2006.

SOARES, A. T. e GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. Tecnologia & Ciência Agropecuária, João Pessoa, v.3, n.2, p.53-63, jun. 2009.

VIDAMENT, M. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. Animal Reproduction Science, v.89, p.115-136, 2005.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reproduction Science, v.60-61, p.481-492, 2000.