

VIABILIDADE E FERTILIDADE DO SÊMEN EQUINO RESFRIADO À 5 °C COM DOIS DIFERENTES DILUIDORES

PUGLIESI, G.; DE CARVALHO, G. R.; SARTORI, S. S.; KER, P. G.; OLIVEIRA, R. R. DE; BISPO, C. A. S.

A inseminação artificial (IA) é uma biotécnica da reprodução que possibilita a utilização de indivíduos geneticamente e zootecnicamente superiores, com menores custos por serviço, permitindo um rápido ganho genético. A utilização da inseminação artificial com sêmen fresco ou resfriado proporciona um melhor aproveitamento do reprodutor e a possibilidade de utilização de reprodutores que se encontram distantes, alcançando fertilidade similar à da monta natural (MN).

O processo de criopreservação (resfriamento e congelamento) do sêmen causa mudanças ultra-estruturais, bioquímicas e funcionais na célula espermática resultando, inevitavelmente, na redução da motilidade e do número de espermatozoides viáveis, com prejuízo no transporte espermático no trato reprodutivo da fêmea e, conseqüentemente, na fertilidade (Leboeuf et al., 2000). A viabilidade do sêmen equino resfriado até 48 horas é maior quando comparada à do sêmen congelado (Vidament et al., 1997). Além disso, a utilização do sêmen congelado necessita de maior acompanhamento veterinário do ciclo estral das éguas, através da palpação transretal, objetivando que a IA ocorra o mais próximo da ovulação da égua, já que o sêmen congelado possui menor viabilidade (abaixo de 24 horas).

A IA com sêmen refrigerado vem sendo amplamente utilizada nas últimas décadas, mesmo antes da oficialização da metodologia por algumas associações de raça, pois muitos criadores evitavam deslocar as éguas até o local onde se encontravam os garanhões.

Uma das causas do aumento do uso do sêmen resfriado é a alta proporção de garanhões (20-40%) que possuem resposta pobre ao congelamento (Vidament et al., 1997). De qualquer forma a tecnologia de sêmen resfriado se torna interessante quando o sêmen é capaz de manter sua capacidade fertilizante por 1 a 2 dias. Infelizmente, a fertilidade na IA com sêmen resfriado é variável entre garanhões e laboratórios (Pickett, 1994; Katila, 1997). O sucesso do uso do sêmen resfriado/estocado depende de muitos fatores que se confundem, como: taxa de resfriamento, temperatura de armazenamento, composição do meio extensor (diluidor), dose inseminante, número de inseminações, qualidade do sêmen a fresco, manuseio do sêmen (Malmgren, 1998; Batelier et al., 2001).

A maioria dos extensores seminais é baseada em leite em pó ou gema de ovo. A escolha do diluidor deve ser baseada no sistema de inseminação realizada, tempo de estocagem, temperatura de estocagem e na individualidade de resposta do garanhão ao resfriamento (Pagl et al., 2006).

Os diluidores a base de gema de ovo não são comumente utilizados no resfriamento de sêmen de Garanhões. Porém, um diluidor baseado em glicina-

¹ Departamento de Zootecnia-UFV/Viçosa-MG

² Departamento de Veterinária-UFV/Viçosa-MG

* Apresentador - pugliesi_vet@hotmail.com

gema de ovo (Dimitropoulos) foi muito utilizado na década de 80-90 na Europa, conseguindo-se altas taxas de viabilidade espermática até 24 horas de armazenamento a 5 °C (Ijaz & Ducharme., 1995).

Neste contexto, objetivou-se avaliar a viabilidade e a fertilidade de sêmen eqüino diluído com dois diferentes extensores seminais sendo um a base de leite e outro a base de gema de ovo, resfriados a 5 °C por 24 horas.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no setor de Equideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa localizado no município de Viçosa – MG, no período de janeiro a março de 2008.

Foram realizadas 17 coletas de sêmen através de vagina artificial de um garanhão da raça Mangalarga Marchador, de 10 anos e de fertilidade confirmada através de histórico reprodutivo e exame andrológico. Após as coletas, o sêmen foi diluído com dois diferentes diluidores: diluidor a base de leite em pó desnatado (Kenney,1975) e diluidor glicina-gema (Foote, 2002), sendo ajustado para uma dose inseminante de 500 milhões de espermatozóides viáveis num volume final de 15 mL por dose. O sêmen foi colocado em contêiner apropriado (Equiteiner) onde se realizou o resfriamento até 5 °C e o armazenamento durante 24 horas.

Os parâmetros físicos de motilidade progressiva e vigor, do sêmen fresco (T1), diluído com Kenney (T2), diluído com Foote (T4) e após o período de resfriamento com Kenney (T3) e Foote (T5), foram avaliados através de microscópio óptico. A morfologia espermática dos tratamentos T1, T3 e T5 foi avaliada através da deposição de uma gota de sêmen, previamente diluído em formol salina a 37 °C, entre lâmina e lamínula e após realizou-se a contagem de 200 células espermáticas em microscópio óptico de contraste de fase com aumento de 1000 vezes.

Foram utilizados 31 ciclos de 26 éguas mestiças Bretão-Postier com idade variando de 4 a 20 anos, peso vivo entre 350 e 500 kg, e que apresentavam bom escore de condição corporal. As éguas foram mantidas a pasto recebendo sal mineral e água *ad libitum*, sendo fornecida suplementação com capim fresco picado de *Pennisetum purpureum* (cv Cameron) e 2 kg de concentrado/animal/dia.

As éguas foram selecionadas antes do início do experimento mediante exame ginecológico completo por palpação e ultra-sonografia transretal, e com base no histórico reprodutivo. As éguas foram rufiadas diariamente. As que apresentavam comportamento de estro (cio) ou folículo maior que 25 mm de diâmetro, com condições uterinas desejáveis, foram controladas diariamente através de palpação transretal.

Após a detecção de folículo de 30 mm as éguas foram divididas em dois tratamentos: A (éguas inseminadas com sêmen resfriado com diluidor Kenney) e B (éguas inseminadas com sêmen resfriado com diluidor Foote)

As inseminações (64) foram realizadas em média $24,71 \pm 0,51$ horas após o resfriamento do sêmen, que foi depositado no corpo do útero, a partir da detecção de um folículo de 30-35 mm até a observação da ovulação. As inseminações foram feitas somente nos dias de terça-feira, quinta-feira e sábado. O diagnóstico de gestação foi realizado no 13º dia após a ovulação através da ultra-sonografia transretal.

Para realização das análises estatísticas foi utilizado o programa SAEG (UFV, 1997). Os valores obtidos para motilidade progressiva, vigor e morfologia espermática foram avaliados pela ANOVA e teste de SNK a 5% de significância. A fertilidade foi avaliada através do teste de Qui-quadrado.

Resultados e Discussão

Os valores médios para a motilidade progressiva estão expressos na tabela abaixo (Tabela 1). Observa-se que a motilidade foi inferior após o processo de resfriamento nos dois diluidores avaliados (Gráfico 1). Isto pode ser explicado pelos danos promovidos durante o resfriamento, que são decorrentes de danos estruturais diretos, como a ruptura das membranas ou indiretos, por alterações das funções celulares (Squires et al., 1999). Mudanças na organização do mosaico fluído da membrana plasmática podem levar a alterações na permeabilidade, funcionalidade e metabolismo da célula espermática, o que pode prejudicar a motilidade e a capacidade fecundante da mesma (Amann e Graham, 1993). O choque térmico, estresse osmótico, e o dano oxidativo são os principais fatores relacionados com as crioinjúrias na célula espermática, causando perda da viabilidade (Mazur, 1984; Li et al., 2005).

Tabela 1: Motilidade e vigor espermático do sêmen eqüino fresco (T1), diluído com Kenney (T2), diluído com Foote (T4), resfriado com Kenney (T3) e resfriado com Foote (T5).

Tratamento	n	Motilidade progressiva	Vigor
T1	17	63,82 ± 6,00 ^A	3,23 ± 0,25 ^B
T2	15	64,00 ± 6,32 ^A	3,47 ± 0,13 ^A
T3	17	49,40 ± 13,79 ^B	2,76 ± 0,39 ^C
T4	15	60,00 ± 8,66 ^A	2,67 ± 0,24 ^C
T5	17	36,18 ± 9,28 ^C	2,00 ± 0,30 ^D

^{A,B,C,D} Letras maiúsculas distintas na mesma coluna indicam valores diferentes pelo teste de SNK ($p < 0,05$)

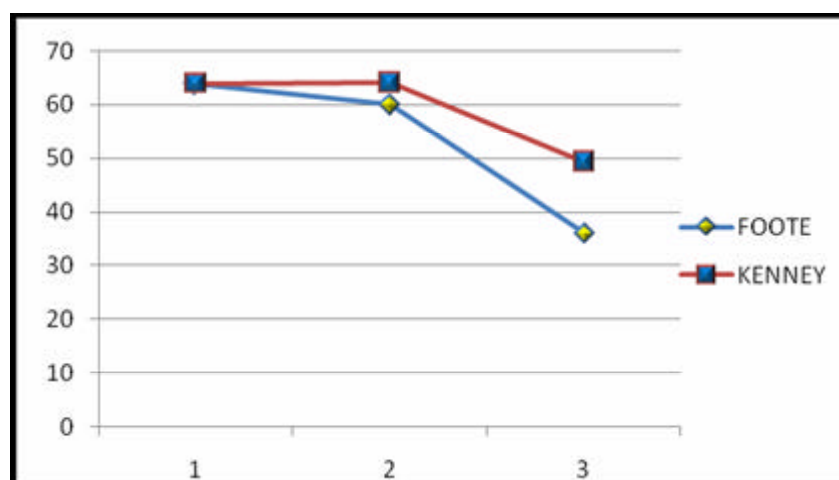


Gráfico 1: Valores médios da motilidade progressiva do sêmen eqüino fresco (1), diluído (2) e resfriado por 24 horas (3) com os dois diluidores avaliados.

Verifica-se que o diluidor de Kenney se mostrou superior na manutenção da motilidade progressiva após o resfriamento em relação ao diluidor de Foote: $49,4 \pm 13,79^B$ e $36,18 \pm 9,28^C$ respectivamente. Esta superioridade pode ser oriunda de uma maior proteção promovida pelo diluído de Kenney à membrana plasmática do espermatozóide.

O vigor do sêmen diluído com Kenney (T2) foi superior ao sêmen fresco (T1), podendo ser explicado pela maior disponibilidade de ATP para a célula espermática advinda principalmente da “quebra” da glicose e lactose contida neste diluidor. Comparando-se os dois diluidores entre si, o diluidor de Kenney foi superior tanto no vigor espermático antes ($3,47 \pm 0,13^A$ vs $2,67 \pm 0,24^C$) como após o resfriamento ($2,76 \pm 0,39^C$ vs $2,00 \pm 0,30^D$). Não foi encontrado na literatura outro trabalho utilizando o diluidor de Foote (2002) no resfriamento de sêmen eqüino. Porém, os resultados do presente estudo diferem dos obtidos por Ijaz e Ducharme (1995), que utilizaram o diluidor de Kenney (1995) e um diluidor diferente, também à base de glicina-gema de ovo (Dimitropoulos).

Não houve diferença entre a porcentagem de espermatozóides normais e defeitos menores entre os dois diluidores após o resfriamento (tabela 2). No entanto, houve aumento de patologias espermáticas com ambos diluidores quando comparados ao sêmen fresco, e isto reforça o conceito de que o processo de criopreservação promove injúrias celulares irreversíveis, o que pode comprometer a fertilidade do sêmen (Graham, 1996).

Tabela 2: Valores médios e desvios-padrões da porcentagem de espermatozóides normais, apresentando defeitos maiores e defeitos menores do sêmen fresco (T1), pós-resfriamento com diluidor Kenney (T3) e diluidor Foote (T5).

Tratamento	N	Normais	Defeitos Maiores	Defeitos Menores
T1	16	$72,63 \pm 4,75^A$	$3,37 \pm 1,82^A$	$23,38 \pm 3,95^B$
T3	15	$59,33 \pm 13,48^B$	$2,55 \pm 1,67^A$	$38,11 \pm 12,77^A$
T5	17	$53,10 \pm 13,88^B$	$1,17 \pm 0,8^B$	$45,73 \pm 13,9^A$

^{A,B} Letras maiúsculas distintas na mesma coluna indicam valores diferentes pelo teste de SNK ($p < 0,05$)

Apesar de certa superioridade na viabilidade “in vitro” (motilidade e vigor espermático) do sêmen diluído e resfriado com o diluidor de Kenney, esta não foi confirmada pelo teste de fertilidade, já que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre a taxa de concepção entre os grupos A e B, que foram respectivamente 43,8 (7/16) e 26,7% (4/15). Isso pode ser consequência da baixa quantidade de animais utilizados neste estudo. Comparando as taxas de concepção com outros estudos (Douglas-Hamilton et al., 1984; Heiskanen et al., 1987; Jasko et al., 1992; Ferreira, 1993; Mattos, 1995) com sêmen resfriado a 5 °C em diferentes períodos de armazenamento, verificou-se menor taxa de concepção no presente estudo. Este fato pode ser oriundo do efeito individual do garanhão ao resfriamento do sêmen, de acordo com a susceptibilidade dos ejaculados a estocagem e ao frio, sendo estes animais classificados como “bons resfriadores” ou “pobres resfriadores” (Brinsko et al., 2000; Battelier et al., 2001). Esta variação individual se refere principalmente ao conteúdo de fosfolipídios e colesterol na membrana plasmática do espermatozóide (Battelier et al., 200).

Conclusões

Conclui-se com base no presente estudo, que o sêmen eqüino diluído e resfriado por 24 horas a 5 °C com o diluidor de Kenney possui viabilidade superior ao resfriado com o diluidor de Foote, sendo as fertilidades do sêmen resfriado com estes dois diluidores similares.

Referências Bibliográficas

Amann, R.P., Graham, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A.O., VOSS, J.L. **Equine reproduction**, 1. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, cap.80, p.715-745, 1993.

Batellier, F.; Vidament, M.; Fauquant, J.; Duchamp, G.; Arnaud, G.; Yvon, J.M.; Magistrini, M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**. Vol.68, p.181–190, 2001.

Brinsko, S.P., Rowan, K.R., Varner, D.D., Blanchard, T.L. Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa. **Theriogenology**, Vol. 53, p.1641-1655, 2000.

Douglas-Hamilton, D.H.; Osol, R.; Osol, G.; Driscoll, D.; Noble, H. A field study of fertility of transported equine semen. **Theriogenology**, v.22, n.3, p.291-304, 1984.

Ferreira, M.F.L. **Efeito de diluente e taxa de resfriamento sobre a motilidade espermática e fertilidade do sêmen de jumento**. 1993. 67p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte- MG, 1993.

Foote, R.H. Within-herd use of boar sêmen at 5 C, with a note on electronic monitoring of oestrus. **Reproduction Domestic Animal**. Vol.37, p.62-63, 2002.

Graham, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**. Vol. 12, p. 131-147, 1996.

Heiskanen, M.L.; Pirhonen, A.; Koskinen, E.; Maenpaa, P.H. Motility and ATP content of extended equine spermatozoa in different storage conditions. **J. Reprod. Fertil.**, v.35, p.103-107, 1987.

IjaiY, A. & Ducharme, D. Effect of various extenders and taurine on survival of stallion sperm cooled to 5°C. **Theriogenology** 44: 1039-1050, 1995

Jasko, D.J.; Squires, E.L.; Moran, D.M.; FARLIN, M.E. Comparison of pregnancy rates utilizing fresh, cooled and frozen semen. In: INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION, 12, 1992, **Proceedings...**1992c, v.3, p.1439-1441.

Katila, T.; Combes, G.B.; Varner, D.D.; Blanchard, T.L. Comparison of three containers used for the transport of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v.48, p.1085-1092, 1997.

Kenney, R.M.; Bergman, R.V.; Cooper, W.L. Minimal contamination techniques and preliminary findings. In: AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS, 1975, **Proceedings...**, Vol.21, p.327-336, 1975.

Lebouf, B.; Restall, B.; Salamon, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Anim. Reprod. Sci.**, v.62, n. 1-3, p.113-141, 2000.

Li, Y.H.; Cai, K.J.; Su, L.; Guan, M.; He, X.C.; Wang, H.; Kovacs, A.; Ji, W.Z. Cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa in a chemically defined extender. **Asian J. Androl.** 7, 139–144. 2005.

Malmgren, L. Effectiveness of two systems for transporting equine semen. **Theriogenology**, v.50, p.833-839, 1998.

Mattos, R.C. **Influência de diferentes métodos de preservação de sêmen equino sobre a fertilidade, motilidade espermática e contaminação bacteriana.** 1995. 114p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, 1995.

Mazur, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 247, C125–C142, 1984.

Pagl, R.; Aurich, J. E.; Muller-Schlosser, F.; Kankofer, M.; Aurich, C. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5 °C. **Theriogenology**, Vol.66, p.1115-1122, 2006.

Pickett, B.W., Shiner, K.A. Recent developments in artificial insemination in horses. **Livestock Production Science.**, v.40, n.1, p.31-36, 1994.

Squires, E.L.; Pickett, B.W.; Graham, J.K.; Vanderwall, D.K.; McCue, P.M.; Bruemmer, J.E. Cooled and Frozen Stallion Semen. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory.** Fort Collins, Bulletin No 9, p.01-38, 1999.

Varner, D.D.; Blanchard, T.L.; Meyers, P.J.; Meyers, S.A. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20°C. **Theriogenology**, v.32, n.4, p.515-525, 1989.

Vidament, M.; Dupere, A.M.; Julienne, P.; Evain, A.; Noue, P.; Palmer, E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology* 48, 907–917, 1997.