

# Problemas relacionados ao uso de sêmen refrigerado de garanhões

## Relating problem to cooled semen of stallion

Gustavo Mendes Gomes<sup>1</sup>, André Crespilho<sup>1,2</sup>, Leticia M. Gomes<sup>1</sup>.

**Como citar esse artigo.** Gomes GM, Crespilho A, Gomes LM. Problemas relacionados ao uso de sêmen refrigerado de garanhões. Revista Saúde. 2015 Jan./Jun.; 06 (1): 25-28.

### Resumo

Inúmeras biotecnologias se tornaram difundidas, sendo a inseminação artificial a mais utilizada na indústria equina. Pela necessidade em aumentar a longevidade dos espermatozoides e garantir altas taxas de fertilização, a tecnologia de refrigeração espermática tem sido amplamente estudada e utilizada comercialmente na produção de cavalos. No entanto, até o presente existem alguns pontos que impedem a difusão plena dessa biotecnologia, como os resultados inconstantes e as vezes insatisfatórios que ocorrem ao trabalhar com sêmen refrigerado. O objetivo deste trabalho foi revisar os pontos críticos relativos à utilização de sêmen refrigerado equino em programas de reprodução animal na espécie.

**Palavras-Chave:** Sêmen. Equino. Refrigeração.

### Abstract

Several biotechnologies become widespread and artificial insemination is the most used on horses. Aiming the increase in the sperm longevity with acceptable fertilization rates, sperm cooling technology has been widely studied and used commercially in the horse production. However, there are some critical points that hinder the diffusion of the biotechnology such as unsatisfying results when using cooled semen. The aim of this article was to review the critical points relating to the utilization of cooled stallion semen in equine breeding programs.

**Keywords:** Semen. Stallion. Cooled sperm.

### Introdução

A capacidade de preservar a viabilidade do sêmen pela refrigeração oferece muitas vantagens aos criadores de cavalos. A primeira está na possibilidade de coletar e processar o sêmen em um local e transportá-lo a diferentes localidades para inseminação de éguas. Com isso, se elimina o custo e o estresse associado ao envio de éguas até o garanhão, além da redução no risco de transmissão de doenças que poderiam afetar a égua recém-chegada. Entretanto, para que essa biotecnologia tenha sucesso o sêmen deve ser processado de forma adequada para garantir sua preservação (Jasko, 1994).

A tecnologia de sêmen refrigerado tem sido amplamente estudada pelo grande interesse na preservação e manutenção do potencial de fertilização do sêmen equino por períodos prolongados de tempo. Na verdade, quanto maior a longevidade e qualidade do sêmen refrigerado, mais fácil será a utilização e

transporte dessas amostras espermáticas (Batellieret al., 2001).

Entretanto, há uma variação considerável nas taxas de fertilização do sêmen equino transportado. Os diferentes fatores que podem influenciar nesses resultados incluem a fertilidade intrínseca do garanhão e da égua, a composição dos meios diluidores, a curva de refrigeração e temperatura de armazenamento do sêmen diluído, a dose inseminante (número de espermatozoides móveis), a sincronia entre a ovulação e o tempo de armazenamento in vitro do sêmen e a quantidade de plasma seminal presente (Jasko et al., 1991). Além disso, à medida que o tempo de armazenamento aumenta, a fertilidade do sêmen diminui (Pickett, 1995). Estudos anteriores demonstraram que a fertilidade do sêmen é muito reduzida quando o período de refrigeração é superior a 48 horas (Batellieret al., 2001).

O sucesso da preservação espermática pela refrigeração depende de fatores como ambiente

1. Universidade Severino Sombra, Curso de Medicina Veterinária, Vassouras-RJ, Brasil.

2. Universidade de Santo Amaro, Curso de Medicina Veterinária, São Paulo-SP, Brasil.

adequado (diluidores), taxa de refrigeração e temperatura favorável à manutenção espermática. Todos esses fatores atuam na prevenção dos danos à ultraestrutura dos espermatozoides e na ocorrência prematura do fenômeno de capacitação (Loomis, 1992). Dessa forma, nos tópicos abaixo encontram-se as principais dificuldades e fatores que podem influenciar a qualidade do sêmen equino submetido ao processo de refrigeração.

## **Modificações estruturais do espermatozoide**

A refrigeração do sêmen equino é necessária para que haja a diminuição do metabolismo celular para a sua estocagem por períodos prolongados de tempo (12-48 horas). Entretanto, a taxa de refrigeração e a temperatura de estocagem são consideradas os maiores determinantes da expressão e da extensão das injúrias a que as células são expostas durante o processamento (Watson *et al.*, 1987).

A exposição do sêmen a baixas temperaturas pode resultar em desarranjos morfológicos e bioquímicos que tornam os espermatozoides irreversivelmente imóveis e inférteis (Watson, 1981). Durante o processamento, as células espermáticas forem expostas a uma rápida mudança de temperatura podem ocorrer alterações conhecidas como choque frio ou cold shock (Watson *et al.*, 1987). Esse fenômeno se caracteriza por padrão anormal de movimento espermático, queda significativa de motilidade, danos ao acrossoma e membrana plasmática, redução de metabolismo e perda de componentes intracelulares (Amann & Graham, 1992). De acordo com Bailey *et al.*, (2000), espermatozoides mamíferos não sobrevivem quando submetidos a curvas de refrigeração muito intensas, havendo a perda da seletividade da membrana plasmática aos íons cálcio, queda de motilidade e morte celular, fenômenos relacionados ao choque frio. Dessa forma, curvas de refrigeração mais lentas, especialmente na fase mais crítica de temperatura que ocorre entre 19° e 8°C para a espécie equina, tem sido associadas a melhor preservação da viabilidade e fertilidade espermática (Batellier *et al.*, 2001).

## **Métodos de preservação do sêmen equino refrigerado**

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 (Ijaz & Ducharme, 1995). A refrigeração, estocagem e transporte do sêmen para uso em programas de inseminação artificial são de vital importância para o manejo reprodutivo de

diversas espécies (Miró *et al.*, 2009). Nesse contexto, quanto maior o tempo em que o sêmen equino possa ficar armazenado mantendo também a fertilidade, maior flexibilidade terá o proprietário do garanhão em coletar e enviar o sêmen, assim como o proprietário da égua para escolher os cruzamentos e sincronizar o momento da inseminação com a ovulação da fêmea (Pickett, 1992).

O sêmen equino deve ser diluído com um extensor ou diluidor para manter sua viabilidade durante a refrigeração. Ele fornece nutrientes para o metabolismo celular, tampões para a manutenção adequada do pH e também protege as membranas espermáticas do choque pelo frio. O diluidor também é composto por antibióticos que previnem o crescimento bacteriano durante a estocagem do sêmen (Jasko, 1994).

Os esforços para melhorar a conservação do sêmen refrigerado equino tem se concentrado na modificação de diluentes, bem como na adição de componentes específicos com intuito de manter a integridade de membrana, prevenir o estresse oxidativo e preservar a motilidade do espermatozoide (Samper, 2000). Dentro desse contexto, uma variedade de diluentes utilizando a combinação de diversos componentes (açúcares, eletrólitos, tampões, gema de ovo, leite, antioxidantes e adjuvantes) tem sido desenvolvidos nos últimos anos para a refrigeração do sêmen equino.

Nesse sentido, Macedo (2005) testou a adição de diferentes açúcares ao diluidor no intuito de identificar qual seria a associação mais benéfica para o sêmen equino quando refrigerado por longos períodos. Neste estudo comprovou-se que os açúcares glicose e suas associações com a lactose ou sacarose podem ser utilizados em diluidores à base de leite em pó, pois são igualmente eficazes na manutenção da qualidade espermática e integridade de membrana plasmática nas amostras refrigeradas a 5°C por até 96 horas. Neste mesmo estudo foram testados antibióticos nos diluidores à base de leite desnatado e concluiu-se que dentre as opções avaliadas o sulfato de amicacina não apresentou efeitos deletérios sobre as características de movimento espermático no sêmen refrigerado por até 96 horas.

Considerando a influência dos componentes dos diluidores sobre a viabilidade espermática sob baixas temperaturas, Crespilho *et al.*, (2013) avaliaram o efeito do pH (7,0 ou 6,6), do tampão (MES, BES ou HEPES) e da incorporação de colesterol ciclodextrina (CLC) ao diluente utilizado para a refrigeração de espermatozoides equinos a 5°C por 48 horas. Embora não tenham sido observadas diferenças para as células mantidas em diferentes faixas de pH, maior qualidade cinética e integridade de membrana plasmática foram observadas para amostras diluídas na presença do tampão BES e que receberam a incorporação de colesterol previamente ao início do processo de refrigeração.

O efeito benéfico do tratamento com CLC previamente à refrigeração do sêmen equino também

foi observado no estudo de Torres et al., (2006), que indicaram aumento da motilidade progressiva durante as primeiras 24 horas de refrigeração e aumento do número de espermatozoides viáveis quando as amostras foram refrigeradas por 48 a 72 horas na presença de colesterol. De acordo com Hartwig et al., (2014) a incorporação de 1,5 mg de colesterol para cada  $120 \times 10^6$  espermatozoides equinos levou ao aumento significativo das taxas de concepção utilizando sêmen refrigerado de cavalos com histórico prévio de baixa tolerância ao processo de refrigeração espermática (“badcoolers”), resultados que corroboram para a indicação do CLC como um dos mais promissores adjuvantes para incorporação aos diluidores de sêmen equino.

## Influência da curva de refrigeração e da temperatura de estocagem

A curva de refrigeração representa um fator crítico na preservação do sêmen equino para transporte e consequente manutenção da sua fertilidade (Pickett, 1992).

A refrigeração rápida pode causar danos irreversíveis aos espermatozoides. Já a refrigeração feita a uma taxa adequada torna possível o armazenamento do sêmen por períodos mais longos de tempo (Pickett, 1992).

Redução de temperatura sob taxas de  $-0,50\text{C}$  ou  $-0,30\text{C}$  por minuto são piores ( $p < 0,05$ ) que a taxa de  $-0,050\text{C}$  por minuto, considerando dados obtidos ao longo de 96 horas de armazenamento a  $50\text{C}$  (Kayser et al., 1992).

Quanto à temperatura de estocagem do sêmen, de acordo com Squires et al., (1999) se a inseminação ocorrer até 12 horas após a colheita, o sêmen pode ser armazenado a  $200\text{C}$  ou a  $50\text{C}$ , sem diferença significativa entre as duas faixas de temperatura de armazenamento. Para estocagem por tempo superior a 12 horas, o sêmen deve ser refrigerado lentamente até  $50\text{C}$ . Kayser e colaboradores (1992) demonstraram através de análise computadorizada do movimento espermático que a temperatura de  $50\text{C}$  foi superior à de  $200\text{C}$  após 24 horas de estocagem. Testando novos sistemas de manutenção espermática, Nunes et al., (2008) concluíram que mesmo utilizando temperaturas de estocagem ao redor de  $2^\circ\text{C}$  não ocorreram danos significativos ao movimento, integridade e fertilidade das células espermáticas de ganhões, sugerindo que temperaturas abaixo das convencionalmente preconizadas também podem ser utilizadas para o processamento do sêmen equino sob refrigeração.

De acordo com Love e colaboradores (2002) o DNA do espermatozoide equino sofre desnaturação em diferentes taxas dependendo da temperatura de estocagem e da fertilidade do ganhão. Considerando

todos os ganhões avaliados nesse mesmo estudo ( $n = 18$ ), o sêmen estocado a  $50\text{C}$  em diluente à base de leite não exibiu nenhuma alteração nas taxas de desnaturação do DNA ao longo de 46 horas de manutenção; entretanto o sêmen estocado a  $200\text{C}$  apresentou taxa moderada de desnaturação e a  $370\text{C}$  o maior índice de lesão de DNA. Dessa forma, pode-se concluir que o grau de fragmentação de cromatina é temperatura dependente, sendo observadas lesões mais intensas e significativas em amostras de sêmen mantidas sob temperatura mais elevada.

## Efeito do plasma seminal sobre o sêmen refrigerado

O sêmen é composto de células espermáticas e do plasma seminal que contém substâncias que são benéficas aos espermatozoides. Entretanto, o plasma não representa o meio ideal para refrigerar e armazenar as células espermáticas. De acordo com Brinskoet al., (2000), altas concentrações de plasma seminal são deletérias aos espermatozoides submetidos à refrigeração e armazenamento.

Os efeitos deletérios do plasma seminal podem ser reduzidos colhendo e diluindo somente a fração rica em espermatozoides do ejaculado ou pelo uso de altas taxas de diluições (acima de 3 partes de diluidor para uma parte de sêmen, v/v). O primeiro método é um tanto trabalhoso, além de reduzir o número total de espermatozoides colhidos num ejaculado. O segundo método é frequentemente utilizado para refrigeração e transporte de sêmen refrigerado; entretanto alguns ganhões não se beneficiam com esse procedimento, principalmente aqueles classificados como oligozoospermicos (Brinskoet al., 2000).

Uma alternativa para reduzir as concentrações de plasma seminal do ejaculado é a centrifugação do sêmen. De acordo com Jasko e colaboradores (1992) aproximadamente 5% de plasma seminal são necessários para manter a motilidade do sêmen refrigerado equino. De acordo com Macedo (2005), a centrifugação do sêmen ( $600\text{g}/10\text{ min.}$ ) para retirada do plasma seminal só apresentou benefícios quando o período de refrigeração foi superior a 24 horas. Resultados semelhantes também foram obtidos por Webbet al., (2009) que observaram maior motilidade total para amostras de sêmen equino refrigerado por até 72 hrs, independente do meio diluidor utilizado para o processamento.

## Conclusão

Embora a refrigeração espermática represente uma das biotécnicas mais difundidas para o processamento do sêmen equino em todo o Mundo, novos estudos se tornam necessários para garantir

uma melhor preservação da viabilidade e fertilidade espermática.

## Referências

- Amann, D. P.; Graham, J. K. Spermatozoalfunction. In: McKinnon AO, Voss JL (Ed.). Equine reproduction. Philadelphia: Lea &Febiger. p.715-745,1992.
- Bailey, J.L.; Bilodeaub, J.F. O.;Cormier, N.Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and3 Capacitating Phenomenon,Journal of Andrology.v.21, n.1, p.1-7, 2000.
- Batellier, F.; Vidament, M.;Fauquant, J.; Duchamp, G.; Arnaud, G.;Yvon, J.M.; Magistrini M. Advances in cooled semen technology. AnimReprodSci, v.68, p.181-190, 2001.
- Brinsko, S. P.; Crockett, E.C.; Squires, E.L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. Theriogenology, v.54, p.129-136, 2000.
- Crespilho, A. M.;Spizziri, B. E.; Meyers, M.; Graham, J. K. The Effect of Cholesterol Addition, Buffer, and pH on Equine Sperm Storedat 5°C. 7 Journal of Equine Veterinary Science. v.33,p.663-666, 2013.
- Hartwig, F. P.; Lisboa, F. P.;Hartwig, F. P.;Monteiro, G. A.;Maziero, R.R.D.;Freitas-Dell' Aqua, C. P.;Alvarenga,M. A.; Papa, F. O.;Dell' Aqua Jr, J.A. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: An alternative forbad cooler stallions. Theriogenology.v.81, p.340-346, 2014.
- Ijaz A.;Ducharme R. Effect of various extenders and taurine on survival of stallion sperm cooled to 5oC. Theriogenology, v.44, p.1039-1050, 1995.
- Jasko, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. ARS Veterinaria, v.10, p.156-165, 1994.
- Jasko, D. J.; Hathaway J. A.;Schaltenbrand, V. L.; Simper, W.D.; Squires, E.L. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. Theriogenology, v.37, p.1241-1252, 1992.
- Jasko, D.J., Moran, D.M., Farlin, M.E., Squires, E.L. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. Theriogenology, v.35, p.1059-1068, 1991.
- Kayser, J.P.;Amann, R. P.;Shideler, E. L.;Jasko, D.J.; Pickett, B.W. Effect of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. Theriogenology, v.38, p.601-614, 1992.
- Loomis, P.R.Factors affecting the success of artificial insemination with cooled, transported semen. Proc Am AssocEquine Practit, v.39, p.629-647, 1992.
- Love, C.C.; Thompson J.A.; Lowry, V. K.; Varner D. D. Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. Theriogenology, v.57, p.1135-1142, 2002.
- Macedo, L.P. Efeito de diferentes diluentes e antibióticos sobre a longevidade e fertilidade do sêmen eqüino refrigerado a 5oC. Dissertação de MestradoemMedicinaVeterinária. UNESP/BOTUCATU, 2005.
- Miró, J.; Taberner, E.; Rivera, M.; Penã, A.; Medrano, A.; Rigau, T.; Penãlba, A. Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoaand the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalanian donkey sêmen. Theriogenology. v.72, p.1017-1022, 2009.
- Nunes, D. B.; Zorzatto, J. R.; Costa e Silva, E. V.; Zúccari, C. E. S. N. Efficiency of short-term storage of equine semen in a simple-design cooling system. Animal Reproduction Science.v.104,p.434-439, 2008.
- Pickett, B.W. The stallion: Retrospective analysis and opinions. BiolReprod Mono, n.1, p.547-564, 1995.
- Pickett, B. W.Seminal extenders and cooled semen. In: McKinnon AO, Voss JL (Ed.). Equine reproduction. Philadelphia: Lea &Febiger, p.715-745, 1992.
- Samper, J.C.;Vidament, M.;Katila, T.;Newcombe, J.; Estrada, A.;Sargeant, J. Analysis of some factors associated with pregnancy rates of frozen semen: a multi-center study. Theriogenology, v.58, p.647-650,2002.
- Samper, J.C. Artificial insemination. Philadelphia: W.B. Saunders, p.109-131, 2000.
- Squires, E. L.; Pickett, B. W.; Graham, J. K.;Vanderwall, D. K.; McCue, P.M.;Bruemmer, J.E. Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University (Bulletin, 9).1999.
- Torres, P.; Serres, C.; Gómez-Cúetara, C.; Santiago, I.; Mateos, E.; Álvarez, A.L. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin onmotility and plasma membrane integrityof cooled stallion sperm. Animal Reproduction Science.v.94,p.148-151, 2006.
- Watson, P. E.; Plummer, J.M.; Allen W.E. Quantitative assessment of membrane damage in cold-shocked spermatozoa of stallions. J ReprodFertilSuppl, v.35, p.651-653,1987.
- Watson, P.F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5oC by egg-yolk lipoprotein. JReprodFertil, v.62, p.483-492, 1981.
- Webb, G. W.;Dean, M. M.;Humes, R. A.;Heywoodh, J.S. A Comparison of the Ability of Three Commercially Available Diluents to Maintain the Motility of Cold Stored Stallion Semen. Journal of Equine Veterinary Science. v.29, p.229-232, 2009.