

## ANÁLISE DE PARÂMETROS DE SÊMEN RESFRIADO DE GARANHÕES DA RAÇA CRIOLA

**SEGABINAZZI, Lorenzo.<sup>1</sup>; ANTUNEZ, Lucas<sup>1</sup>; HARTWIG, Felipe. Pires.<sup>1</sup>; LISBOA, Fernando Paixão<sup>1</sup>; CURCIO, Bruna da Rosa.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Acadêmico de Medicina Veterinária – UFPel. [lgseg@hotmail.com](mailto:lgseg@hotmail.com)

<sup>2</sup>Professor Adjunto da Faculdade de Veterinária – UFPel. [curciobruna@hotmail.com](mailto:curciobruna@hotmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A espécie equina em relação às outras espécies domésticas possui os menores índices de fertilidade. É evidente que essa situação é incrementada pelo fato dos equinos não serem selecionados por aspectos de fertilidade e sim pelo desempenho em competições.

Para que um programa reprodutivo seja bem sucedido, o garanhão deve estar em plenas condições de produzir sêmen com viabilidade espermática, ou seja, que possua espermatozóides com capacidade de fecundar o oócito. Para isso é necessária a funcionalidade estrutural e bioquímica da célula desde a sua formação até a maturação, cujo processo é denominado espermatogênese (JOHNSON, 2000). O processo de maturação dos espermatozóides depende de uma sequência de modificações espermáticas resultantes da interação da superfície do espermatozóide com diferentes fluídos intraluminais (RODRIGUEZ, 2001). Muitas das células produzidas são defeituosas e são eliminadas por apoptose e fagocitose pelas células de Sertoli, enquanto outras são eliminadas no ejaculado (HENINGER, 2004).

Defeitos morfológicos como destacamento de cabeça, cabeças anormais, peças intermediárias anormais, caudas enroladas e células germinativas prematuras ou células redondas estão associados com baixa fertilidade (LOVE, 2000).

Com o passar dos anos, a utilização do sêmen equino resfriado é crescente e sua tecnologia vem sendo aprimorada. Um dos motivos pelos quais a utilização do sêmen equino resfriado é alta, é proporção de indivíduos que não suportam satisfatoriamente o processo de criopreservação (Vidament et al., 1997).

Os espermatozóides dos garanhões podem ser classificados como de alta qualidade ou baixa qualidade de acordo com a resistência frente à refrigeração (Brinsko et al., 2000).

Os garanhões com sêmen de baixa qualidade apresentam redução superior a 40% da motilidade progressiva inicial após 24 horas de armazenamento. Esse fato não depende somente da qualidade da natureza do sêmen, mas também da composição do plasma seminal e da membrana celular (Aurich, 2005). A sensibilidade do ejaculado de alguns indivíduos para o resfriamento e transporte pode ser tanta, que o transporte desse material genético não é possível de ser realizado.

O objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros seminais de garanhões da raça crioula após o resfriamento a 15°C e transporte de sêmen.

### 2. METODOLOGIA

Foram utilizados dois garanhões da raça crioula, com idade de 4 e 2,5 anos respectivamente (ganhão A e B), clinicamente saudáveis e sexualmente ativos. Durante a temporada reprodutiva 2009/2010 foram avaliados oito ejaculados de cada um dos garanhões.

Após a coleta as amostras de sêmen foram diluídas no diluente comercial Botu-Sêmen® na fração 3:1 (diluente:sêmen) e acondicionadas em recipiente comercial para resfriamento e transporte de sêmen a 15°C. O sêmen foi mantido no recipiente por no mínimo 4 horas antes do início das análises para que a curva de resfriamento fosse completa.

Os parâmetros seminais analisados foram: volume da fração livre de gel do ejaculado, motilidade, vigor, concentração espermática, número total de células por ejaculado, morfologia e integridade de membrana plasmática.

As avaliações de vigor e motilidade foram realizadas por microscopia óptica. A concentração espermática foi realizada por contagem em câmara de Neubauer. A morfologia espermática foi analisada em microscopia óptica através de lâmina corada através da técnica de Ceróvsky.

A avaliação da integridade membrana plasmática foi realizada pelo teste em solução hiposmótica. O qual consistiu na contagem da porcentagem de espermatozoides com cauda dobrada (contagem de 200 esptz.), após a incubação por 30min de 100µl de sêmen em 1ml de Solução a 100µOsm

Para avaliação estatística foi utilizada análise de variância, com comparação entre médias através do teste LSD, através do software STATISTIX®.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A descrição dos parâmetros avaliados de sêmen resfriado dos garanhões A e B estão descritos na Tabela 1 e as médias correspondentes aos defeitos de morfologia espermática encontrados estão descritas na Tabela 2.

Tabela 1. Média dos parâmetros de sêmen resfriado em Garanhões da Raça Crioula:

<i>Parâmetros Seminais</i>	<i>Ganhão A</i>	<i>Ganhão B</i>
Volume livre gel (ml)	20,5 <sup>a</sup>	31,2 <sup>a</sup>
Motilidade (%)	87 <sup>a</sup>	62 <sup>b</sup>
Vigor	4 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>
Morfologia espermática (% normais)	75 <sup>a</sup>	73 <sup>a</sup>
Integridade de membrana (%)	56,3 <sup>a</sup>	51,5 <sup>a</sup>
Concentração estz./ml (x10 <sup>6</sup> )	220 <sup>a</sup>	113 <sup>b</sup>
Total estz. (x10 <sup>9</sup> )	4,5 <sup>a</sup>	3,52 <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> Valores com letras diferentes nas linhas representam diferença significativa entre os garanhões (P<0,05).

Quando se avalia a morfologia espermática, garanhões sadios apresentam média de 54% de espermatozoides normais, enquanto indivíduos subfêrteis apresentam média de 37% de células normais (PICKETT *et al*, 1989). Ambos garanhões acompanhados no presente estudo apresentam morfologia espermática característica de indivíduos saudáveis.

De acordo com estes resultados as médias de motilidade diferiram entre os garanhões (P<0,05), quando se avalia a relação com os outros parâmetros

espermáticos, observa-se que garanhões com maiores taxas de defeitos morfológicos possuem menores taxas de motilidade e vigor.

Tabela 2. Defeitos de morfologia espermática identificados em Garanhões da Raça Crioula:

Garanhão	Cabeça Anormal	Cauda Dobrada	Cauda Enrolada	Gota Proximal	Cabeça Isolada Normal
A	0,8%	14,4%	2,9%	1%	5%
B	1,3%	7%	4%	1,9%	3,3%

O teste hiposmótico é utilizado para avaliar a integridade funcional da membrana plasmática, podendo ser utilizado quando não for possível a execução das avaliações de fluorescência. Possuindo ainda a vantagem do baixo custo, por necessitar apenas do microscópio óptico para sua execução. O espermatozóide que possuir a membrana ativa bioquimicamente irá sofrer a expansão em resposta ao estresse osmótico, devido ao influxo de água. Esse teste demonstra a integridade da membrana testando a função osmorregulatória das células (SIEME, 2009). Em estudos de fertilização *in vivo* foi observado que ejaculados que foram capazes de fertilizar o oócito, possuíam pelo menos 60% de células reativas ao teste hiposmótico (JEYENDRAN, 1992).

A integridade de membrana avaliada no Teste Hiposmótico foi de 56,25 % para o garanhão A e 51,5 % para o garanhão B ( $P > 0,05$ ). Quando compara-se a relação entre motilidade e integridade de membrana espermática não há uma similaridade. O que demonstra a subjetividade da avaliação única da motilidade espermática como indicativo de viabilidade celular. O que permite contestar a eficácia da avaliação do total de espermatozóides viáveis no ejaculado baseado apenas no índice de motilidade da amostra.

Existem poucos dados relativos a características seminais e fertilidade de garanhões da raça crioula. Em 2001, foram definidos por SUÑE os parâmetros espermáticos: volume livre de gel de 63 ml, concentração espermática/ml de  $101 \times 10^6$ , índice de espermatozóides morfolologicamente normais de 69% e número total de espermatozóides de  $6,1 \times 10^9$ . Este mesmo autor detectou que garanhões com mais de 70% de espermatozóides morfolologicamente normais apresentaram taxas de prenhez superiores aos que apresentaram índices de células normais  $\leq 70\%$ . Porém não foram realizadas avaliações de integridade de membrana.

A concentração espermática média do garanhão A foi de  $220 \times 10^6$  estz/ml e de  $113 \times 10^6$  estz/ml para o garanhão B ( $p < 0,05$ ) e o número total médio de células por ejaculado foi de  $4,51 \times 10^9$  para o garanhão A e  $3,52 \times 10^9$  bilhões para o garanhão B ( $p > 0,05$ ).

#### 4. CONCLUSÃO

A avaliação do sêmen após o resfriamento é de suma importância na determinação da viabilidade espermática e das alterações do sêmen submetido ao resfriamento.

Consideramos, a partir dos resultados do presente estudo, que as técnicas utilizadas foram eficientes para a avaliação dos parâmetros seminais e viabilidade espermática de ejaculados resfriados a 15°C em garanhões da raça crioula.

## 5. REFERÊNCIAS

- AURICH C., 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 89, 65-75.
- BRINSKO, S.P., CROCKETT, E.C., SQUIRES, E.L., 2000. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*. 54, 129-136.
- HENINGER, N.L.; STAUB, C.; BLANCHARD, T.L.; JOHNSON, L.; VARNER, D.D.; FORREST, D.W. Germ cell apoptosis in the testis of normal stallions. **Theriogenology**, v.62, p.283-297, 2004.
- JEYENDRAN, R.S. et al. The hipoosmotic swelling test: na update. **Arch. Androl.** Vol. 29. p. 105 – 116. 1992.
- JOHNSON, L.; VARNER, D.D.; ROBERTS, M.E.; SMITH, T.L.; KEILLOR, G.E.; SCRUTCHFIELD, W.L. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Theriogenology**, v.60, p.471-480, 2000.
- LOVE, C.C., VARNER, D.D., TOMPHSON, J.A. Intra and inter stallion variation in sperm morphology and their relationship with fertility. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** Vol. 56. p. 93 – 100. 2000.
- PICKETT, B.W., AMANN, R.P., MCKINNON, A.O., SQUIRES, E.L., VOSS, J.L. Management of the stallion for maximum reproductive efficiency II, Bulletin of Colorado States University, 1989, 126p.
- RODRIGUEZ, C.M.; KIRBY, J.L.; HINTON, B.T. Regulation of gene transcription in the epididymis. **Reproduction**, v.122, p.41-48, 2001.
- SIEME, H. Semen evaluation. In: **Equine Breeding management and artificial insemination**. Second edition. Saunders Elsevier. 6, 57-74. 2009.
- SUÑÉ, A. I. C. P. **Características seminais de eqüinos da Raça Crioula e fertilidade**. 2001. Dissertação de mestrado em Medicina Veterinária – UFPel.
- VIDAMENT, M., DUPREE, A.M., JULIENNE, P., EVIAN, A., NOUE, P., PALMER, E., 1997. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology*, 48, 907–917.