



Técnicas para incremento da qualidade do sêmen de garanhões

Techniques used to improve stallion semen quality

Marco Antonio Alvarenga¹, Frederico Ozanam Papa, Carlos Ramires Neto

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus Botucatu, Brasil

¹Correspondência: malvarenga@fmvz.unesp.br

Resumo

A seleção dos reprodutores equinos, em sua grande maioria, não é baseada nas características reprodutivas dos animais e sim em sua aptidão esportiva e ou características fenotípicas. Destaca-se ainda o fato de que muitos garanhões idosos permanecem em atividade reprodutiva, conseqüentemente muitos indivíduos tem a função reprodutiva comprometida por um ou outro fator ou pela associação de ambos. Assim, diversas técnicas vêm sendo desenvolvidas com a finalidade de aumentar a qualidade e fertilidade do sêmen de garanhões. O objetivo do presente artigo visa revisar as principais técnicas que vem sendo utilizadas em andrologia equina para fins de melhoria da qualidade e fertilidade do sêmen de reprodutores equinos.

Palavras chave: garanhão, sêmen, preservação.

Abstract

Stallions are select based their sport ability and not fertility. Also a large population of horses in reproductive activity are considered old, consequently both factors, isolated or combined, increase the number of sires with a compromise in fertility. Several techniques and strategies have been developed aiming to improve stallion semen quality and fertility. The goal of this paper was to review the most important techniques that can be used to increase de quality and fertility of stallion semen.

Key words: Stallion, semen, preservation.

Introdução

Na espécie equina a seleção dos reprodutores não é realizada baseada nas características reprodutivas, mas através de fatores fenotípicos e performance atlética. A isto associado AO fato de que muitos reprodutores com idade avançada (>18 anos) permanecem em atividade reprodutiva. Existindo conseqüentemente a necessidade de se utilizar estratégias para aumentar a qualidade do sêmen e fertilidade destes animais (Brinsko et al., 2007).

Acredita-se que muitos fatores podem interferir na qualidade e resistência a criopreservação do sêmen de garanhões, destacando-se principalmente os fatores genéticos e relacionados à composição da membrana plasmática espermática, fazendo com que esta esteja mais ou menos susceptível aos desafios e danos provocados pelo processo (Ramires et al., 2016).

Em estudo realizado por Alvarenga et al. (1996) ficou demonstrado que garanhões das raças germânicas de hipismo e cavalos da raça Quarto de milha possuem melhores parâmetros espermáticos após a congelação do sêmen que os de outras raças, sendo especialmente mais sensíveis ao processo de congelação os da raça Brasileira Mangalarga Marchador e cavalos de origem ibérica.

Em trabalho recente desenvolvido por nosso grupo observamos que existem diferenças marcantes na composição de lipídeos de membrana entre cavalos que resistem e não resistem ao processo de preservação de sêmen (Ramires et al., 2016). Durante o processo criopreservação espermática pode ocorrer rupturas da membrana plasmática, ocasionando perda da viabilidade destes espermatozoides (White, 1993). Fosfolípidos e colesterol, que compõem a membrana plasmática, são importantes para a manutenção de sua integridade estrutural e fluidez. Sabe-se em outras espécies que a composição dos ácidos graxos e a proporção dos lipídios que compõem a membrana plasmática dos espermatozoides está diretamente relacionada à sua resistência à criopreservação (Garcia et al., 2011).

Monteiro (2013) demonstrou em garanhões sub-férteis que os espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo, os quais conseqüentemente não tiveram contato prévio com secreções das glândulas acessórias, possuem maior qualidade e fertilidade quando comparados com o do ejaculado, demonstrando desta forma o efeito deletério das secreções das glândulas acessórias sobre a viabilidade espermática nestes animais.

Técnicas para melhorar a qualidade e fertilidade sêmen de garanhões

Remoção do plasma seminal

O plasma seminal é conjunto de fluidos produzidos pela rede testis, epidídimo e glândulas acessórias, que é expelido em frações durante a ejaculação e tem a função de transportar e fornecer substratos metabólicos para os espermatozoides além de participar do processo de maturação espermática (Brinsko, et al 2007). Este é composto por substâncias protetoras e estimuladoras das células espermáticas (Squires et. al., 1999), contudo devido a sua composição variável entre os reprodutores (Almeida, 2006), o plasma seminal pode ser benéfico ou deletério à qualidade espermática (Jasko et al., 1992). Também estão presentes no plasma seminal determinadas proteínas que se ligam a membrana espermática que podem desestabilizar a membrana plasmática. Com isso, algumas vezes é necessário removê-lo para aumentar o tempo de viabilidade do sêmen refrigerado (Brinsko et. al., 2000). Estudos realizados por Brinsko et al. (2000) e Ramires-Neto et al. (2013) demonstram que em garanhões com baixa resistência espermática à refrigeração (“Bad cooler stallions”) quando se remove o plasma seminal, há uma aumento da qualidade seminal após a refrigeração.

Existem diversas técnicas para concentrar espermatozoides do ejaculado de garanhões, entretanto a mais comumente utilizada é a centrifugação. Efeitos deletérios podem ser induzidos pela centrifugação uma vez que a força e tempo de centrifugação podem interferir negativamente na motilidade, integridade e taxa de recuperação espermática (Sieme et al., 2003).

A remoção do plasma seminal convencionalmente é realizada através da centrifugação onde ao sêmen deve ser acrescido diluente a base de leite desnatado na proporção 1:1 (v/v). Posteriormente, realiza-se o processo de centrifugação. A intersecção entre tempo e força de centrifugação que apresenta maior taxa de recuperação espermática com maior porcentagem de espermatozoides íntegros é 600 x g durante 10 minutos (Dell’acqua et al., 2001). Posteriormente a centrifugação, o sobrenadante deve ser desprezado utilizando um cateter acoplado a uma seringa ou uma bomba de vácuo e o pellet ressuspendido com o meio extensor desejado. Sempre que houver uma compactação muito grande do pellet de espermatozoides deve-se diminuir nas coletas futuras a força de centrifugação ou utilizar de outras técnicas como a filtração e o *cushion* visando minimizar o excessivo empacotamento dos espermatozoides.

Uma alternativa para remover plasma seminal do ejaculado é a centrifugação com uma substância coloidal denominada *cushion* (Minitube, Brasil). Este método visa maximizar a recuperação de espermatozoides de sêmen centrifugado de garanhões pois utiliza forças de centrifugação elevadas (900 a 1000 x g) o *cushion* no fundo do tubo de centrifuga funciona como uma almofada que reduz o dano mecânico para a célula espermática (Ecot et al., 2005; Knop et al., 2005; Sieme et al., 2005)

Para realizar a remoção do plasma seminal utilizando centrifugação com *cushion*, o sêmen deve ser diluído na proporção 1:1 (v/v) com meio diluente a base de leite desnatado e armazenado em um tubo de 50 mL. Deve-se depositar cuidadosamente 1 mL de *cushion* no fundo do tubo de centrifuga, utilizando uma cateter acoplado a uma seringa. Realiza-se centrifugação a 1000 x g durante 20 minutos. o sobrenadante deve ser cuidadosamente removido através da aspiração com um cateter acoplado a uma seringa ou um equipamento de aspiração. Após, remove-se cuidadosamente também a solução de *cushion* utilizando um cateter acoplado a uma seringa e ressuspende-se o pellet com o meio extensor desejado. Visando também reduzir estes danos aos espermatozoides decorrentes da técnica de remoção do plasma seminal, pode-se utilizar um filtro composto por membrana hidrofílica sintética (Sperm Filter®, Botupharma, Brasil) com poros de 2µm que retêm os espermatozoides, possibilitando a passagem somente do plasma seminal (Ramires Neto et al., 2013).

O sêmen também diluído com meio diluidor á base de leite desnatado (2 partes de sêmen para 1 parte de diluente) é depositado sobre a membrana e deve-se realizar movimentos leves tocando-a em uma placa de petri. Desta maneira, devido ao tamanho dos poros e à capilaridade, o plasma seminal passa através do filtro e os espermatozoides ficam retidos na membrana. Posteriormente acrescenta-se o meio extensor ao filtro no volume previamente calculado e realiza-se homogeneização para ressuspenção dos espermatozoides. O processo dura em média de 5 minutos e o filtro pode ser usado por pelo menos 20 vezes.

Seleção espermática

As técnicas de seleção espermática visam melhorar a qualidade do sêmen fresco, refrigerado ou congelado de garanhões através da separação dos espermatozoides com motilidade progressiva bem como morfológicamente normais (Macpherson et al., 2001) e para isso utiliza-se a centrifugação em gradientes de densidade. Esta técnica possuiu grande potencial para melhorar o aproveitamento reprodutivo, principalmente de garanhões subfêrteis (Leão, 2001). A seleção em gradiente de Percoll é uma das técnicas mais utilizadas para centrifugação de células, vírus e partículas subcelulares (Samardzija et al., 2006) do sêmen, contudo a taxa de recuperação de células é baixa (Leão et al., 2001).

Mais recentemente um gradiente de densidade para seleção de espermatozoides, utilizando um colóide composto por partículas de sílica recobertas com silane permitiu aumentar a taxa de recuperação espermática

(Ramires Neto et al., 2013). Existindo comercialmente 2 produtos para Equinos (Equipure e Androcoll). Ao testar este gradiente em garanhões Macpherson et al. (2001) demonstraram a eficiência deste método para separar células com motilidade adequada e morfológicamente normais do sêmen refrigerado. Ramires-Neto et al. (2013) também observaram que a utilização da seleção espermática com colóide composto por partículas de sílica recobertas com silane denominado comercialmente de Equipure aumentou a resistência espermática à refrigeração.

Papa et al. (2012) ao testarem este colóide antes da congelação de sêmen equino observaram aumento significativo dos parâmetros de cinética espermática tanto após a seleção espermática quanto após a descongelação do sêmen que foi previamente selecionado.

Stoll et al. (2013) observaram melhora dos parâmetros espermáticos com a seleção espermática realizada após a descongelação, entretanto neste caso a recuperação espermática foi extremamente baixa. Contudo temos obtido em nosso laboratório melhora da fertilidade o uso do Equipure após o descongelamento de sêmen de baixa fertilidade onde 4 palhetas (2 mL) são gentilmente adicionados a um tubo de centrifuga contendo 2 mL de Equipure e submetidas a uma força de centrifugação de 300 x g/20 minutos (Soares, R. Dados não publicados).

Importante ressaltar que alguns fatores são fundamentais para que o protocolo funcione adequadamente, como utilizar centrifugas de com braços articuláveis e que tenham pelo menos a graduação de RPM para que se possa utilizar a força de centrifugação adequada em g.

Para realizar a seleção espermática com o gradiente de densidade, um total de 1×10^9 espermatozoides devem ser concentrados em 5 mL de diluente comercial à base de leite desnatado, para isso pode-se utilizar a centrifugação convencional, a centrifugação com *cushion* (Minitube, Alemanha) ou a filtração em SpermFilter (Botupharma, Brasil). Após isso, 5 mL do gradiente de densidade (Equipure) deve ser adicionado em um tubo de 15 mL. Os 5 mL com o sêmen concentrado deve ser cuidadosamente adicionado neste mesmo tubo, acima do gradiente de densidade. Para isso, pode-se utilizar um pipeta tipo *pasteur*, deslizando vagarosamente o sêmen através das paredes do tubo. É realizada uma centrifugação de 300 a 400 x g por 20 minutos e após isso os espermatozoides sem alterações morfológicas e com motilidade progressiva ficam depositados no fundo do tubo. O restante do ejaculado fica retido acima do gradiente de densidade. Com o auxílio de uma pipeta de 1mL, deve-se remover o *pellet* com os espermatozoides selecionados e diluí-lo com o meio apropriado. Espera-se uma perda de 40 a 60% do total de células durante após a seleção.

Meios diluente especiais

Meios diluentes possuem vários componentes básicos que atuam na manutenção da atividade metabólica dos espermatozoides, estabilização da membrana plasmática mediante o equilíbrio do pH do meio, proteção contra o choque térmico, manutenção do equilíbrio eletrolítico e osmótico, inibição do crescimento bacteriano, fornecimento de energia (Fürst, 2006; Lorenzoni, 2010).

Nas pesquisas com meios diluentes para refrigeração do sêmen equino, um fator que tem se destacado é a incorporação de colesterol na membrana plasmática dos espermatozoides através do complexo de inclusão com ciclodextrina. Há na literatura relatos que bactérias com menor teor de colesterol na membrana apresentam uma pequena tolerância a baixas temperaturas (White, 1993). Combes et al. (2000) incorporando colesterol à membrana plasmática de espermatozoides equinos, obtiveram melhora da cinética espermática e integridade de membrana. Realizando estudo semelhante, Hartwing et al. (2013) observaram aumento da qualidade e fertilidade do sêmen de garanhões após a refrigeração à 5°C por 24 h quando utilizou meio diluente a base de leite desnatado acrescido do complexo de colesterol e ciclodextrina, sendo estas diferenças mais significativas também em garanhões com baixa resistência espermática à refrigeração.

Mais recentemente tem sido proposto o uso da caseína em diluentes para refrigeração por esta atuar de alguma forma impedindo a ação das proteínas do plasma seminal que podem desestabilizar a membrana existindo no mercado dois diluentes comerciais contendo caseína (INRA 96 e Botu sêmen GOLD).

Nos meios diluentes de congelação, um dos principais componentes são os crioprotetores. Estas substâncias ligam-se à água modificando seu ponto de fusão, removendo assim os núcleos de cristalização e diminuem a faixa crítica de temperatura na qual se formam os cristais responsáveis pela crioinjúria. Os crioprotetores podem ser classificados de duas formas: penetrantes ou não penetrantes.

Os crioprotetores penetrantes mais utilizados em equinos são: glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfoxido e amidas (Squires et al., 2004; Alvarenga et al., 2005). A associação das amidas e glicerol no diluente de congelação demonstrou maior proteção aos espermatozoides de garanhões, principalmente sobre a cinética espermática após a descongelação, quando comparado ao diluente apenas com glicerol. Especula-se que a menor viscosidade das amidas associado a seu menor peso molecular favorece a permeabilidade destes compostos à membrana plasmática diminuindo o stress osmótico melhorando desta forma a preservação das células espermáticas durante o processo de criopreservação com consequente incremento da fertilidade (Alvarenga et al., 2005).

Pode se verificar através da presente revisão que ao longo dos últimos anos diferentes técnicas e



procedimentos propiciaram incrementar a qualidade e conseqüente fertilidade de sêmen de garanhões, contudo cabe ao Médico Veterinário determinar a melhor forma de atuar perante a um problema específico bem como utiliza las de forma adequada para que se obtenha o resultado desejado.

Referências

- Almeida JL.** Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino. 2006. 16p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.
- Alvarenga MA, Papa FO, Buratini Jr J.** The effect of breeds spermatoc parameters over equine sêmen freezability. In: Symposium on Stallion Semen. Proceedings... Amersfoort, p.82, 1996.
- Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros ASL.** Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Anim Reprod Sci*, v.89, p.105-113, 2005.
- Brinsko SP, Crockett EC, Squires EL.** Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*, p.54, v.129-136, 2000.
- Brinsko SP, Love CC, Bauer JE, Macpherson ML, Varner DD.** Cholesterol-to-phospholipid ratio in whole sperm and seminal plasma from fertile stallions and stallions with unexplained subfertility. *Anim Reprod Sci*, Amsterdam, v.99, p.65-71, 2007.
- Combes GB, Varner DD, Schroeder F, Burghardt RC, Blanchard TL.** Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. *J ReprodFertSuppl*, v.56, p.127-32, 2000.
- Dell'aqua JA, Papa FO, Alvarenga MA, Zahn FS.** Effect of centrifugation and packing system on sperm parameters of equine frozen semen. *Anim Reprod Sci*, v.68, p.324-325, 2001.
- Ecot P, Decuadro-Hansen G, Delhomme G, Vidament M.** Evaluation of cushioned centrifugation technique for processing equine semen for freezing. *Anim Reprod Sci*, v.89, p.245-248, 2005.
- Fürst R.** Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen equino. 2006. 96f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.
- Garcia BM, Fernandez LG, Ferrusola CO, Bolanos JMG, Martinez HR, Tapia JA, Morcuende D, Pena FJ.** Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.75, p.811-818, 2011.
- Hartwig FP, Lisboa FP, Hartwig FP, Monteiro GA, Maziero RR, Freitas-Dell'Aqua CP, Alvarenga MA, Papa FO, Dell'Aqua JA Jr.** Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: an alternative for bad cooler stallions. *Theriogenology*, v.81, p.340-346, 2013.
- Jasko DJ, Hathaway JA, Schaltenbrand VL, Simper WD, Squires EL.** Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.37, p.1241-1252, 1992.
- Kareskoski M, Katila T.** Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Anim Reprod Sci*, v.107, p.249-256, 2008.
- Knop K, Hoffmann N, Rath D, Sieme H.** Effects of cushioned centrifugation technique on sperm recovery and sperm quality in stallions with good and poor semen freezability, *Anim Reprod Sci*, v.89, p.294-297, 2005.
- Leão KM.** Inseminação artificial por endoscopia com número reduzido de espermatozóides utilizando sêmen fresco e congelado de garanhões. 2002, 105f. Tese (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2001.
- Lorenzoni SRG.** Criopreservação de sêmen equino emvasado em criotubo. 2010. 65f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2010.
- Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, JL.** Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, v.57, p.327-344, 2002.
- Monteiro GA.** Criopreservação e fertilidade de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo de garanhões subfêrteis. 2013. 120f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Estado de São Paulo, Botucatu, 2013.
- Papa PM, Maziero RRD, Hartwig FP, Lisboa FP, Dellaqua, JA, Alvarenga MA, Guasti PN, Landim-Alvarenga FC, Papa FO.** Effect of density gradient on sperm parameters os stallion frozen semen. *J Equi Vet Sci*, v.32, p.505, 2012. Abstract.
- Ramires Neto, Papa FO, Alvarenga MA.** Plasma membrane lipid profile from resistant and sensitive spermatozoa of Mangalarga Marchador stallions after cooling at 5°C. *J Equine Vet Sci*, v.43, p.S76-S77, 2016.
- Ramires Neto C, Monteiro G A, Soares RF, Pedrazzi C, Dell'aqua JA, Papa FO, Castro- Chaves MMB, Alvarenga MA.** New seminal plasma removal method for freezing stallion semen. *Theriogenology*, v.79, p.1120-1123, 2013.
- Ramires Neto C, Monteiro GA, Soares RF, Pedrazzi C, Dell'aqua JA, Papa FO, Alvarenga MA.** Effect of removing seminal plasma using a sperm filter on the viability of refrigerated stallion semen. *J Equine Vet Sci*, v.33, p.40-43, 2012.
- Samardzija M, Karadjole; Matkovic M, Cergolj M, Getz I, Dobranic T, Tomaskovic A, Petric J, Surina**



- J,Grizelj J, Karadjole TA.** Comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVF. *Anim Reprod Sci*, v.91,p.237-247, 2006.
- Sieme H, Martinsson G, Rauterberg H, Walter K, Aurich C, Petzold R, Klug E.** Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen, *Reprod Domest Anim*, v.38, p.134-140, 2003.
- Sieme H, Knop K, Rath D.** Effects of duration, force of centrifugation and cushioned centrifugation technique on sperm recovery and sperm quality in stallions with good and poor semen freezability. *Havemeyer Foundation Mono Series*,v.18, p.6-9, 2005.
- Squires EL, Pickett BW, Graham JK, Vanderwall DK, McCue PM and Bruemmer JE.** Principles of cryopreservation. In: *Cooled and frozen stallion semen*. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory. Colorado State University. pp.9, 1999.
- Squires EL, Keith SL, Graham JK.** Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.62, p.1056-1065, 2004.
- Stoll A, Love CC, Ball BA.** Use of a Single-Layer Density Centrifugation Method Enhances Sperm Quality in Cryopreserved–Thawed Equine Spermatozoa. *J Equine Vet Sci*, v.33, p.547-551, 2013.
- White IG.** Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold-shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev*, v.5, p.639-58, 1993.
-