

## Avaliação de fertilidade do sêmen congelado do garanhão

*In vitro* evaluation of frozen-thawed stallion semen

**Rodrigo Arruda de Oliveira**

Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV/UnB)  
Laboratório de Reprodução Animal (ReproequiUnB)  
E-mail: rodrigoarruda@unb.br

### Resumo

Para se avaliar a fertilidade do sêmen equino criopreservado é necessário ampliar o conhecimento sobre a fisiologia da célula espermática e sobre os testes utilizados para avaliar a viabilidade dos espermatozoides após a descongelação, pois os danos causados pela criopreservação comprometem funções celulares e, conseqüentemente, reduzem a fertilidade. Nenhum teste laboratorial isolado pode estimar o potencial de fertilidade do sêmen, mas em conjunto, permitem excluir partidas e animais que apresentarão baixa fertilidade. Até que a ciência evolua a ponto de desenvolver uma ou mais técnicas que sejam marcadores confiáveis de fertilidade, a taxa de prenhez pós-inseminação é a única forma de se conhecer o potencial de fertilidade do sêmen.

**Palavras-chave:** andrológico, equino, espermatozoide, infertilidade.

### Abstract

*To assess the fertility of cryopreserved equine semen, it is necessary to expand our understanding of sperm cell physiology and of the assays used to evaluate sperm quality after thawing, because the damage caused by cryopreservation impairs cellular functions and consequently reduces fertility. No single laboratory test can predict the fertility potential of a semen sample, but used together they probably allow the exclusion of ejaculates and animals that will exhibit low fertility. Until science advances to develop one or more techniques that are reliable markers of fertility, post-insemination pregnancy rate remains the only way to determine the fertilising potential of semen.*

**Keywords:** andrology, equine, infertility, spermatozoon.

### Introdução

A adoção de biotécnicas cada vez mais modernas tem impulsionado o avanço da reprodução animal (Oliveira et al., 2024), especialmente em equinos, que apresentam variação nas características de fertilidade seminal entre indivíduos, raças e diferentes ejaculados de um mesmo garanhão. Atualmente, existem técnicas laboratoriais precisas que avaliam o movimento espermático por meio de análise computadorizada, fornecendo dados cinéticos não perceptíveis a olho nu. Contudo, embora valiosas, essas informações nem sempre refletem o real potencial fertilizante do sêmen.

A integridade das membranas espermáticas é essencial para a fertilização. Por esse motivo, há grande ênfase no uso de sondas fluorescentes, técnica de elevado valor laboratorial por marcar estruturas celulares específicas e detectar, de forma clara, integridade estrutural e funcional (Battut et al., 2017). Assim, é possível avaliar simultaneamente as membranas plasmática e acrossomal, além do potencial de membrana mitocondrial. A integridade do DNA no espermatozoide também é fundamental para a fertilização bem-sucedida, o desenvolvimento embrionário saudável e o sucesso da gestação.

Apesar das limitações em correlacionar resultados *in vitro* com desempenho *in vivo*, as avaliações laboratoriais da qualidade do sêmen são importantes. Embora não sejam determinantes na predição do potencial fertilizante, esses testes permitem identificar amostras de baixa fertilidade e excluí-las de programas de inseminação artificial. Esta revisão objetiva reunir e apresentar de forma sintética as principais e mais recentes técnicas *in vitro* de avaliação do sêmen equino

### Análises seminais

#### *Motilidade e vigor espermático*

A análise da motilidade é um indicador útil da viabilidade espermática, pois o movimento é

necessário para a penetração na junção útero-tubárica, a liberação nos sítios de armazenamento no oviduto e a penetração através das células foliculares que envolvem o oócito. Entretanto, estudos relataram coeficientes de variação interlaboratoriais > 20% para a motilidade espermática. Isso ilustra as dificuldades em comparar resultados entre laboratórios e em generalizar as conclusões de estudos científicos (Battut et al., 2017; Peter et al., 2021).

Para conferir maior confiabilidade, o exame subjetivo deve ser realizado por técnico experiente, em microscópio óptico binocular com objetiva de 10–20× e mesa térmica. Avalia-se uma gota de sêmen entre lâmina e laminula aquecidas e mantidas a 37 °C, estimando-se o percentual de espermatozoides com movimento total e progressivo (escala 0–100%) e o vigor (velocidade ao atravessar o campo), em escala de 0 a 5 (CBRA, 2013; Peter et al., 2021).

Mesmo quando executada por pessoal qualificado, essa avaliação é subjetiva e passível de erro. A motilidade espermática pode ser determinada por microscopia ou por um sistema computadorizado de análise de motilidade (CASA). Embora a microscopia ótica seja mais subjetiva e os sistemas CASA mais objetivos, os últimos também apresentam limitações. Além dos equipamentos não portáteis, maiores e mais caros, o mercado apresenta sistemas portáteis e mais baratos. Os parâmetros gerados incluem: motilidade total e progressiva, velocidade de trajeto, velocidade progressiva, velocidade curvilínea, amplitude lateral da cabeça, frequência de batimento, retilinearidade, linearidade e percentagem de espermatozoides de movimento rápido (Arruda et al., 2007).

### *Concentração espermática*

Um dos fatores que mais se correlacionou com a fertilidade da amostra pós-descongelamento foi a concentração espermática (Vigolo et al., 2022), o que torna essa avaliação extremamente importante.

Dentre os métodos de concentração espermática existentes, destaca-se os sistemas que usam corantes para identificação e contagem do DNA da célula (espermodensímetros), os CASAs que avaliam a cinética individual das células, os espectrofotômetros que avaliam a densidade da amostra e os hemocitômetros, onde se conta manualmente cada célula (Brito et al., 2016).

A amostra deve ser diluída de acordo com o equipamento a ser utilizado, e a recomendação do fabricante. O padrão ouro para a contagem espermática é o hemocitômetro (câmara de Neubauer). Apresenta como vantagem o baixo custo, mas requer correta montagem e demanda tempo na contagem manual dos espermatozoides. Portanto as centrais de colheita e processamento de sêmen tendem a adotar métodos de contagem mais rápidos, como espermodensímetro (NucleoCounter). Entretanto, apresenta como desvantagem o seu alto custo de aquisição e material de consumo para avaliação das amostras. Os CASAs portáteis apresentam-se como alternativa com menor custo de aquisição, mas as amostras necessitam de diluição, na maioria dos casos, em torno de 50 a 100 x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL para uma correta leitura.

### *Morfologia espermática*

A análise morfológica é frequentemente realizada em microscópio de contraste de fase, em esfregaços corados ou não. As colorações mais empregadas são Giemsa, hematoxilina-eosina e eosina-negrosina, pela facilidade de uso (Varner, 2008; Chenoweth et al., 2024).

Cerca de 200 espermatozoides são normalmente avaliados para identificar defeitos morfológicos, registrando-se o tipo e a incidência de cada um. A classificação da morfologia espermática pode se basear na origem do defeito (ex.: defeitos primários e secundários); Potencial impacto sobre a fertilidade (ex.: defeitos maiores e menores); Localização do defeito no espermatozoide (ex.: cabeça, peça intermediária e cauda); Defeitos espermáticos compensatórios e não compensatórios; Defeitos espermáticos sistêmicos e Defeito espermáticos genéticos (Chenoweth et al., 2024).

### *Integridade e função da membrana plasmática*

A avaliação da integridade da membrana pode ser feita por microscopia óptica ou de fluorescência, porém a membrana não é homogênea, apresenta vários domínios, e testes distintos avaliam domínios diferentes. Por exemplo, o teste hiposmótico avalia a membrana que reveste a peça principal: após incubação em meio hiposmótico e análise ao microscópio óptico, espermatozoides com membrana íntegra na peça principal apresentam enrolamento da cauda; os com membrana lesada não apresentam essa resposta (Neild et al., 2000).

A integridade da membrana que envolve a cabeça é avaliada após colorações. Para esfregaços secos, o corante mais utilizado é eosina-negrosina; em esfregaços úmidos, combina-se diacetato de

carboxifluoresceína (CFDA) com iodeto de propídio (IP) e realiza-se leitura por microscopia de fluorescência. O IP interage com o DNA e cora em vermelho núcleos de células com membrana plasmática danificada. O CFDA é um substrato incolor permeável à membrana que, ao ser hidrolisado por esterases intracelulares, gera fluorescência verde-amarelada retida em células com membrana intacta.

A baixa motilidade pode ocorrer na presença de alta ou baixa viabilidade espermática. No primeiro caso (baixa motilidade/alta viabilidade) pode haver fertilidade normal, enquanto no segundo caso ela está associada à baixa fertilidade.

#### *Integridade da membrana acrossomal*

Nas espécies cujos espermatozoides possuem acrossomo muito pequeno (rato, homem e cavalo), a visualização dos danos acrossomais por microscopia óptica é difícil. Por isso, técnicas de marcação específicas têm sido empregadas para visualizar o acrossomo.

A integridade acrossomal pode ser avaliada por diversas técnicas de fluorescência. Métodos de imunofluorescência permitem identificar acrossomos danificados por meio de preenchimento secundário com fluoróforos. Além disso, o caráter glicoprotéico dos componentes acrossomais possibilita mensurar sua integridade por marcação fluorescente da matriz acrossomal com lecitinas conjugadas (Graham et al., 1990).

#### *Integridade e função da membrana mitocondrial*

Nas células espermáticas, as mitocôndrias estão dispostas de forma helicoidal na peça intermediária e o ATP por elas produzido fornece energia para os batimentos flagelares; assim, a produção mitocondrial de ATP é indispensável para a motilidade espermática.

Diversos indicadores do potencial de membrana mitocondrial têm sido propostos, com destaque para sondas fluorescentes. Os fluorocromos sensíveis ao potencial mitocondrial mais utilizados são as rodaminas e as carbocianinas, cujo êxito em células vivas se deve ao caráter não destrutivo e baixa toxicidade. Essas sondas acumulam-se nas mitocôndrias pela atividade respiratória; quanto mais funcional a organela, maior o acúmulo do corante (Graham e Mocé, 2005).

#### *DNA: Estrutura, fragmentação e descondensação*

A integridade da cromatina é essencial para o desenvolvimento embrionário após a fertilização e a união dos pró-núcleos masculino e feminino. Espermatozoides com núcleos irregulares apresentam cromatina estruturalmente alterada, detectável por padrões anormais de desnaturação do DNA em testes específicos.

Um dos métodos mais eficazes é o Ensaio da Estrutura da Cromatina Espermática (Sperm Chromatin Structure Assay, SCSA), que explora a metacromasia do corante o laranja de acridina e permite calcular o Índice de Fragmentação do DNA, que representa a proporção de espermatozoides com DNA danificado. Valores elevados de DFI têm sido associados à redução da fertilidade em equinos (Love e Kenney, 1998).

A integridade do DNA espermático também pode ser avaliada pela condensação da cromatina, avaliando histonas que substituem as protaminas, pela coloração de azul de anilina (Oliveira et al., 2017).

#### *Associação de sondas fluorescentes*

As combinações de sondas fluorescentes permitem avaliar simultaneamente múltiplos compartimentos da célula espermática (Arruda et al., 2007).

Embora a microscopia com sondas fluorescentes seja largamente utilizada, o número de espermatozoides examinados por análise costuma ser limitado (não excedendo ~200). A citometria de fluxo pode ser uma técnica vantajosa em relação aos métodos clássicos para avaliar viabilidade e integridade espermática, pois permite examinar cerca de 10000 espermatozoides em menos de um minuto, aumentando a exatidão dos resultados e reduzindo o tempo de preparo exigido por outras técnicas fluorescentes (Arruda et al., 2007).

#### *Peroxidação lipídica*

O espermatozoide, como qualquer célula em condições aeróbicas, produz espécies reativas de

oxigênio (EROs), a maior parte provenientes do metabolismo celular normal. Entre as EROs formadas destacam-se o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio, radicais hidroxil, hidroperóxil, peróxil e alcóxil, além do ácido hipocloroso (Oliveira et al., 2013).

A produção excessiva de EROs, acima da capacidade antioxidante do sêmen, gera stress oxidativo, que compromete a célula espermática por diferentes mecanismos, como peroxidação lipídica da membrana plasmática, e resulta em inibição do metabolismo, da motilidade e da capacidade fecundante (Oliveira et al., 2013).

A detecção da peroxidação lipídica pode ser feita pela quantificação de produtos, como o malondialdeído, ou pela análise dos lipídios de membrana por cromatografia.

### Considerações finais

Nenhum teste isolado prevê com segurança o potencial fertilizante das amostras de sêmen criopreservadas dos garanhões, mas podem servir sobretudo para identificar e excluir amostras de baixa qualidade (Katila et al., 2001; Kuisma et al., 2006; Greiser et al., 2020).

Enquanto não se dispuser de marcadores laboratoriais confiáveis e validados de fertilidade, a taxa de prenhez pós-inseminação de éguas permanece o método mais direto para determinar o real potencial fertilizante do sêmen equino.

### Referências

- Arruda RP, Andrade AFC, Peres KR, Raphael CF, Nascimento J, Celeghini ECC.** Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. *Rev Bras Reprod Anim* 2007;31:8-16.
- Battut IB, Kempfer A, Lemasson N, Chevrier L, Camugli S.** Prediction of the fertility of stallion frozen-thawed semen using a combination of computer-assisted motility analysis, microscopical observation and flow cytometry. *Theriogenology* 2017;97:186-200.
- Brito LFC, Althouse GC, Aurich C, Chenoweth PJ, Eilts BE, Love CC, Luvoni GC, Mitchell JR, Peter AT, Pugh DG, Waberski D.** Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration. *Theriogenology* 2016;85:1507-1527.
- CBRA (Colégio brasileiro de reprodução animal). *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal: manual de orientação*, 3.ed., Belo Horizonte, MG - 2013, 104p.
- Chenoweth P, Brito L, Peter A, Waberski D, Althouse G, Luveni G, Turner R, Fraser N, Lapote C.** Andrology laboratory review: evaluation of sperm morphology. *Clinical Theriogenology* 2024;16:1060.
- Graham JK, Kunze E, Hammerstedt RH.** Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol Reprod* 1990;43:55-64.
- Graham K, Mocé E.** Fertility of frozen/thawed semen. *Theriogenology* 2005;64:492-504.
- Greiser T, Sieme H, Martinsson G, Distl O.** Breed and stallion effects on frozen-thawed semen in warmblood, light and quarter horses. *Theriogenology* 2020;142:8-14.
- Katila T.** In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: a review. *Acta Vet Scand* 2001;42:199-217.
- Kuisma P, Andersson M, Koskinen E, Katila T.** Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. *Acta Vet Scand* 2006;48:14.
- Love CC, Kenney RM.** The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. *Theriogenology* 1998;50:955-972.
- Neild DM, Chaves MG, Flores M, Miragaya MH, Gonzales E, Agüero A.** The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. *Andrologia* 2000;32:351-355.
- Oliveira RA, Wolf CA, Viu MAO, Gambarini ML.** Addition of glutathione to an extender for frozen equine semen. *J Equine Vet Sci* 2013;33:1148-1142.
- Oliveira RA, Scarlet D, Ille N, Aurich C.** Cooled-storage of equine semen does not induce major changes in sperm DNA methylation. *Theriogenology* 2017;89, 289-294.
- Oliveira RA, Alonso MA, Fontes JS, Fernandes CB.** Equine ICSI: An update on semen perspective. *Anim Reprod* 2024;21:e20240015.
- Peter A, Brito L, Althouse G, Aurich C, Chenoweth P, Fraser N, Lopate C, Love C, Luvoni G, Waberski D.** Andrology laboratory review: evaluation of sperm motility. *Clinical Theriogenology* 2021;13:24-36.
- Varner DD.** Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology* 2008;70:448-462.
- Vigolo V, Gautier C, Falomo ME, Aurich C.** Selection of frozen-thawed stallion semen by microfluidic technology. *Reprod Dom Anim* 2022;00:1-7.