

PRINCIPAIS AVANÇOS NO PROCESSAMENTO E APLICAÇÃO DO SÊMEN CONGELADO DE EQUINOS

M.A. Alvarenga e F.O. Papa

*Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade Estadual Paulista-UNESP-Botucatu-SP-Brasil.*

E-mail: malvarenga@fmvz.unesp.br

Introdução

É notório o crescimento nos últimos anos do interesse pelo uso do sêmen congelado pela indústria do cavalo, onde raças importantes como Quarto de Milha e Árabe recentemente se incluíram dentro do rol das que permitem o uso desta técnica. Hoje a grande maioria das associações de criadores de cavalo, permitirem a comercialização e o uso do sêmen criopreservado. A recente inclusão de raças importantes como cavalo Árabe e Quarto de Milha, dentro das que aprovam o uso desta técnica, trouxe um novo impulso no interesse pela técnica e conseqüentemente nas pesquisas voltadas a solucionar os problemas relacionados a sua utilização.

Porém, existem fatores limitantes para o uso rotineiro do sêmen congelado em criatórios de equinos, sendo que o principal fator, esta relacionado a própria espécie, onde, uma grande parcela dos garanhões apresentam características de sêmen pós-descongelamento inadequadas para o uso.

Neste artigo estaremos abordando resultados de experimentos recentes desenvolvidos em nosso laboratório voltados a melhoria da qualidade e conseqüente fertilidade do sêmen preservado de garanhões.

Uso de Crioprotetores Alternativos

O mais importante fator limitante ao uso rotineiro do sêmen congelado esta relacionado à própria espécie onde uma grande parcela dos garanhões apresenta características de sêmen pós-descongelamento inadequadas para uso. Uma variação de Zero a 70 % nos índices de fertilidade por ciclo tem sido observada para sêmen congelado de diferentes garanhões (Vidament *et al.*, 1997).

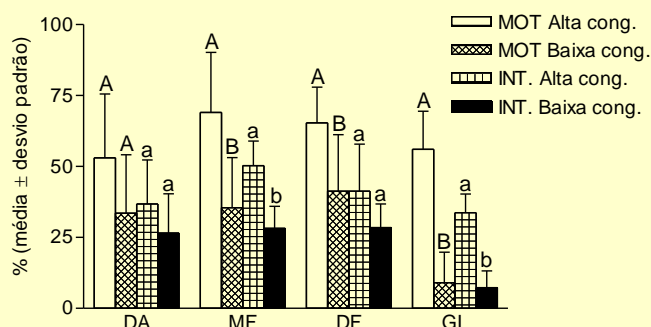
Em particular as raças brasileiras, Mangalarga e Mangalarga Marchador, são menos resistentes ao processo de congelação (Alvarenga *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2002). Alguns autores acreditam que a variabilidade no que diz respeito a resistência do espermatozoides ao processo de congelação esteja relacionada a fatores genéticos. Sabidamente determinadas linhagens de camundongos e raças de suínos apresentam melhor índice de sobrevivência espermática após congelação e descongelação do sêmen. Em trabalho recente, Thurston *et al.* (2002), determinaram alguns marcadores genéticos relacionados a congelabilidade de sêmen de suíno.

Após anos de estudo em nosso laboratório no Brasil acreditamos que um importante fator relacionado a baixa qualidade do sêmen congelado de alguns garanhões esteja relacionado a presença do glicerol nos meios de congelamento. Pace e Sullivan, 1975 demonstraram ser altamente deletério à fertilidade do sêmen fresco de garanhões a adição de glicerol, obtendo queda de fertilidade de 70% para 35% quando da simples adição de glicerol ao meio. Demick *et al.* (1976) também observaram um decréscimo acentuado da fertilidade de sêmen de garanhões refrigerados em meio diluente contendo glicerol por um período de duas horas. Em trabalho recente realizado na França (Vidament *et al.*, 2005) observou-se que em concentrações acima de 3 % o glicerol provocam acentuado decréscimo da fertilidade do sêmen fresco de garanhões.

Ao estudarmos o sucesso e insucesso na congelabilidade de sêmen quando do uso do Glicerol como crioprotetor comparado com crioprotetores alternativos, onde de aproximadamente 55 garanhões de diferentes raças, observamos que 50 % a 60% dos garanhões das raças de Hipismo (Hannoveriano, Holstein e Trackenner) e Quarto de Milha apresentaram sêmen com boa qualidade espermática pós descongelamento, contudo para outras raças nacionais estudadas como Mangalarga Marchador este percentual caiu para cerca de 15% (Alvarenga *et al.*, 2003). Na maioria dos estudos que realizamos constatamos que os crioprotetores a base de amidas (Dimethylformamida e Methylformamida) proporcionaram resultados superiores em relação ao glicerol no que se refere a motilidade espermática, integridade celular e integridade acrossomal em diferentes raças equinas (Gomes *et al.*, 2002, Medeiros *et al.*, 2002). Tendo sido mais expressiva a melhora da qualidade do sêmen quando da congelação de sêmen de garanhões Mangalarga Marchador, os quais são sabidamente indivíduos que apresentam uma baixa

resistência ao congelamento. Observamos que de 17 garanhões da Raça Mangalarga Marchador a grande maioria (14) apresentaram sêmen de boas características quando do uso das amidas como crioprotetores. Por outro lado com o uso do Glicerol somente 2 destes mesmos garanhões da raça mangalarga marchador apresentaram sêmen de boa qualidade após a congelamento. Em outro estudo (Alvarenga *et al.*, 2005) comparamos diferentes formas químicas de amidas (Dimethylformamida-DF, Methylformamida MF, Dimethylacetamida DA) contra o Glicerol comparando-se 27 garanhões de congelabilidade aceitável e não aceitável. Novamente uma mais expressiva habilidade crioprotetora foi observada para as amidas para garanhões com baixa congelabilidade (Figura 1).

Figura 1. Comparação dos parâmetros de motilidade total (MOT) e integridade de membrana espermática (INT) pós-descongelamento entre os garanhões de congelabilidade aceitável (Alta) e não aceitável (Baixa), segundo os diferentes crioprotetores.



Um experimento recente foi realizado também em nosso laboratório (Medeiros, 2007) com a intenção de avaliar a fertilidade dos espermatozoides de sêmen fresco de garanhões submetidos ao estresse osmótico com soluções hipersaturadas dos crioprotetores dimetilacetamida (DA), metilformamida (MF), dimetilformamida (DF) e glicerol (GL) na concentração de 1 Molar. Os resultados demonstraram que houve uma superioridade dos tratamentos com as amidas em relação ao tratamento de glicerol na preservação da motilidade e integridade de membrana, concluindo que a diferença entre os crioprotetores pode estar relacionada a melhor permeabilidade das amidas na célula espermática, acarretando menores injurias. Neste mesmo experimento observou-se queda de fertilidade acentuada quando espermatozoides (sêmen fresco) de um garanhão da raça Mangalarga Marchador foram expostos ao glicerol que não foi tão acentuada no garanhão de alta congelabilidade. (Tabelas 1 e 2). Confirmando nossos achados, em trabalho recente realizado na França (Vidament *et al.*, 2005), observou-se que em concentrações acima de 2 % o glicerol provoca acentuado decréscimo da fertilidade do sêmen fresco de garanhões.

Tabela 1. Resultados do teste de fertilidade de espermatozoides de sêmen fresco do garanhão de Alta Congelabilidade (G11) submetidos ao estresse osmótico nos diferentes crioprotetores (Dimetilacetamida (DA), metilformamida (MF), dimetilformamida (DF) e glicerol (GL)

	Controle (n=25 ciclos)	DA (n=25)	MF (n=25)	DF (n=25)	GL (n=25)
Prenhez +	80 %	72%	80 %	68 %	60 %
Prenhez -	20 %	28 %	20 %	32 %	40 %

Tabela 2. Resultados do teste de fertilidade de espermatozoides do garanhão de Baixa Congelabilidade com sêmen fresco submetidos ao estresse osmótico nos diferentes crioprotetores-Dimetilacetamida (DA), metilformamida (MF), dimetilformamida (DF) e glicerol (GL)

	Controle (n=25)	DA (n=25)	MF (n=25)	DF (n=25)	GL (n=25)
Prenhez +	72 %	40 %	44 %	32 %	0 %
Prenhez -	28 %	60 %	56 %	68 %	100%

Os resultados destes trabalhos nos permitiram concluir que os crioprotetores derivados de amidas por possuírem um menor peso molecular em relação ao glicerol, levam a um menor estresse osmótico as células espermáticas. Aparentemente garanhões de baixa congelabilidade são mais sensíveis ao estresse osmótico induzido pelo glicerol, em relação aos garanhões de alta congelabilidade, em função de prováveis diferenças na permeabilidade da membrana plasmática. Os fatores determinantes destas variações devem estar relacionados á variações na composição da membrana plasmática.

Fertilidade do semen congelado com amidas

Poucos são os experimentos realizados comparando-se a fertilidade de sêmen congelado com amidas e glicerol. Medeiros (2003) inseminou 30 éguas com sêmen de um garanhão da raça Mangalarga o qual foi congelado com glicerol (GLI) ou Dimethylfomamida (DF), onde a motilidade pós descongelamento foi em média de 18% e 48% para o sêmen congelado com GLI e DF, respectivamente. Quinze éguas foram inseminadas em cada grupo com 800 milhões de espermatozoides. Nenhuma gestação (0/15) foi observada no grupo de éguas inseminadas com sêmen congelado com glicerol contudo, no grupo de éguas inseminadas com sêmen congelado com Dimethylfomamida 40% (6/15) das éguas foram diagnosticadas como prenhes ao 15 dias de gestação. Em um outro experimento desenvolvido na Universidade do Colorado nos EUA foi observado que a despeito de não ter sido observada diferença na motilidade espermática pós descongelamento quando o sêmen foi congelado com DF ou GLI, os índices de fertilidade foram significativamente superiores no grupo de éguas inseminadas com diluente de congelamento contendo DF (47%, 14/30) quando comparado com glicerol (14%, 5/34) (Moffett *et al.*, 2003). Baseado nestes dados podemos concluir que o glicerol pode reduzir a fertilidade mesmo quando a motilidade e viabilidade dos espermatozoides são preservadas após o descongelamento.

Atualmente no Brasil na grande maioria dos centros de reprodução eqüina o congelamento de sêmen de garanhões é realizada com uso de derivados de amidas, tendo sido reportados muito bons resultados de fertilidade á campo. Baseado nestes resultados foi desenvolvido em nosso laboratório no Brasil um diluente denominado Botu-crio (Botupharma-Botucatu- SP-Brasil) o qual conta em sua formulação methylformamida e diversos aminoácidos que sabidamente tem características crioprotetoras como Taurina e Glicina. Este diluente tem se mostrado superior aos diluentes tradicionais como EDTA-LACTOSE e INRA 82 não somente na melhoria da motilidade pós descongelamento quanto também na fertilidade.

Quatro trabalhos de diferentes grupos de pesquisadores (EUA-Cornell, Canadá e Brasil) publicados no ultimo Simpósio Internacional de Garanhões comparando Botucio com EDTA-LACTOSE e INRA 82 demonstrara ser sempre superior o diluente Botucio. Em dois experimento recentemente realizado na Espanha (Consuelo Serres Dalmau, Universidade de Madrid) e Bélgica (Maarten Hoogewijs-Universidade de Genth) observou um significativo incremento na qualidade do sêmen de cavalos após descongelamento quando utilizou-se o diluente Botu-crio contra os diluentes INRA-Freeze (IMV) e Gent (Minitub).

Foi também avaliado em nosso laboratório (Melo *et al.*, 2005) a possibilidade de se refrigerar o sêmen antes do congelamento, visando-se desta forma evitar o transporte de garanhões para os centros especializados. O sêmen após re-suspensão no diluente Botu-Sêmen foi resfriado por 24 hs a temperatura de 5 graus Celsius, sendo posteriormente centrifugado e re-suspendido em diluente de congelamento (BOTU-CRIO, Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) contendo Methylformamida como crioprotetor base. Não foi observada diferença nos índices de fertilidade após descongelamento entre o grupo controle o qual foi congelado imediatamente (56% de prenhez positiva) e o grupo refrigerado por 24 hs e posteriormente congelado (66 % prenhez positiva).

Inseminacao artificial com baixo numero de espermatozoides

Outra limitação ao uso em larga escala do sêmen criopreservado de garanhões, diz respeito ao número de doses possíveis de serem processadas e armazenadas por ejaculado; diferente de touros onde em um único ejaculado é possível congelar-se entre 300 a 500 doses, no caso de garanhões este número se restringe entre quatro e seis doses por coleta. Usualmente as éguas são inseminadas com 300 a 500 milhões de espermatozoides móveis, sendo que quando se utiliza sêmen congelado ou refrigerado o número total de células se aproxima de um bilhão (Squires *et al.*, 1999). Entretanto, poucos destes gametas (1000 a 10.000) terão acesso ao oviduto, e este fato é resultado de uma severa seleção espermática que ocorre durante o transporte uterino (Parker *et al.*, 1975) e também pela passagem através da junção útero-tubárica (Vazquez *et al.*, 1998). Já foi demonstrado que é possível a obtenção de fertilização utilizando um número reduzido de espermatozoides, como mostram os resultados de Carnevale *et al.* (1999) que obtiveram 50% de prenhez com a deposição de 500.000 espermatozoides direto no oviduto de éguas.

Preocupados com este aspecto comparamos em experimento realizado em nosso laboratorio (Leão *et al.*, 2005) 4 técnicas de inseminação: inseminação intrafolicular, inseminação intraperitoneal, inseminação com pipeta flexível (Minitub) na ponta do corno uterino e inseminação na papila tubárica através de histeroscopia, utilizando um baixo número de espermatozoides congelados ou seja 20 milhões de espermatozoides por IA. Não foi observado nenhuma prenhez nos grupos em que as éguas foram inseminadas por inseminação intrafolicular e por inseminação intraperitoneal. A porcentagem de prenhez foi estatisticamente igual entre o Grupo de éguas inseminadas com pipeta na extremidade do corno uterino (8/20-40%) e por histeroscopia na papila tubárica (9/20-45%). Enquanto que para o Grupo controle ou seja, 20×10^6 de espermatozoides no corno uterino obtivemos somente 2 prenhez de 20 inseminações (10%). Em função da praticidade, custo e eficiência a técnica de inseminação utilizando-se a pipeta flexível da empresa Minitub é a mais indicada para uso rotineiro de baixa dose inseminante. Contudo para o sucesso da IA com baixas concentrações de espermatozoides é fundamental que o sêmen

apresente boa fertilidade quando utilizado na dose convencional. Equivocadamente alguns Veterinários e proprietários acreditam que esta técnica possa melhorar os índices de fertilidade o que não é verdade.

Congelamento de semen de epidídimo

A recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo e sua criopreservação pode ser a última chance para preservarmos material genético em situações como morte súbita de reprodutores. Contudo segundo a literatura a fertilidade obtida com o uso do sêmen criopreservado do epidídimo de garanhões sempre apresentou baixas taxas de prenhez (10 a 20 %). Recentemente diferentes experimentos tem demonstrado uma expressiva melhoria das taxas de fertilidade quando os espermatozoides recuperados do epidídimo são preservados no diluente Botucurio (Botupharma, Brasil). As taxas de prenhez tem variado entre 60 e 80 % em diferentes experimentos realizados em nosso laboratório com sêmen de epidídimo congelado com o diluente Botucurio onde mais de 100 ciclos foram utilizados. Sendo possível congelar aproximadamente 50 a 100 palhetas contendo 100 milhões de espermatozoides por epidídimo (Melo *et al.*, 2008; Papa *et al.*, 2008; Monteiro *et al.*, 2009). Podendo o epidídimo ser preservado a temperatura de cinco graus Celsius por um período de ate 24 horas antes da recuperação dos espermatozoides.

Para recuperação dos espermatozoides do epidídimo temos utilizado a técnica de fluxo retrógrado na cauda do epidídimo a qual consiste na lavagem com diluente a base de leite desnatado por pressão com o uso de uma seringa dos vasos deferentes.

Em média são recuperados de 15 a 20 bilhões de espermatozoides por epidídimo. Ocorrendo um incremento gradual da motilidade, sendo esta inicialmente menor que 20% atingindo valores normais (> 70 %) quando da adição final do diluente botucurio.

Referencias bibliográficas

- Alvarenga, M.A., Leão, K.M., Papa, F.O., Landim-Alvarenga, F.C., Medeiros, A.S.L., Gomes, G.M. 2003. The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. *Proceedings of the Havemeyer Foundation Workshop on Transporting Gametes and Embryos*, Massachusetts, USA, October, p. 74-76.
- Alvarenga, M.A., Leão, K.M., Papa, F.O., Landim-Alvarenga, F.C., Medeiros, A.S.L., Gomes, G.M. 2005. Amides as an alternative cryoprotectors for freezing stallion semen: A review. *Anim. Reprod. Science* 89(1-4):105-13.
- Ball, B.A., Vo, A. 2001. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. *J. Androl.* 22, 1061-1069.
- Demick, D.S., Voss, J.L., Pickett, B.W. 1976. Effect of cooling, storage with glycerolization and spermatozoa number on equine fertility. *J. Anim. Sci.* 43: 633-637.
- Gomes, G.M., Jacob, J.C.F., Medeiros, A.S.L., Papa, F., Alvarenga, M.A. 2002. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology* 58: 277-279.
- Leão, K. M., Alvarenga, M. A. 2005. Factors involved in failure of transvaginal intrafollicular insemination in mares. *Havemeyer Foundation Monograph Series*, Inglaterra, p. 64-66.
- Medeiros, A.S.L., Gomes, G. M., Carmo, M.T., Papa, F.O., Alvarenga, M.A., 2002. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology* 58: 273-276.
- Medeiros, A.S.L. 2003. Cryopreservation of stallion sperm utilizing different amides. *Master Thesis*, University of São Paulo State-UNESP, Botucatu, 123 pp.
- Medeiros, A.S.L. Resistência osmótica, congelabilidade e fertilidade de sêmen de garanhões frente a diferentes crioprotetores. 2007. *Tese (Doutorado)* Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Univ. Estadual Paulista, Botucatu, 94 pp.
- Melo, C.M., Zahn, F., Dell'Aqua Jr., J.A., Alvarenga, M.A., Papa, F.O. 2007. Influence of Semen Storage and Cryoprotectant on Post-thaw Viability and Fertility of Stallion Spermatozoa. *J. of Equine Vet. Sci.* 27(4): 171-175.
- Melo, C.M., Papa, F.O., Fioratti, E.G., Villverde, S.B., Avanzi, B.R., Monteiro, G., Dell'Aqua Jr., J.A., Pasquini, D.F., Alvarenga, M.A. 2008. Comparison of three different extenders for freezing epididymal stallion sperm. *Ani. Rep.Science* 107(3-4): 331.
- Monteiro, G.A., Guasti, P.N., Papa, F.O. 2009. Colheita e preservação de células espermáticas de garanhões recuperadas da cauda do epidídimo. *Veterinária e Zootecnia* 16(3): 448-458.
- Melo, C.M., Zahn, F.S., Dell'Aqua Junior, J.A., Alvarenga, M.A., Papa, F.O., JEVS Moffet, P.D., Bruemmer, J.E., Card, C., Squires, E.L. 2003. Comparison of dimethyl formamide and glycerol for cryopreservation of equine spermatozoa. *Proceedings Society for Theriogenology Annual Conference*, p. 42 (Abstract).
- Pace, M.M., Sullivan, J.J. 1975. Effect of insemination, number of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 23: 115-121.
- Papa, F.O., Mello, C.M., Fioratti, E.G., Dellaqua, Jr., J.A., Zahn, F.S., Alvarenga, M.A. 2008. Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science* 107: 293-301.
- Thurston, L.M., Siggins, K., Milehan, A.J., Watson, P.F., Holt, W.V. 2002. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism marker linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biol. Rep.* 66: 545-54.
- Vidament, M., Dupere, A.M., Julienne, P., Noue, P., Palmer, E. 1997. Equine frozen semen freezability and fertility fiel results. *Theriogenology* 48: 907-917.
- Vidament, M., Vincent, P., Yvon, J.M., Martin, F.X. 2005. Glicerol in semen extender is limiting factor in the fertility in asine and equine species. *Anim Reprod Sci.* 89(1-4):105-13.