

# CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EQUINO PREVIAMENTE REFRIGERADO COM E SEM PLASMA SEMINAL POR 12 HORAS\*

Hélène Lacerda de Resende<sup>1+</sup>, Jhonnatha Paulo Oliveira<sup>2</sup>, Marcely Karoline Conceição Ecker<sup>3</sup>, Priscilla Nascimento Guasti<sup>1</sup>, Frederico Ozanam Papa<sup>4</sup> e Júlio César Ferraz Jacob<sup>5</sup>

**ABSTRACT.** Resende H.L., Oliveira J.P., Ecker M.K.C., Guasti P.N. & Papa F.O. & Jacob J.C.F. [Cryopreservation of Equine Semen previously cooled with and without seminal plasma for 12 hours]. Criopreservação de Sêmen Equino previamente refrigerado com e sem plasma seminal por 12 horas. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35(4):306-310, 2013. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Unesp/Campus Botucatu, Rubião Junior, Botucatu, SP 18618-000, Brasil. E-mail: helene\_resende@hotmail.com

In the equine species, the use of frozen semen has limiting factors as the need for skilled labor, the high cost of equipment, as well as an appropriate place on the farms to the handling of semen. In order to evaluate the effect of seminal plasma on cooling of equine semen for 12 hours before cryopreservation, this study was conducted with five stallions of Mangalarga Marchador breed, aged between 4 and 8 years old. For this experiment, 15 semen collections were performed, each ejaculate was divided into three groups and each group was divided into two subgroups, using different media extenders (Botu-Semen<sup>®</sup> and Botu-Turbo<sup>®</sup>). In Group I (control), the semen was frozen immediately after collection; in Group II, the seminal plasma was maintained during the cooling and in Group III, the seminal plasma was removed before cooling. After thawing, the sperm parameters were analyzed using CASA and membrane integrity was evaluated by the fluorescent probes carboxyfluorescein diacetate and propidium iodide. Statistical analysis was performed by ANOVA and Tukey's test. There was no significant differences ( $P > 0.05$ ) between the semen samples with and without seminal plasma prior to freezing for all sperm parameters evaluated, total motility (50.5 vs 50.6), progressive motility (21.3 vs 24.1) and plasma membrane integrity (26.2 vs 28). The analyzed data showed that the cooling of equine semen for 12 hours before cryopreservation is an effective method that enables a better use of the ejaculate, regardless of maintenance or removal of seminal plasma during the semen storage.

**KEY WORDS.** Stallion, freezing, fractions of semen, extender.

**RESUMO.** Na espécie equina a utilização do sêmen congelado tem fatores limitantes como a necessidade de mão de obra especializada, o alto custo dos equipamentos, assim como locais apropriados

\*Recebido em 27 de abril de 2012.

Aceito para publicação em 26 de julho de 2013.

<sup>1</sup>Médica-veterinária, M.Sc. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp/Campus Botucatu), Rubião Junior, Botucatu, SP 18618-000, Brasil. +Autora para correspondência. E-mail: helene\_resende@hotmail.com E-mail: priguasti@gmail.com

<sup>2</sup>Médico-veterinário, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Instituto de Zootecnia (IZ), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465 Km 7, Campus Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: jhonnatha@ig.com.br

<sup>3</sup>Curso de Graduação em Medicina Veterinária. Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Campus Seropédica, BR 465 Km 7, Seropédica RJ23890-000. E-mail: karolecker@hotmail.com

<sup>4</sup>Médico-veterinário, Dr.Med.Vet. Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, Unesp/Campus Botucatu, Rubião Junior, Botucatu, SP 18618-000. E-mail: papa@fmvz.unesp.br

<sup>5</sup>Médico-veterinário, DSc. Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, IZ, UFRRJ, Campus Seropédica, BR 465 Km 7, Seropédica RJ 23890-000. E-mail: juliorep@ufrj.br

nos haras para manipulação do sêmen. Com o objetivo de avaliar o efeito do plasma seminal na refrigeração do sêmen equino por 12 horas antes da criopreservação, o estudo foi conduzido com cinco garanhões da raça Mangalarga Marchador, com idade entre 4 e 8 anos. Foram realizadas 15 colheitas de sêmen, sendo que cada ejaculado foi dividido em três grupos, e cada grupo foi dividido em dois subgrupos, utilizando diferentes meios extensores (Botu-Sêmen® e Botu-Turbo®). A amostra do Grupo I (controle) foi congelada logo após a coleta, o sêmen do Grupo II teve o plasma seminal mantido durante a refrigeração e o sêmen do Grupo III teve o plasma seminal retirado para refrigerar. Após o descongelamento, os parâmetros espermáticos de motilidade foram analisados utilizando CASA e a integridade da membrana plasmática foi avaliada por meio de sondas fluorescentes de diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio. A análise estatística foi realizada através da ANOVA e teste de Tukey. Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre o sêmen, previamente a congelamento, refrigerado com e sem plasma seminal para todos os parâmetros espermáticos avaliados, sendo estes motilidade total (50,5 vs 50,6), motilidade progressiva (21,3 vs 24,1) e integridade de membrana plasmática (26,2 vs 28). Os dados analisados indicaram que a refrigeração do sêmen equino por 12 horas antes da criopreservação é um método eficaz, que possibilita um melhor aproveitamento do ejaculado, independentemente da manutenção ou remoção do plasma seminal durante a refrigeração.

**PALAVRAS-CHAVE.** Garanhão, congelamento de sêmen, frações do sêmen, extensor de sêmen.

## INTRODUÇÃO

Os avanços na criopreservação do sêmen equino tem aumentado a utilização da inseminação artificial nos últimos anos. Esta técnica permite a otimização de animais com elevado potencial genético através da formação de um banco de sêmen e pela possibilidade de inseminar éguas em diferentes países. O uso do sêmen equino congelado tem alguns fatores limitantes como: os custos com equipamentos, a necessidade de mão de obra especializada e de um local adequado para manipular as amostras, deslocamento do equipamento para a fazenda ou haras, e o mais relevante, os riscos relacionados com o transporte e habitação de garanhões nos centros especializados (Graham 1996).

A fim de ultrapassar todos estes limites na crio-

preservação do sêmen equino, recentes pesquisas têm procurado por protocolos para congelamento do sêmen após longo período de refrigeração, obtendo bons resultados (Crockett et al. 2001, Backman et al. 2004, Melo et al. 2008).

Backman et al. (2004) refrigeraram o sêmen equino por 18 horas antes da congelamento e não observaram diferenças nas taxas de gestação entre as éguas inseminadas com sêmen congelado padrão (53%) e éguas inseminadas com sêmen congelado previamente resfriado (70%). Do mesmo modo, as taxas de prenhez utilizando sêmen refrigerado por 24 horas antes da criopreservação (83,3%) foram similares ao sêmen congelado pelo método padrão (72,7%) (Melo et al. 2005).

Os protocolos de criopreservação de sêmen preconizam a retirada do plasma seminal (PS) e sua substituição por diluidores (Amann & Pickett 1987). O plasma seminal é a porção fluida do sêmen, secretado pela *rete testis*, epidídimo e glândulas sexuais acessórias (ampola do ducto deferente, próstata, vesícula seminal e glândula bulbouretral), funciona como meio de transporte para as células espermáticas, atua como tampão, fornece nutrientes e ajuda na motilidade inicial do espermatozóide (McKinnon & Voss 1992). No entanto, há controvérsias quanto a necessidade do plasma seminal no processo de fecundação, uma vez que espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo apresentam alta taxa de concepção (Papa et al. 2008, Monteiro et al. 2011). Além disso, algumas pesquisas mostraram que o plasma seminal pode levar a prejuízos relacionados com fertilidade e congelabilidade espermática. Estes estudos demonstraram efeito deletério na viabilidade espermática quando adicionado plasma seminal (Moore & Hibbit 1976, Aurich et al. 1996). Adicionalmente, proteínas contidas no plasma seminal podem levar a alterações bioquímicas que aumentam a permeabilidade da membrana, promovendo injúria celular (Moore & Hibbit 1976, Moustafa & Mezaros 1981).

O presente estudo teve por objetivo verificar a influência do plasma seminal na refrigeração do sêmen equino por 12 horas antes da criopreservação e comparar qual o melhor meio diluidor para a refrigeração.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi desenvolvido durante o período de setembro a dezembro de 2009. Foram utilizados cinco garanhões da raça Mangalarga Marchador, com idade entre 4 e

8 anos, alojados em uma central de transferência de embriões no município de Itaguaí, Rio de Janeiro. Todos os reprodutores apresentavam histórico normal de fertilidade à monta natural, e foram previamente submetidos a exame andrológico, sendo considerados férteis.

Os ganhões foram mantidos em baias de alvenaria individuais, alimentados com feno de leguminosa (*Medicago sativa* - alfafa) suplementados com quatro quilos de ração comercial em dois tratos diários, tendo acesso irrestrito a água e sal mineral comercial específico para equinos.

Antes do início dos procedimentos, realizou-se exame clínico andrológico de acordo com as recomendações de Kenney et al. (1975) para sêmen de ganhões, sendo todos os animais classificados como aptos à reprodução. Para as colheitas de sêmen, utilizou-se uma vagina artificial modelo Botucatu, com uso de égua em estro.

O sêmen foi coletado em intervalo de três dias, sendo três colheitas por animal, totalizando 15 ejaculados. Após a coleta, procedeu-se a avaliação imediata do sêmen quanto ao volume, cor, odor, aspecto, motilidade total, motilidade progressiva, vigor, concentração segundo Kenney et al. (1975). Em seguida, o ejaculado foi dividido em três grupos, cada grupo com dois subgrupos, conforme demonstrado na figura 1.

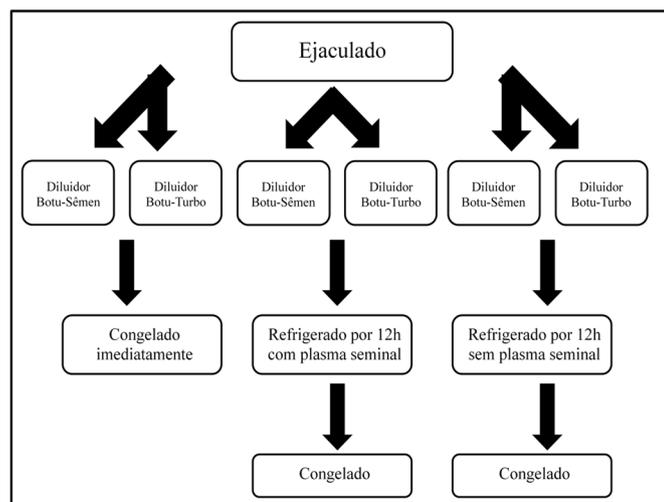


Figura 1. Divisão dos grupos e subgrupos.

Grupo I (controle): uma amostra de sêmen foi diluída no meio diluidor Botu-Sêmen® (Botupharma, Botucatu/SP, Brasil), e outra amostra diluída em meio extensor Botu-Turbo® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) e imediatamente após a diluição as amostras foram submetidas à criopreservação utilizando o diluidor Botu-Crio® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) segundo o método descrito por Papa et al. (2008).

Grupo II: uma amostra foi diluída em extensor Botu-Sêmen® e outra em extensor Botu-Turbo® ambas na proporção 1:2 (sêmen: extensor), em seguida submetidas à refrigeração prévia por 12 horas a 5° C em *container* de transporte e refrigeração Botutainer® (Botupharma, Botucatu/SP, Brasil), mantendo-se o plasma seminal, segundo a técnica desenvolvida por Melo et al. (2007). Após esse período essas amostras foram processadas para congelamento como no grupo controle.

Grupo III: uma amostra de sêmen foi diluída em extensor Botu-Sêmen® e outra amostra em extensor Botu-Turbo® ambas na proporção 1:1 (sêmen: extensor), e centrifugadas a 600 x G

por 10 minutos para remoção do plasma seminal. Após a centrifugação os *pellets* foram ressuspensos em Botu-Sêmen® ou Botu-Turbo®, retomando-se o volume original. Em seguida, as amostras foram submetidas à refrigeração por 12 horas a 5°C em *container* de transporte e refrigeração Botutainer® (Botupharma, Botucatu/SP, Brasil). Decorridas às 12 horas, as amostras foram criopreservadas segundo método descrito por Papa et al. (2008).

Para a criopreservação todas as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5ml, à concentração de 100 milhões de espermatozoides/palheta.

As palhetas foram descongeladas em banho-maria na temperatura de 46°C, por 20 segundos (Dell'Aqua Jr 2001). Após a descongelação, foram analisados os parâmetros espermáticos pelo método computadorizado CASA (Análise Espermática Assistida por Computador). A integridade da membrana plasmática foi avaliada através de sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio (Harrison & Vickers 1990).

Os resultados dos parâmetros espermáticos foram adotados em médias para cada subgrupo em função da refrigeração e do extensor utilizado. Após a obtenção das médias os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para comparação das médias utilizando-se o teste de Tukey com significância de 5% (P<0,05).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Independente do meio extensor utilizado, a refrigeração por 12 horas reduziu de forma significativa (P<0,05) a motilidade total (MT) pós-descongelação em ambos os grupos refrigerados com e sem PS, quando comparados ao grupo controle, como observado na Tabela 1. Em relação à motilidade

Tabela 1. Valores médios (±DP) da motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e integridade da membrana plasmática (IMP) do sêmen pós-descongelação.

Grupos	MT (%)	MP (%)	IMP (%)
Controle (GI)	67,6±22,0 <sup>a</sup>	31,9±15,8 <sup>a</sup>	38,9±9,5 <sup>a</sup>
Refrigerado com PS (GII)	50,5±25,9 <sup>b</sup>	21,3±15,3 <sup>b</sup>	26,2±9,0 <sup>b</sup>
Refrigerado sem PS (GIII)	50,6±22,9 <sup>b</sup>	24,1±15,3 <sup>ab</sup>	28,0±8,9 <sup>b</sup>

Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa (P<0,05).

PS: plasma seminal

progressiva (MP) observa-se uma queda significativa (P<0,05) apenas para o grupo refrigerado com plasma em relação ao grupo controle, enquanto a MP do grupo refrigerado sem plasma não diferiu significativamente do grupo controle. A refrigeração com ou sem plasma reduziu significativamente a integridade de membrana plasmática (IMP) em relação ao grupo controle, mas não diferiu entre os grupos refrigerados com ou sem PS.

Assim, analisando-se a Tabela 1 pode se observar que o resfriamento por 12 horas afetou a

congelabilidade do sêmen observados através dos menores valores de MT, MP e IMP nos grupos refrigerado com plasma e refrigerado sem plasma em relação ao grupo controle, o qual foi criopreservado imediatamente após a colheita. Esses resultados vão de encontro aos resultados achados por Backman et al. (2004) onde os valores de MT e MP pós-descongelamento do sêmen refrigerado por 18 horas antes da criopreservação foram significativamente menor ( $P < 0,05$ ) do que o sêmen congelado padrão. Porém, esses mesmos autores não observaram diferença significativa ( $P > 0,05$ ) na taxa de concepção entre os grupos de congelação convencional e o grupo de refrigeração prévia. Deste modo, não se pode afirmar, no presente estudo, que o sêmen congelado padrão é superior ao sêmen refrigerado por 12 horas antes da congelação uma vez que seria necessário testar a fertilidade do sêmen.

A Tabela 2 expõe os valores de MT, MP e IMP, após a criopreservação, dos grupos controle, refrigerado com e sem plasma seminal, em relação ao meio extensor utilizado. Após a refrigeração por 12 horas em meio extensor Botu-Sêmen® não foi observado diferença significativa ( $P > 0,05$ ) na MT e MP no sêmen refrigerado com e sem plasma em relação ao grupo controle. Entretanto, houve maior dano à membrana celular após a refrigeração por 12 horas ( $P < 0,05$ ) em ambos os grupos refrigerados, com e sem plasma, em relação ao grupo controle, mas não variaram entre si.

Tabela 2. Valores médios ( $\pm$ DP) da motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e integridade da membrana plasmática (IMP) do sêmen pós-descongelamento utilizando os diluidores Botu-Sêmen® e Botu-Turbo® para os grupos controle (GI), refrigerado com plasma seminal (GII) e refrigerado sem plasma seminal (GIII).

Grupos	Botu-Sêmen® (%)			Botu-Turbo® (%)		
	MT	MP	IMP	MT	MP	IMP
GI	69,6 $\pm$ 23,0 <sup>a</sup>	32,7 $\pm$ 16,8 <sup>a</sup>	39,7 $\pm$ 9,8 <sup>a</sup>	65,6 $\pm$ 21,6 <sup>a</sup>	31,2 $\pm$ 15,3 <sup>a</sup>	38 $\pm$ 9,5 <sup>a</sup>
GII	48,9 $\pm$ 25,6 <sup>a</sup>	20,1 $\pm$ 15,6 <sup>a</sup>	25,9 $\pm$ 10,2 <sup>b</sup>	52 $\pm$ 26,9 <sup>a</sup>	22,5 $\pm$ 15,5 <sup>ab</sup>	26,5 $\pm$ 7,9 <sup>b</sup>
GIII	55,9 $\pm$ 25,2 <sup>a</sup>	24,5 $\pm$ 17,5 <sup>a</sup>	30,5 $\pm$ 10,1 <sup>b</sup>	45,3 $\pm$ 19,7 <sup>a</sup>	17,1 $\pm$ 12,1 <sup>b</sup>	25,6 $\pm$ 7,0 <sup>b</sup>

Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Ao se avaliar a utilização do meio extensor Botu-Turbo® observa-se na tabela 2, que após a descongelamento a MT do sêmen refrigerado por 12 horas não diferiu significativamente ( $P > 0,05$ ) em relação ao grupo controle. Já a MP foi afetada de forma significativa ( $P < 0,05$ ) pela refrigeração do sêmen sem o plasma seminal tendo sido menor que o grupo controle e não diferindo do grupo refrigerado com plasma. Independente da remoção do plasma semi-

nal a IMP foi menor que a do grupo controle após a refrigeração do sêmen ( $p < 0,05$ ).

Assim, pode-se observar que o meio extensor Botu-Sêmen® foi hábil em manter a motilidade espermática total e progressiva independente da remoção do plasma seminal para a refrigeração, embora tenha sido observada menor integridade de membrana. Os resultados do presente trabalho corroboram com os encontrados por Melo et al. (2008) em que o diluidor Botu-Sêmen® foi significativamente superior na manutenção dos parâmetros espermáticos após refrigeração por 24 horas à 5°C comparado ao meio extensor Kenney.

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos conclui-se que a refrigeração do sêmen equino por 12 horas antes da criopreservação, independentemente da remoção ou não do plasma seminal durante a refrigeração, é um método eficaz que possibilita um melhor aproveitamento do ejaculado, podendo este ser transportado por até 12 horas a um centro especializado para realizar a congelação. Adicionalmente, esses resultados demonstram que o meio extensor Botu-Sêmen® é o mais indicado para a diluição do sêmen que será refrigerado por 12 horas.

**Agradecimentos.** Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro e concessão de bolsa de Ini-

ciação Científica. A Botupharma® pela concessão dos meios diluidores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amann R.P. & Pickett B.W. Principles of cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J. Equine Vet. Sc.*, 7:145-173, 1987.
- Aurich J.E., Kühne A., Hoppe H. & Aurich C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology*, 46:791-797, 1996.

- Backman T., Bruemmer J.E., Graham J.K. & Squires E.L. Pregnancy rates of mares inseminated with semen cooled for 18 hours and then frozen. *J. Anim. Sci.*, 82:690-694, 2004.
- Crockett E.C., Graham J.K. & Bruemmer J.E. Effect of cooling equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: preliminary results. *Theriogenology*, 57:793-803, 2001.
- Dell'aqua Jr. J.A., Papa F.O. & Zahn F.S. Effects of warming rate on sperm parameters and of insemination site and dose on the fertility of equine frozen semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 68:344-346, 2001.
- Graham J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet. Clin. N. Am.: Equine Pract.*, 12:131-147, 1996.
- Harrison R.A. & Vickers S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 88:343-352, 1990.
- Kenney R.M., Bergman R.V., Cooper W.L. & Morse G.W. Minimal contamination technique for breeding mares: techniques and preliminary findings. In: *Proc. Ann. Conv. Am. Assoc. Equine Pract.*, 21: 327-336, 1975.
- Melo C.M., Zahn F.S., Martin I., Alberti K., Orlandi C., Siqueira Filho E.R., Dell'aqua Jr. J.A., Alvarenga M.A. & Papa F.O. Effect of cooling stallion semen for 24h before freezing on fertility rates. *Anim. Reprod. Sci.*, 89:250-252, 2005.
- Melo C.M., Zahn F.S., Martin I., Orlandi C., Dell'aqua Jr. J.A., Alvarenga M.A. & Papa F.O. Influence of semen storage and cryoprotectant on post-thaw viability and fertility of stallion spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.*, 27:171-175, 2007.
- Melo C.M., Villaverde A.I.S.B., Felício G.B., Wechsler F.S. & Papa F.O. Comparação de dois diluentes na refrigeração de sêmen equino durante 24 horas antes da congelação. *Vet. Zootec.*, 15:325-331, 2008.
- McKinnon A.O. & Voss J.L. *Equine Reproduction*. 1ª ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1992.
- Monteiro G.A., Papa F.O., Guasti P.N., Freitas N.P.P., Melo C.M., Avanzi B.R., Velloso N.M. & Dell'aqua Jr. J.A. Fertilidade de espermatóides recuperados da cauda do epidídimo de garanhões subfêrteis. *Vet. Zootec.*, 18:255-263, 2011.
- Moore H.D.M. & Hibbit K.C.S. The binding of labeled basic proteins by boar spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 46:71-77, 1976.
- Moustafa A.R. & Mezaros I. Interrelationship between the total protein content of bovine seminal plasma and behavior of spermatozoa after freezing-and-thawing. *Acta Vet. Acad. Scient. Hung.*, 28:403-408, 1981.
- Papa F.O., Melo C.M., Fioratti E.G., Dell'aqua Jr. J.A., Zahn F.S. & Alvarenga M.A. Freezing of stallion epididymal sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, 107:293-301, 2008.