



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UniCEUB
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

KARINE ZARGIDSKY MARQUES

**INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO ESPERMÁTICA NA
QUALIDADE DO SÊMEN EQUINO RESFRIADO.**

BRASÍLIA

2019



KARINE ZARGIDSKY MARQUES

**INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO ESPERMÁTICA NA
QUALIDADE DO SÊMEN EQUINO RESFRIADO.**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica
apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa
pela Faculdade de Ciências da Educação e da Saúde –
FACES.

Orientação: Andrei Antonioni Guedes Fidelis

BRASÍLIA

2019

INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO ESPERMÁTICA NA QUALIDADE DO SÊMEN EQUINO RESFRIADO

Karine Zargidsky Marques – UniCEUB, PIC Institucional, aluno voluntário
Karine.zargidsky@sempreceub.com

Sabrina Couto Ferraz Salles – estudante de medicina veterinária da UnB, colaboradora
sabrinaferraz97@gmail.com

Andrei Antonioni Guedes Fidelis – UniCEUB, professor orientador
andrei.fidelis@ceub.edu.br

Francisco José Gonçalves de Oliveira – UniCEUB, professor de medicina veterinária
francisco.jose@ceub.edu.br

RESUMO

A utilização de sêmen de equinos de elevado mérito genético aumenta a cada ano, uma vez que a técnica de reprodução assistida mais comum nessa espécie é a inseminação artificial, com sêmen fresco, refrigerado ou congelado. Essa alta demanda mercadológica obriga a entrega de um produto de qualidade. Entretanto, nem todos os machos possuem uma boa congelabilidade e, com isso, a maneira mais usual de transporte é resfriando o sêmen após diluição prévia. O preparo do sêmen para resfriamento requer um processo de separação dos espermatozoides e isso pode causar danos irreversíveis. O presente estudo teve por objetivo avaliar a influência de diferentes métodos de separação espermática na melhoria do sêmen resfriado. Foram utilizados três ganhões e o ejaculado, após avaliação de motilidade e vigor, foi diluído e dividido em três grupos: um grupo controle (CONT), sem passar pela centrifugação; um grupo centrifugado (CENT) e o terceiro grupo foi usado o SpermFilter (SPERM). Após essa etapa, o sêmen foi resfriado por 24 horas. Os parâmetros pós resfriamento analisados foram: integridade de membrana, por meio da coloração eosina/negrosina e patologia espermática, divididos em espermatozoides normais, com defeitos maiores e menores, de acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Os dados foram analisados por ANOVA e o nível de significância de 5% foi utilizado. Não houve diferença significativa (média \pm desvio padrão) no número de espermatozoides normais (CONT: $78,2 \pm 15,1$; CENT: $68,5 \pm 19,3$ e SPERM: $75,8 \pm 11,5$) nem no número de defeitos maiores (CONT: $15,2 \pm 8,4$; CENT: $12,7 \pm 9,2$ e SPERM: $17,7 \pm 12,8$) e menores (CONT: $15,8 \pm 10,9$; CENT: $19 \pm 10,8$ e SPERM: $14,2 \pm 8,5$) entre os tratamentos ($p > 0,05$). A integridade de membrana espermática foi similar ($p > 0,05$) entre os tratamentos, onde a quantidade de espermatozoides com membrana rompida foi de $99 \pm 1,3$ para o grupo CONT; $85,3 \pm 31,6$ para o CENT; $76,3 \pm 37$ para o grupo SPERM. Diante do exposto, não houve influência do método de separação espermática nos parâmetros analisados.

Palavras-Chave: Inseminação Artificial. Centrifugação. SpermFilter.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que participaram, direta e indiretamente, do desenvolvimento e elaboração deste trabalho, possibilitando a realização dele apesar de todas as dificuldades encontradas no ano que se passou.

Agradeço especialmente aos Professores Andrei Antonioni Guedes Fidelis e Francisco José Gonçalves de Oliveira, que foram essenciais para a confecção desse projeto, orientando nas atividades e auxiliando sempre que necessário.

Agradeço, também, ao Programa de assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa do UniCEUB, por sempre se prontificarem a me ajudar e sanar minhas dúvidas quando as mesmas existiam e pela flexibilidade e tolerância diante dos imprevistos que surgiram durante a confecção do projeto.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Fundamentação Teórica	2
3. materiais e métodos	3
3.1 Seleção de animais e local de experimento	3
3.2 Coleta do sêmen e delineamento experimental	4
3.3 Análise dos parâmetros	4
4. Resultados e Discussão	5
5. Considerações Finais	6
6. Referências	6

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o segundo país que mais faz uso do sêmen de equinos na forma refrigerada, sendo a refrigeração e o transporte de sêmen desses animais uma prática usual. Dessa forma, a evolução das técnicas adequadas para a melhor preservação, armazenamento e transporte desse conteúdo é de suma importância, visto que assim é possível otimizar o aproveitamento de garanhões de alto mérito genético (PAPA et al., 2005 *apud* RAPHAEL, 2007).

Para isso, cada vez mais são realizados estudos visando prolongar a longevidade do sêmen de equinos nessa condição visando manter sua capacidade de fertilização, visto que quanto maior esta for, mais fácil será o manejo das fêmeas a serem inseminadas (BATELLIER et al., 2001 *apud* RAPHAEL, 2007).

De acordo com Katila (p. 1217- 1227, 1997) *apud* RAPHAEL (2007), à temperatura corporal o metabolismo espermático encontra-se em seu auge, permanecendo alto quando em temperatura ambiente. No entanto, reduzindo-se a temperatura ocorre uma queda no metabolismo, de forma que a cada 10°C de queda, o metabolismo reduz em cerca de 50%. Quando as células espermáticas são mantidas a 5°C, somente 10% de seu metabolismo é necessário para sua sobrevivência. Sendo assim, a refrigeração diminui a atividade metabólica do espermatozoide, bem como o crescimento microbiano, conseqüentemente mantendo a viabilidade do sêmen por um maior período.

Aspectos como estação do ano, frequência de ejaculação, tamanho dos testículos e idade do garanhão precisam ser levados em consideração para a determinação do número de fêmeas que o reprodutor servirá durante a estação de monta, uma vez que influenciam na produção do número de espermatozoides e na sua disponibilidade para a ejaculação (Pickett e Shiner, p.31-36, 1994 *apud* NUNES, p.42-56, 2006).

Estudos realizados desde a década de 70 procuram definir a concentração espermática a ser utilizada para a inseminação artificial com sêmen refrigerado (BALL, 2005 *apud* NUNES, p.42-56, 2006). De acordo com o mesmo autor, Ball (1998, p.18-24.) *apud* Nunes, (p.42-56, 2006), em situações em que se trabalha com ejaculados que apresentem grandes quantidades de plasma seminal, a centrifugação é essencial para concentrar o sêmen. Contudo, já existem estudos relatando que essa técnica pode prejudicar os espermatozoides e, conseqüentemente, a fertilização, como o de Ecot et al. (p. 245-248, 2005) *apud* Campanholi (2016).

Recentemente, uma nova técnica de remoção do plasma seminal para aumentar a concentração espermática do ejaculado de equinos foi proposta, usando um filtro composto por membrana hidrofílica sintética conhecido como SpermFilter (ALBUQUERQUE et al., 2012).

Tendo em vista esses empecilhos, esse trabalho teve como objetivo geral avaliar a influência dos diferentes métodos de separação espermática na qualidade do sêmen equino resfriado.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O contingente de equinos, no Brasil, é superior a 5 milhões de animais, incluindo aqueles de lida, raça, lazer e competição. Apesar da introdução de máquinas de última geração e da tecnologia, o cavalo continua sendo essencial para a execução de atividades pecuárias e agrícolas em grande parte das propriedades produtivas nacionais. A atividade movimentada, a cada ano, cerca de R\$ 16,15 bilhões e gera 610 mil empregos diretos e 2.430 mil empregos indiretos (MAPA, 2016).

Progressivamente vem tornando-se comum o uso de técnicas de reprodução assistida entre os haras e, dentre elas, a mais comum é a inseminação artificial com sêmen equino refrigerado, visto que ela permite a utilização de ganhões geneticamente superiores, proporcionando melhores acasalamentos (NUNES, 2006). Desta forma, diferentes técnicas vêm sendo estudadas, desenvolvidas e aprimoradas com o intuito de ampliar tanto a qualidade, quanto a fertilidade do ejaculado desses animais. (ALVARENGA; PAPA; NETO; 2017).

Diversos fatores podem influenciar a qualidade e resistência a criopreservação do sêmen de ganhões, especialmente os fatores genéticos e aqueles relacionados à composição da membrana plasmática espermática, responsáveis pela mesma ser mais ou menos sensível aos desafios e danos provocados pelo processo de fecundação, e ao plasma seminal (ALVARENGA; PAPA; NETO; 2014). O espermatozoide, no momento da ejaculação e passagem pelo trato reprodutivo feminino, é exposto a diferentes condições que podem prejudicar sua membrana plasmática e acarretar sua morte, e o processamento do sêmen para refrigeração e inseminação artificial amplificam essas condições (AURICH, p. 65-75, 2005, apud RAPHAEL, 2007).

O plasma seminal é constituído de uma mistura de secreções derivadas do testículo, epidídimo e glândulas acessórias (TROEDSSON et al., p. 171–186, 2005 apud RAPHAEL, 2007), expelido em 5 a 8 frações no momento da ejaculação com o intuito de transportar e oferecer os substratos metabólicos necessários aos espermatozoides, além de participar do

processo de maturação espermática. Também estão presentes no plasma seminal algumas proteínas que podem desestabilizar a membrana plasmática, sendo necessário em alguns casos removê-lo para prolongar a viabilidade do sêmen refrigerado (BRINSKO, et al, p.65-71, 2007 apud ALVARENGA; PAPA; NETO, p.81-85, 2017), visto que ele pode ser benéfico ou maléfico à qualidade do gameta masculino (BERGERON; MANJUNATH, p. 1338–1344, 2006 apud RAPHAEL, 2007).

Alvarenga (2017) afirma que já existem estudos relatando que a remoção do plasma seminal de garanhões com baixa resistência espermática à refrigeração, proporciona um aumento da qualidade seminal após a refrigeração. Diferentes técnicas podem ser usadas para concentrar espermatozoides do ejaculado de animais dessa espécie, sendo a centrifugação a mais rotineira. Todavia, efeitos deletérios podem ser causados por esse processamento caso a força e tempo de centrifugação não estejam corretamente regulados. (SIEME et al., 2003). A centrifugação do sêmen é muito aplicada em programas de melhoramento genético em equinos, o que realça a importância de se estudar e aperfeiçoar esse procedimento (WAITE et al., p. 704- 714, 2008 apud CAMPANHOLI, 2016).

Outro método de separação do plasma seminal de fácil aplicabilidade é a filtração do sêmen, segundo Alvarenga et al. (2010). Para isso, utiliza-se um dispositivo chamado Sperm Filter® (Ceafepe Tecnologia Veterinária Ind., Sorocaba, São Paulo, Brasil), que permite a passagem do plasma seminal e retém somente as células espermáticas de forma eficaz sem prejudicar a motilidade e viabilidade espermática.

De acordo com o fabricante, o filtro é composto uma membrana hidrofílica sintética com poros de 2 milímetros e 12 centímetros de diâmetro, conectado a um anel de plástico que tolera até 50 mL de sêmen para filtração. O sêmen, após sua diluição, é despejado sobre a membrana e o filtro deve ser manuseado suavemente sobre uma placa de Petri. Em virtude do tamanho dos poros, 90 a 95% do plasma seminal atravessa o filtro, que retém os espermatozoides (RAMIRES NETO et al., 2013).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção de animais e local de experimento

Foram utilizados três garanhões da raça Mangalarga Marchador de do Haras Estábulo, localizada em Brasília, Distrito Federal. Os animais foram mantidos em piquetes de Tifton, com água *ad libitum* durante todo o regime de colheita de sêmen.

3.2 Coleta do sêmen e delineamento experimental

As colheitas foram realizadas utilizando vagina artificial modelo Hannover composta por um tubo rígido de PVC, tubo flexível de látex, camisa sanitária descartável e copo coletor com filtro de náilon acoplado para obtenção da fração livre de gel. A metodologia empregada foi a colheita fechada e a temperatura da vagina artificial em torno de 42-44°C, devidamente lubrificada com gel estéril não espermicida. Para realização das colheitas, foi utilizada uma égua em cio devidamente contida. No momento da monta, o pênis ereto foi desviado em direção da vagina artificial. A ejaculação foi detectada pelos jatos ejaculatórios, verificados com a palma da mão na porção ventral do pênis ou observação dos movimentos da cauda. Após a colheita, o sêmen foi avaliado quanto ao volume, aspecto (cor e densidade), motilidade total e vigor em microscopia óptica, viabilidade espermática por coloração de eosina-nigrosina, concentração espermática por método de câmara de Neubauer e morfologia espermática por metodologia de câmara úmida (CBRA, 2013; Oliveira et al., 2015). Só foi utilizado sêmen que apresente padrões mínimos de qualidade para sêmen fresco de acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), ou seja, motilidade total $\geq 60\%$, vigor ≥ 3 e $\geq 70\%$ de espermatozoides normais no exame morfológico.

Foram coletados o sêmen de três garanhões com o auxílio de uma vagina artificial, os quais foram depositados em um tubo e homogeneizados, eliminando assim as possíveis variações individuais de cada animal. Posteriormente, o material foi submetido a três diferentes procedimentos, sendo assim dividida em três grupos distintos: o Grupo Controle (CONT), onde o sêmen não passou por nenhum processo de separação espermática; o Grupo Centrifugado (CENT), o qual o sêmen foi colocado em uma centrífuga para haver a decantação das células espermáticas no fundo do tubo e sua posterior separação do porção do plasma seminal; e Grupo SpermFilter (SPERM), onde o sêmen foi depositado em uma membrana sintética porosa, que permite a passagem do plasma seminal e bactérias e retém somente as células espermáticas. Por fim, as amostras foram resfriadas por 24 horas a uma temperatura de 5° Celsius.

3.3 Análise dos parâmetros

Passadas as 24 horas do processo de resfriamento, as amostras foram avaliadas quanto aos seguintes aspectos: integridade de membrana, através da coloração eosina-negrosina, e patologias espermáticas (defeitos maiores e menores, em concordância com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA).

Posteriormente, os dados obtidos foram submetidos a uma análise de variância, a qual foi realizada através do ANOVA, visto que havia mais de dois grupos a serem analisados, com 5% de significância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos após a análise de variância mostraram-se semelhantes entre si (média \pm desvio padrão) no que diz respeito ao número de espermatozoides normais (CONT: $78,2 \pm 15,1$; CENT: $68,5 \pm 19,3$ e SPERM: $75,8 \pm 11,5$) e a respeito no número de defeitos maiores (CONT: $15,2 \pm 8,4$; CENT: $12,7 \pm 9,2$ e SPERM: $17,7 \pm 12,8$) e menores (CONT: $15,8 \pm 10,9$; CENT: $19 \pm 10,8$ e SPERM: $14,2 \pm 8,5$) entre os tratamentos ($p > 0,05$).

A integridade de membrana espermática foi similar ($p > 0,05$) entre os tratamentos aplicados, onde a quantidade de espermatozoides com membrana rompida foi de $99\% \pm 1,3$ para o grupo CONT; $85,3 \pm 31,6$ para o CENT; $76,3 \pm 37$ para o grupo SPERM.

Apesar da similaridade entre os resultados, notou-se um elevado desvio padrão devido ao reduzido número de análises realizado. Ainda assim, corroborando com o que foi dito no trabalho da Feldmann (2012), foi visto que o SpermFilter realmente permite a passagem de quantidade considerável de células espermáticas viáveis.

Alvarenga et al. (2010), em seu estudo, concluiu que o uso de filtros trata-se de uma técnica útil para separar as células espermáticas do plasma seminal, concentrando dessa forma o esperma para que ele possa ser submetido a processos de congelamento e resfriamento, principalmente nos casos em que se trabalhe com sêmen de qualidade inferior.

A centrifugação é uma técnica que visa a obtenção de elevada taxa de recuperação de espermatozoides, com o mínimo possível de danos celulares (MACPHERSON et al., 2001 *apud* CAMPANHOLI, 2016), comumente utilizada em equinos, pois a remoção do plasma seminal reduz seus efeitos deletérios sobre a qualidade do sêmen (ALVARENGA et al., 2010), sendo assim uma etapa complementar fundamental para refrigeração e criopreservação do sêmen nesta espécie (SIEME et al., 2003).

Trata-se de um método que requer cuidado em sua execução devido às possíveis prejuízos que esse processo pode acarretar à célula espermática, pois a intensidade e o tempo de centrifugação podem levar à redução de sua motilidade e fertilidade, comprometendo a integridade da membrana plasmática e a taxa de recuperação dos espermatozoides (RAMIRES NETO et al., 2013).

Em concordância com o exposto por Len et. al (2010) *apud* Campanholi (2016), os espermatozoides que não passaram pelo processo de centrifugação apresentaram maior número de espermatozoides móveis, viáveis e sem reação acrossomal quando comparado aos espermatozoides do grupo centrifugado, fato que leva o autor a concluir que tal procedimento é indicado apenas em casos restritos, como os de garanhões oligospermicos ou que possuem sensibilidade à refrigeração por ação do plasma seminal.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se, de maneira parcial, que o uso de ambos os métodos de separação espermática propostos nesse trabalho trarão resultados satisfatórios, porém, tendo em vista o custo elevado do SpermFilter, a utilização de uma centrífuga para aumentar a concentração espermática do ejaculado de equinos mostra-se mais viável.

Os resultados obtidos foram similares devido ao elevado desvio padrão. Estudos futuros devem ser realizados, com maior número de repetições do experimento para tentar reduzir o mesmo e verificar se realmente existe diferença entre os diferentes métodos de separação espermática, visando melhorar a qualidade, viabilidade e fertilidade do ejaculado desses animais.

6. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, J. P. et al. *Comparação entre duas técnicas para concentrar espermatozoides equinos visando congelamento de sêmen*. In: XXIV CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP. Resumo. São Paulo, 2012.

ALVARENGA, M. A. et al. *A new method to concentrate equine sperm*. Animal Reproduction Science, v. 121, n. 1/2, supl., p. 186-187, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/137111>>.

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; NETO, C. R. Estratégias para melhorar a qualidade e fertilidade do sêmen de reprodutores equinos. SPERMOVA. 2014, 4(2): 172 -178.

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; NETO, C. R. Técnicas para incremento da qualidade do sêmen de garanhões. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 41, n. 1, p. 81-85, 2017.

CAMPANHOLI, S. P. *Efeito da centrifugação e filtração do sêmen bovino sobre a criopreservação espermática*. 2016. 58 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, São Paulo, 2016.

FELDMANN, R. O. et al. Eficiência da filtração para concentrar espermatozoides equinos. In: XVIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA. 2012.

LEN, J. A.; et al. *Immediate and delayed (after cooling) effects of centrifugation on equine sperm*. Theriogenology, New York, v. 73, p. 225-231, 2010.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavallo. Brasília, 2016.

NUNES, D. B. et al. *Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado*. Revista Brasileira de Reprodução Animal. Belo Horizonte, v.30, n.1/2, p.42-56, jan./jun. 2006.

RAMIRES NETO, C.; et al. *Effect of removing seminal plasma using a Sperm Filter on the viability of refrigerated stallion semen*. Journal of Equine Veterinary Science, Maryland Heights, v. 33, p. 40-43, 2013.

RAPHAEL, C. F. *Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozoide equino refrigerado*. Orientador: Rubens Paes de Arruda. 2007. 111 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SIEME, H.; et al. *Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen*. Reproduction in Domestic Animals, Berlim, v. 38, p. 134-140, 2003.