

Criopreservação de espermatozoides eqüinos comparando duas curvas de congelamento combinadas com diluentes comerciais: uma análise laboratorial

Cryopreservation of equine spermatozoa comparing different freezing rates combined with commercial extenders: laboratorial analysis

Paula Barros Terraciano^{I,IV*} Ivan Cunha Bustamante-Filho^{I,II} Ludmila do Vale Miquelito^I
Tamarin Rodrigues Arlas^{III,IV} Fabiana Castro^{III} Rodrigo Costa Mattos^{III,IV}
Eduardo Pandolfi Passos^I Ender Rosana Oberst^{II,IV} Elizabeth Obino Cirne Lima^{I,IV,V}

RESUMO

Durante o processo de criopreservação de sêmen, os espermatozoides sofrem alguns danos que resultam na diminuição da fertilidade deste. O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos da utilização combinada de duas curvas de congelamento com dois diluentes comerciais (FR-5[®] e Botu-Crio[®]) sobre a criopreservação de sêmen eqüino. Foram analisados 20 ejaculados de dois garanhões. As amostras foram avaliadas por microscopia de contraste de fase e microscopia de epifluorescência, observando-se a motilidade progressiva e total do sêmen pós-descongelamento e a integridade e a funcionalidade da membrana dos espermatozoides. A combinação entre curva automatizada e Botu-Crio[®] apresentou as maiores médias nas análises de motilidade total e progressiva, após o descongelamento. O diluente Botu-Crio[®], isoladamente, preservou também as membranas destes, quando foram realizadas as análises de integridade utilizando teste com diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio e funcionalidade de membrana pelo teste hiposmótico.

Palavras-chave: *sêmen, eqüino, criopreservação, espermatozoide, crioprotetores.*

ABSTRACT

During semen cryopreservation, sperm cells were submitted to several deleterious events leading to membrane damage which result in fertility decrease. This study was designed to compare the effects of two freezing techniques (conventional and automated), and the use of two commercial extenders as cryoprotectants (FR-5[®] and Botu-Crio[®]) on total and progressive

motility, integrity and functionality of spermatid membranes during the cryopreservation of equine semen. Twenty ejaculates from two stallions were analyzed. The total and progressive motility of fresh and post-thawing semen samples were evaluated by patterns assays. Function of plasmatic membrane was measured by the hipoosmotic swelling test. Integrity of plasmatic membrane was evaluated using carboxifluorescein diacetate and iodidium propide fluorescent probes. There were significant differences between the two freezing techniques and/or between cryoprotectants for all assessed parameters. The combination of Botu-Crio[®] and automated curves showed better results on total and progressive post-thawing motility. The extender Botu-Crio[®], alone, showed to better preserve the membrane integrity and function.

Key words: *semen, equine, cryopreservation, spermatozoon cell, cryoprotectants.*

INTRODUÇÃO

A utilização de biotecnologias cada vez mais modernas tem contribuído para o avanço da reprodução de diversas espécies animais, em especial animais de produção. O desenvolvimento de técnicas adequadas para a preservação e o armazenamento de sêmen possibilita melhor aproveitamento de animais de alto valor zootécnico, permitindo o uso da genética de animais que não possam – temporária ou permanentemente – serem utilizados na reprodução,

^ILaboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: paulaterraciano@gmail.com. *Autor para correspondência.

^{II}Laboratório de Inseminação Artificial, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

^{III}Laboratório de Reprodução Animal (REPROLAB), Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

^{IV}Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

^VDepartamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

além de permitir o transporte de sêmen a longas distâncias, sendo considerado como o melhor seguro biológico de reprodutores geneticamente superiores. Porém, os índices de fertilidade obtidos com sêmen equino congelado são ainda muito inferiores aos obtidos com sêmen congelado de bovinos, por exemplo, (PARKS & GRAHAM, 1992).

Uma das questões importantes relacionadas com a eficiência das técnicas de criopreservação é a velocidade de redução da temperatura durante o congelamento. O tipo de curva utilizada no congelamento tem influência direta no grau de lesões celulares, devido a processos de desidratação e formação de cristais de gelo intracelulares (MOORE et al., 2006). Além disso, meios diluentes de sêmen são utilizados com o objetivo de proteger os espermatozoides contra os efeitos deletérios do resfriamento a temperaturas críticas. Entretanto, a criopreservação de sêmen equino não é uma tecnologia estabelecida (ALVARENGA et al., 2005). Nos últimos anos diversas modificações têm sido propostas para a melhoria da técnica como a utilização de diluentes à base de leite em substituição ao ovo (PALMER 1984, VIDAMENT et al., 2001), e a utilização de amidas no lugar do glicerol (VIDAMENT et al., 2001, ALVARENGA et al., 2005). O presente trabalho teve como objetivo demonstrar o efeito de duas diferentes curvas de congelamento combinadas com dois diferentes diluentes comerciais sobre as características funcionais e estruturais dos espermatozoides equinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados dois ganhos com fertilidade comprovada com seis e trinta anos de idade, um da raça Puro Sangue Inglês e um sem raça definida. Ambos os animais encontravam-se em atividade sexual, com a produção espermática estabilizada, num regime de três coletas semanais. As amostras de sêmen foram coletadas pelo método de vagina artificial, modelo Hannover, com intervalo médio de coletas de três dias, perfazendo um total de 10 coletas por animal. O período de coletas estendeu-se de outubro a dezembro de 2006.

Uma parcela das amostras (1ml) foi reservada para as análises do sêmen fresco e o restante foi processado para o congelamento. Após a coleta, a fração gel foi desprezada e o sêmen foi filtrado em gaze estéril. A seguir as amostras foram avaliadas em microscópio de contraste de fase (200x) quanto à motilidade progressiva (MP) e à motilidade total (MT), 20µl de sêmen entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37°C, sobre mesa térmica. A avaliação da MP e a MT foi realizada de forma subjetiva, pelo mesmo observador, conforme definição de KENNEY et al. (1983).

Para a análise da integridade física da membrana, 400µl de sêmen foram incubados com 3µl de iodeto de propídio (PI) e 2µl de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), a 37°C por oito minutos. A amostra foi avaliada por microscopia de epifluorescência, em aumento de 1000 x, sob imersão. Um total de 100 espermatozoides por amostra foi avaliado. Foram considerados íntegros aqueles espermatozoides que apresentaram coloração verde (HARKEMA & BOYLE, 1992).

A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada por meio do teste hiposmótico. Para tanto, 200µL de água destilada foram adicionados a 100µL de sêmen (osmolaridade: 100mOsmol kg⁻¹). As amostras foram incubadas a 37°C por oito minutos, conforme descrito por LOMEIO & GIAMBERSIO (1991), modificado por LAGARES et al. (2000). Posteriormente, amostras de sêmen foram analisadas em microscópio de contraste de fase em aumento de 400x. Foram avaliados 100 espermatozoides por amostra e foram considerados íntegros os espermatozoides que promoveram um enrolamento da cauda (LOMEO & GIAMBERSIO, 1991).

Paralelamente à realização das análises das amostras de sêmen fresco, cada ejaculado foi dividido em duas frações, que foram diluídas 1:1 (v: v), com os diluentes de centrifugação comerciais FR-1[®] (Nutricell-Rua Dimas de Toledo Piza, 521, - Campinas, SP) ou Botu-Sêmen[®] (Biotech Botucatu, João Passos 573, Botucatu-SP) à temperatura de 37°C. As amostras foram centrifugadas a 650 x g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso com os diluentes estudados. A concentração espermática foi avaliada em câmara de Neubauer. Cada ejaculado coletado foi fracionado em duas alíquotas, que foram diluídas nos dois diferentes diluentes. Depois o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5ml e concentração de 50x10⁶ milhões de espermatozoides, submetidas a duas diferentes técnicas de congelamento.

O diluente FR-5[®] é composto por leite desnatado e gema de ovo. Ele contém glicerol como crioprotetor e não contém amidas em sua formulação. O diluente Botu-Crio[®] contém açúcares, aminoácidos, gema de ovo, glicerol e metilformamida.

Metade das amostras, diluídas em Botu-Crio[®], foram submetidas à curva de congelamento automatizada (A) e a outra metade, à curva de congelamento convencional, não-automatizada (B). Da mesma forma, as palhetas contendo as amostras diluídas com o FR-5[®] foram também congeladas com as duas curvas citadas.

Foram utilizadas duas curvas de congelamento, denominadas A e B. A curva de congelamento A foi realizada utilizando-se um sistema congelador automatizado programável, modelo Freeze Control® (CL-8800, Cryologic PTY. LTD; Austrália). A curva utilizada seguiu o protocolo descrito a seguir (SPRECKELS, 1994): início em 24°C, redução da temperatura até 5°C a 0,3°C min⁻¹. De 5°C a -15°C, redução de temperatura de 10°C min⁻¹. De -15°C até -100°C, redução de temperatura de -25°C min⁻¹. A partir de -100°C, a temperatura foi reduzida em queda livre, com taxa de decréscimo de aproximadamente 30°C min⁻¹. A curva de congelamento B foi realizada conforme descrito por KNEIBL (1993) em que as palhetas devem ser dispostas horizontalmente em vapor de nitrogênio líquido, em uma estante posicionada a 3cm acima do nível do nitrogênio, por 20 minutos, e mergulhadas imediatamente no nitrogênio líquido. Neste sistema, a taxa média de congelamento, do sêmen é de -70°C min⁻¹. Após o congelamento as palhetas foram estocadas em botijão criogênico por pelo menos uma semana antes de serem descongeladas e avaliadas.

As amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos e posteriormente foram avaliadas quanto à motilidade total e progressiva, integridade e funcionalidade da membrana plasmática, conforme descrito anteriormente para as amostras de sêmen fresco. Para a análise estatística dos resultados obtidos, foi realizada análise de variância considerando um delineamento inteiramente casualizado, em um modelo fatorial 2x2, com interação. Como co-variável foi considerado o valor do sêmen fresco da variável em estudo. Para comparação entre médias, foi utilizado o teste de Tukey, com nível de significância de 5%. Os dados foram analisados pelo programa Minitab - versão 14.1.

RESULTADOS

As amostras de sêmen fresco, sem diluição, apresentaram valor médio de motilidade progressiva de 14,2%±6,9 e valor médio de motilidade total de 70%±18,2. A porcentagem média de integridade de membrana foi 81,9%±8,9 e a funcionalidade de membrana apresentou valor médio de 71,5%±10,1. A motilidade total e a motilidade progressiva foram significativamente superiores (P<0,05) nas amostras congeladas com o diluente Botu-Crio®, nas curvas A e B, quando comparadas às amostras congeladas com o diluente FR-5®. Foi observada interação significativa entre diluente e curva de resfriamento, tanto para MP (P<0,01) quanto para MT (P<0,01) (Figura 1). As

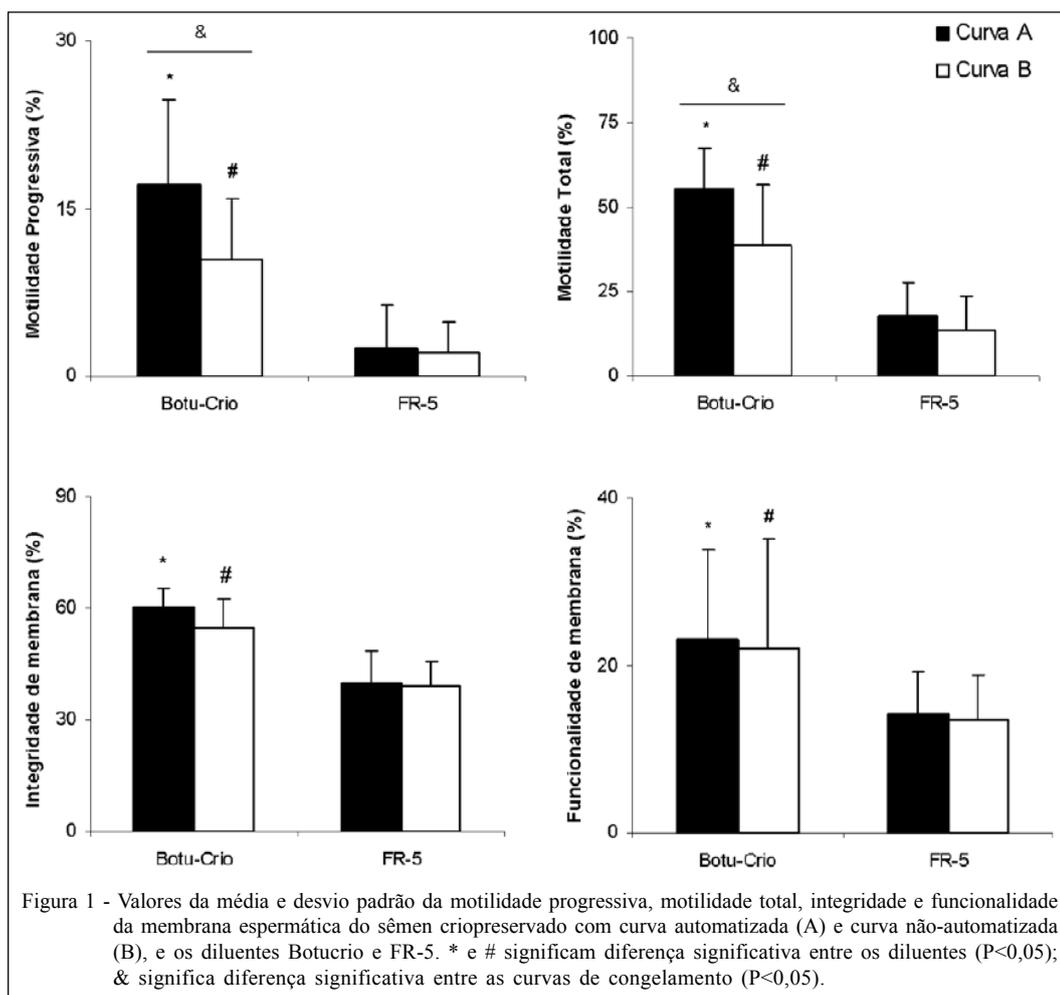
amostras diluídas em Botu-Crio® apresentaram índices significativamente superiores de células íntegras (P<0,05), quando comparadas com os índices obtidos com o diluente FR-5® independentemente da curva de congelamento utilizada. A curva de congelamento A apresentou índices significativamente superiores (P<0,05) de células íntegras, quando comparada aos índices obtidos com a curva B, independentemente do diluente utilizado. Não houve interação entre curva e diluente. (Figura 1). De forma semelhante, as amostras de sêmen equino criopreservadas com o diluente Botu-Crio® foram as que possuíram as melhores taxas de preservação de funcionalidade de membrana plasmática após o descongelamento (P<0,05) (Figura 1)

DISCUSSÃO

A maior eficiência na criopreservação de espermatozoides equinos observada na curva de congelamento A, nas amostras congeladas com ambos os diluentes, deve-se provavelmente a uma maior precisão no controle do decréscimo de temperatura, pois o sistema de congelamento automatizado preservou de maneira mais eficiente a motilidade total e progressiva, a integridade e a funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozoides equinos. Dados semelhantes foram encontrados por COCHRAN et al. (1984) quando compararam a eficiência de um sistema de congelamento automatizado com um não-automatizado.

Os dados encontrados indicam que as amostras congeladas com diluente à base de amidas resultam na obtenção de uma melhor motilidade progressiva no sêmen, após o congelamento, do que quando se utiliza o diluente FR-5®. Além disso, os dados estão de acordo com outros autores que analisaram a eficiência dos crioprotetores sem a análise combinada de diluentes com curvas de congelamento (PAPA et al., 2002; ALVARENGA, 2003).

Os valores médios de motilidade total, verificados na avaliação do sêmen fresco, situam-se dentro dos padrões referidos pela literatura (McKINNON & VOSS, 1993). Os valores médios de motilidade progressiva foram inferiores aos definidos como normais. Entre as amostras analisadas, demonstrou-se que o maior índice de motilidade total ocorreu na interação entre a curva de congelamento A e o diluente Botu-Crio®, indicando que esta combinação potencializou a eficiência de preservação dos espermatozoides equinos. Os valores encontrados são semelhantes aos relatados por BUSTAMANTE-FILHO (2006) e superiores aos observados por GOMES et al. (2002) e VIDAMENT et al. (1997). Paralelamente, os



índices de motilidade total encontrados, quando foi utilizado o mesmo diluente combinado com a curva B, foram de $38,7\% \pm 17,8$. Estes dados são semelhantes aos referidos por GOMES et al. (2002).

Além disso, a manutenção dos índices de motilidade progressiva em valores próximos aos do sêmen fresco estão de acordo com as observações de GOMES et al. (2002) e ALVARENGA et al. (2005). Esses autores relataram que diluentes contendo amidas em sua formulação produzem melhores resultados quanto à preservação de sêmen de equinos que não apresentam bons índices ao congelamento com diluentes contendo altas concentrações de glicerol.

Os valores médios da motilidade progressiva obtidos com o diluente FR-5[®] nas amostras de sêmen descongelado foram inferiores aos relatados na literatura (ALVARENGA et al., 2005; BUSTAMANTE-FILHO, 2006). Alguns autores consideram que, em algumas raças e animais, os efeitos deletérios do glicerol se tornam mais acentuados (GOMES et al., 2002).

Os animais utilizados neste experimento, segundo a classificação de BRINSKO et al. (2000), apresentam menos de 25% de motilidade progressiva, pós-descongelamento; portanto, são classificados como animais com sêmen de baixa congelabilidade. Diversos autores têm demonstrado que a utilização de agentes à base de amidas como crioprotetores pode ser uma alternativa, principalmente para estes ganhos (MEDEIROS, 2003; PAPA et al., 2002). O efeito benéfico reportado, com a utilização de uma combinação entre a curva automatizada e um diluente à base de amidas, pode indicar que esta metodologia poderia vir a ser adotada em amostras de sêmen de animais de alto valor agregado e que apresentem sêmen considerado abaixo dos parâmetros de alta congelabilidade.

Os valores do teste hiposmótico para a funcionalidade de membrana evidenciaram maior eficiência na criopreservação de espermatozoides diluídos com Botu-Crio[®], quando comparados aos

resultados das amostras criopreservadas com o diluente FR-5[®]. Estes dados demonstram que o diluente Botu-Crio[®] foi mais eficiente na preservação da funcionalidade da membrana, quando combinado com as duas curvas de congelamento, corroborando a tendência observada nos valores médios de motilidade progressiva e total.

A curva automatizada e o diluente Botu-Crio[®], separadamente, foram responsáveis pela melhor proteção das células contra os danos da criopreservação, o que foi constatado pelo menor número de células com membranas lesadas, quando comparados aos resultados encontrados com as amostras em que se utilizou a curva convencional de congelamento e o crioprotetor. A velocidade de redução da temperatura durante o congelamento é uma das etapas mais importantes no processo de criopreservação, uma vez que variações não-desejáveis na curva de resfriamento aumentam o grau de desafio enfrentado pelos espermatozoides. Este desafio abrange variações osmóticas, danos na membrana plasmática e lesões de organelas, comprometendo acrossoma, mitocôndrias e DNA, peças-chave na função espermática (MOORE, 2006).

O presente trabalho está de acordo com os resultados obtidos por MEDEIROS (2003), que ressaltou uma maior eficiência dos diluentes contendo amidas, como a dimetil-formamida, em relação ao glicerol, na manutenção da integridade da membrana espermática. Segundo estes autores, a eficiência dos diluentes que contém amidas pode estar relacionada ao seu menor peso molecular, possibilitando maior penetrabilidade através das membranas plasmática e acrossomal, levando conseqüentemente a um menor dano osmótico.

CONCLUSÕES

Encontrou-se maior eficiência na criopreservação de sêmen equino com a utilização do diluente comercial Botu-Crio[®], combinado tanto com o sistema de congelamento automatizado quanto com o sistema de congelamento convencional. Foi possível demonstrar ainda que houve interação significativa entre o diluente Botu-Crio[®] e a curva automatizada, produzindo efeito potencializador. Os resultados encontrados sugerem que, de uma maneira geral, o sistema de congelamento automatizado causa menos danos aos espermatozoides, sendo indicada a adoção de diluentes contendo amidas como crioprotetor.

Apesar de ainda apresentar baixa eficiência, a criopreservação de sêmen equino faz-se necessária devido às exigências de mercado. O material

criopreservado apresenta capacidade de armazenamento por longos períodos e viabiliza a criação de bancos de material genético de animais de destaque e/ou alto valor agregado.

AGRADECIMENTOS

À professora Vera Beatriz Wald, pela colaboração na análise estatística. Ao Professor Dr. Frederico Ozanam Papa (UNESP Botucatu), pela cessão do diluente Botu-Crio[®]. Agradecemos, também, ao apoio técnico de Márcia Rodrigues Trein e Cristina Botelho Messias.

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, M.A. **Melhoria da resistência espermática à congelamento e diminuição das variações entre raças e indivíduos com o uso da dimetilformamida para sêmen de garanhões.** 2003. Tese (Livro docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- ALVARENGA, M.A. et al. Amides as cryoprotectant for freezing stallion semen: a review. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.105-113, 2005.
- BRINSKO, S. et al. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v.54, p.129-136, 2000.
- BUSTAMANTE-FILHO, I.C. **Estresse oxidativo na criopreservação do sêmen equino.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- COCHRAN, J.D. et al. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. **Theriogenology**, v.22, p.25-38, 1984.
- EDDY, E.M.; O'BRIEN, D.A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. **The physiology of reproduction.** New York: Raven, 1994. Cap.2, p.29-77.
- GOMES, G.M. et al. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology**, v.58, p.277-279, 2002.
- HARKEMA, W.; BOYLE, M.S. Use of fluorescent stains to assess membrane integrity of equine spermatozoa. In: INTERNACIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 1992, Den Hagen. **Proceedings...** Den Haag, 1992. p.1424-1426.
- KENNEY, R.M. et al. **Manual for clinical fertility evaluation of the stallion.** Hastings-EUA.: Society for Theriogenology, 1983.
- KNEIBL, S. **Tiefgefrierkonservierung von Pferdesperma: Einfluß der Samenentnahmetechnik, zentrifugation, konfektionierungsform und Einfriermethode auf die motilität und membranintegrität der samenzellen.** 1993. Tese (Doutorado) - Medicina Veterinária, Hannover, 1993.

- LAGARES, M.A. et al. Efeito de diferentes diluentes sobre a membrana plasmática do espermatozoide equino e fertilidade do sêmen resfriado. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.7, n.3, p.153-156, 2000.
- LOMEO, A.M.; GIAMBÉRSIO, A.M. Water-test: a simple method to assess sperm-membrane integrity. **International Journal of Andrology**, v.14, n.4, p.278-282, 1991.
- McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine reproduction**. 3.ed. Filadelfia: Lea & Febiger, 1993. p.1322.
- MEDEIROS, A.S. **Utilização de vários tipos de amidas como agentes crioprotetores para espermatozoides de garanhões**. 2003. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- MOORE, A.I. et al. Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.26, n.5, p.215-218, 2006.
- PALMER, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 10, 1984, Urbana. **Proceedings...** Urbana-Champaign, Estados Unidos, 1984. p.377-378.
- PAPA, F.O. et al. Utilização do diluente MP50 para a criopreservação do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.184-187, 2002.
- PARKS, E.J.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p.209-222, 1992.
- SPRECKELS, I. **Untersuchungen zur samenzell-selektion mittels glaswollsephadex filtration bei hengstperma unter besonderer berücksichtigung der kryokonservierung**. 1994. Tese (Doutorado) - Hannover, Deutschland.
- VIDAMENT, M. et al. Equine frozen semen freezability and fertility fiel results. **Theriogenology**, v.48, p.907-917, 1997.
- VIDAMENT M. et al. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA 82. **Animal Reproduction Science** v.61, p.201-218, 2001.