

Efeito do resfriamento do sêmen eqüino sobre sua congelabilidade

[Effect of freezing and thawing protocols on post-thaw quality of equine semen]

R. Fürst¹, G.R. Carvalho^{2*}, M.C.O. Fürst³, J.R.M. Ruas⁴, A.M. Borges⁵, V. Mafilli³

¹Estudante de Doutorado - UFV – Viçosa, MG

²Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa

Avenida P.H. Rolfs s/n - Campus

36570-000 – Viçosa, MG

³Médico veterinário autônomo

⁴EPAMIG – Viçosa, MG

⁵Escola de Veterinária da UFMG – Belo Horizonte

RESUMO

Utilizaram-se 25 ejaculados de cinco garanhões da raça Mangalarga Marchador, para avaliar dois protocolos de congelamento. No primeiro tratamento, resfriou-se o sêmen até 5°C (curva de resfriamento - CR) antes do congelamento, no segundo, congelou-se o sêmen sem resfriamento (SC). Compararam-se duas formas de descongelamento, a 37°C e a 75°C/sete segundos. Os protocolos foram avaliados pelo teste de termo resistência (TTR - motilidade total e vigor) e pela funcionalidade da membrana plasmática (teste hiposmótico e eosina nigrosina). A motilidade total no tempo zero do TTR foi melhor ($P<0,05$) para o sêmen do tratamento CR, quando comparado com o do SC, em ambas as temperaturas de descongelamento, respectivamente, 46,7% e 21,0% (descongelamento a 37°C), e 44,2% e 24,6% (descongelamento a 75°C). Na mesma ordem, o número de espermatozoides vivos foi maior ($P<0,05$) no tratamento CR, 71,0% e 54,6% (descongelamento a 37°C), e 77,4% e 54,1% (descongelamento a 75°C). O sêmen do tratamento CR apresentou maior reação ($P<0,05$) ao teste hiposmótico e maior vigor ($P<0,05$) que o do SC. O sêmen descongelado a 75°C apresentou melhor vigor ($P<0,05$) que o descongelado a 37°C, independentemente do protocolo de congelamento. Os resultados mostraram, *in vitro*, o efeito benéfico do resfriamento do sêmen antes do congelamento.

Palavras-chave: eqüino, sêmen, protocolo de congelamento

ABSTRACT

Two freezing protocols and two thawing methods were evaluated on 25 ejaculates from five stallions of the Mangalarga Marchador breed. In the first freezing method, semen was cooled to 5°C before freezing (CR); and in the second, semen at room temperature was frozen directly (SC). The two thawing methods were thawing semen at 37°C for 30 seconds versus thawing at 75°C for 7 seconds. Thawed semen was evaluated by the thermal resistance test (TRT- total motility and vigor) and by integrity of sperm membranes (the hypo-osmotic test and the eosine-nigrosine test). Semen that was cooled before freezing had higher ($P<0.05$) motility immediately post-thaw than semen that was more abruptly frozen (46.7% versus 21.0% for semen thawed at 37°C and 44.1% versus 24.5% for semen thawed at 75°C, respectively). At both thawing temperatures, the percentage of live spermatozoa was higher ($P<0.05$) in CR treatment than in the SC method (71% versus 54.6% for semen thawed at 37°C and 77.3% versus 54.1% for semen thawed at 75°C, respectively). The CR treatment also resulted in better hypo-osmotic test results and better semen vigor than did the SC treatment. Semen thawed at 75°C showed better

Recebido para publicação em 16 de julho de 2003

Recebido para publicação, após modificações, em 8 de outubro de 2004

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: giovanni@ufv.br

($P < 0.05$) vigor than semen thawed at 37°C, independent of the semen freezing method. In conclusion, there were substantial benefits on subsequent semen quality from cooling of semen before it was frozen.

Keywords: equine, semen, freezing protocol, thawing protocol, semen quality

INTRODUÇÃO

A criopreservação do sêmen equino representa importante instrumento no melhoramento genético da espécie, pela maximização do uso de bons reprodutores. Porém, os índices de fertilidade obtidos com eqüinos são ainda muito inferiores aos obtidos com sêmen congelado de bovinos. Segundo Kloppe et al. (1988), a menor taxa de fertilidade do sêmen congelado, comparada à do sêmen fresco, constitui um dos maiores entraves à plena difusão dessa biotecnologia.

A redução da taxa de fertilidade verificada após o processo de congelamento e descongelamento está relacionada, principalmente, aos danos causados ao funcionamento e às estruturas das membranas dos espermatozóides (Parks e Graham, 1992). Essas injúrias têm sido identificadas por meio de testes *in vitro* que avaliam a funcionalidade e a integridade da membrana.

A velocidade de redução da temperatura durante o congelamento tem sido um dos fatores mais importantes no processo de criopreservação, visto que o grau de lesões celulares depende da curva de resfriamento (Watson, 1995). O choque térmico pelo frio, nas membranas espermáticas, é mais pronunciado quando o resfriamento ocorre rapidamente na faixa de temperatura entre 20 e 0°C. Watson (1995) relatou que a faixa crítica situa-se entre 12 e 2°C; Quinn et al. (1980), entre 15 e 0°C, e Moran et al. (1992), entre 19 e 8°C. Menores taxas de resfriamento do sêmen até 4-6°C são mais benéficas para as membranas espermáticas (Varner et al., 1988; Moran et al., 1992).

No congelamento de sêmen equino, o protocolo mais difundido é a utilização de um dispositivo contendo uma raque que fica a 3cm acima do nível do nitrogênio líquido (Martin et al., 1979). Nessa raque, são depositadas as palhetas ou macrotubos na posição horizontal. Nesse sistema, a taxa média de congelamento do sêmen é de -70°C/minuto.

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito do resfriamento do sêmen até a temperatura de 4-5°C, antes do seu congelamento, sobre as características funcionais e estruturais do espermatozóide equino.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi coletado sêmen de cinco garanhões da raça Mangalarga Marchador, com intervalo de coletas de três dias, perfazendo um total de cinco coletas por animal. Após a coleta, o sêmen foi avaliado quanto ao volume, cor, odor, motilidade total, vigor e teste hiposmótico na osmolaridade de 100mOsm/l – Hos-t 100 (Fürst, 2002), em solução de citrato-frutose (Correa e Zavos, 1994). Em seguida, diluiu-se o ejaculado na proporção de 1:1 (sêmen:diluidor) utilizando-se o diluidor de centrifugação (Martin et al., 1979), centrifugado a 650g por 10 minutos. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se os espermatozóides no diluidor de congelamento (Martin et al., 1979). O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5ml, à concentração de 200 milhões de espermatozóides/palheta. Em seguida, as palhetas foram divididas eqüitativamente para os dois tratamentos.

No protocolo 1, utilizou-se uma curva de resfriamento (CR), de tal forma que as palhetas, contendo o sêmen na temperatura ambiente, foram colocadas em tubo de ensaio com tampa e capacidade de 20ml. O tubo foi revestido por um saco plástico, sendo o conjunto transferido para um recipiente com capacidade de 240ml (mamadeira plástica), contendo 120ml de álcool absoluto. O recipiente com o sêmen foi colocado na posição horizontal em geladeira, com temperatura interna de 4-5°C, por 35 minutos. Após esse tempo, o tubo de ensaio foi retirado do recipiente plástico e mantido na geladeira por mais 25 minutos. A mensuração da temperatura foi realizada com utilização de termômetro digital¹, cujo sensor de temperatura foi

¹ Gulterm 200

introduzido dentro do tubo de ensaio. Os valores da temperatura interna do tubo de ensaio foram computados a cada dois minutos de intervalo.

No protocolo 2 (sem resfriamento do sêmen – SC), após o envase, o sêmen foi congelado sem resfriamento prévio.

Para o congelamento do sêmen, segundo Martin et al. (1979), as palhetas foram colocadas, na posição horizontal, sobre uma raque a 4cm acima do nível do nitrogênio líquido, por 15 minutos. Após esse período, as palhetas foram mergulhadas no nitrogênio líquido e armazenadas em botijão de sêmen.

O sêmen foi descongelado de duas maneiras: em banho-maria a 75°C por sete segundos e a 37°C. Após o descongelamento, as amostras de sêmen dos dois protocolos de descongelamento foram mantidas à temperatura de 37°C e avaliadas quanto à motilidade, vigor, teste hiposmótico e teste supravital (eosina-nigrosina) (Barth e Oko, 1989). A longevidade foi avaliada pelo teste de termorresistência (TTR), com o sêmen mantido a 37°C, por, no máximo, 90 minutos. As avaliações foram realizadas nos momentos 0, 20, 40, 60 e 90 minutos após o descongelamento. No momento zero, foram avaliados motilidade, vigor, Hos-t e supravital; nos demais momentos, foram analisados apenas a motilidade progressiva e o vigor.

Os dados de motilidade, reação ao Hos-t e viabilidade espermática foram analisados pelo teste do qui-quadrado, e os dados de vigor espermático, pela análise de variância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A curva de resfriamento do sêmen, ao se utilizar o protocolo CR, é mostrada na Fig. 1, incluindo-se as taxas médias de resfriamento. A velocidade de resfriamentos foi mais lenta inicialmente, até a temperatura atingir 10°C. A taxa média de queda de temperatura entre 20 e 10°C foi de –0,4°C/minuto. Quando o tubo de ensaio com as

palhetas foi retirado do recipiente plástico e colocado diretamente no ambiente da geladeira (35 minutos após o início do resfriamento), a taxa média de redução da temperatura passou para –0,8°C/minuto. O tempo médio para atingir a temperatura de 5°C foi de 45 minutos. Vários trabalhos afirmaram que o choque térmico pelo frio é mais pronunciado quando o resfriamento ocorre de maneira rápida. A severidade desse efeito é dependente da curva de resfriamento e ocasiona mudanças irreversíveis na membrana plasmática do espermatozóide, tornando-a incapaz de realizar suas atividades metabólicas, o que provoca rupturas e perdas dos seus componentes celulares. O intervalo de temperatura em que os efeitos são mais pronunciados ocorre entre 19 e 10-8°C, e a velocidade de resfriamento, entre –0,1 a –0,05°C/minuto (Kayser et al., 1992; Moran et al., 1992; Watson, 1995; Graham, 1996). Neste trabalho, a velocidade de resfriamento entre 25 e 10°C foi, em média, –0,4°C/minuto, semelhante à observada por Vidament et al. (2000), que também resfriaram o sêmen equino antes do congelamento, utilizando taxas de resfriamento que variaram de –0,8 a –0,3°C/minuto entre as temperaturas de 20 e 10°C.

A taxa de motilidade total do sêmen congelado com resfriamento prévio foi superior ($P<0,05$) à do protocolo sem resfriamento, tanto no descongelamento a 75°C (44,0% *versus* 24,5%), quanto a 37°C (46,7% *versus* 25,20%), respectivamente (Fig. 2 e 3). Dentro de cada protocolo, a temperatura de descongelamento (75 ou 37°C) não afetou ($P>0,05$) a taxa de motilidade total. Pode-se deduzir que o resfriamento do sêmen, antes de seu congelamento, proporcionou melhor proteção aos espermatozoides e, com base nos testes hiposmótico e supravital, provavelmente as membranas espermáticas sofreram menores danos durante todo o procedimento. Vidament et al. (2000), ao utilizarem o diluidor INRA82, compararam o sêmen resfriado para 4°C, em uma hora, antes do envase/congelamento, com o sêmen congelado diretamente a partir de 23°C e verificaram melhor motilidade espermática para o congelado após o resfriamento prévio.

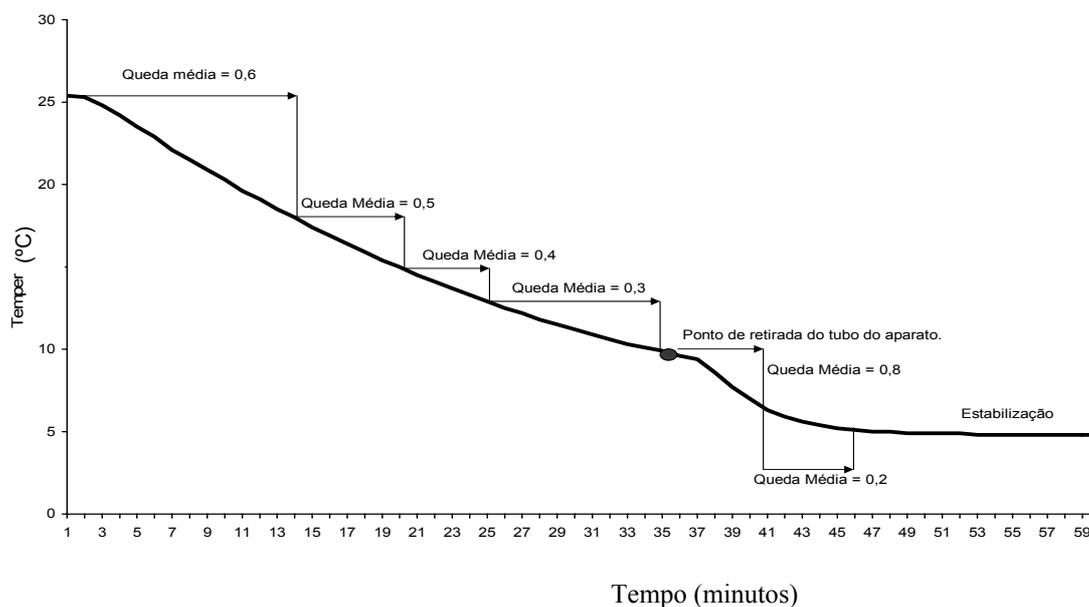
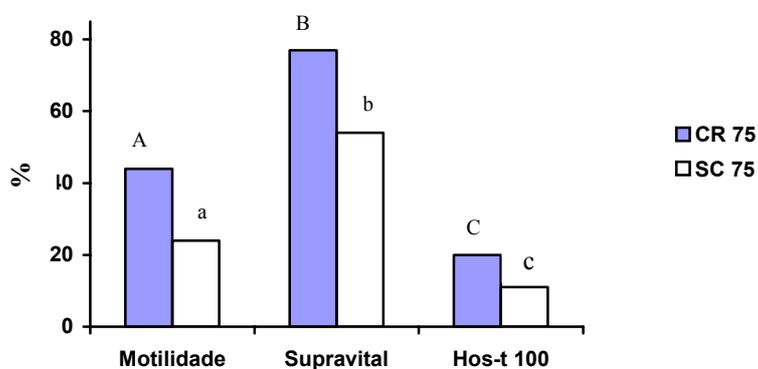


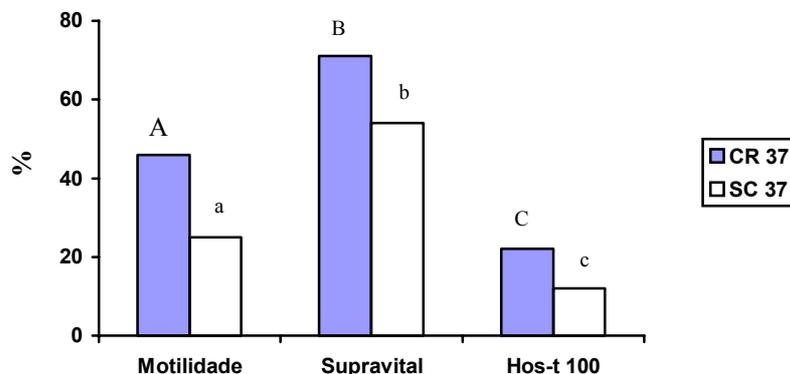
Figura 1. Curva de resfriamento do sêmen até 5°C, no protocolo 1.



Letras distintas na avaliação dos parâmetros indicam diferenças ($P < 0,05$).

Figura 2. Avaliação da motilidade total, do teste supravital (eosina-nigrosina) e Hos-t 100 (teste hiposmótico) do sêmen resfriado antes do congelamento (CR) e sem resfriamento (SC) – descongelamento a 75°C.

Efeito do resfriamento do sêmen equino...



Letras distintas na avaliação dos parâmetros indicam diferenças (P<0,05).

Figura 3. Avaliação da motilidade total, do teste supravital (eosina-nigrosina) e Hos-t 100 (teste hiposmótico) do sêmen resfriado antes do congelamento (CR) e sem resfriamento (SC) – descongelamento a 37°C.

Heitland et al. (1996) compararam o sêmen congelado a partir de 20°C com o sêmen resfriado previamente a 5°C, antes do congelamento, em dois tempos de resfriamento (2,5 e 5 horas). Observaram melhor motilidade espermática para o sêmen resfriado, antes do congelamento, quando utilizaram o diluidor de leite em pó-gema de ovo, mas não quando utilizaram lactose-EDTA. Possivelmente, o diluidor de lactose não conferiu proteção ao sêmen para maiores tempos de resfriamento, diferentemente do observado neste experimento, em que o tempo de resfriamento e a estabilização foram de 60 minutos. Vidament et al. (2000), ao utilizarem o INRA82 como diluidor, também verificaram melhor motilidade espermática pós-descongelamento para o sêmen resfriado a 4°C por uma hora em relação ao submetido a quatro horas de resfriamento.

A avaliação do sêmen pelo teste supravital apresentou resultados semelhantes à avaliação pela motilidade. O sêmen congelado com resfriamento prévio apresentou maior porcentagem (P<0,05) de espermatozoides vivos, após o descongelamento, que o do protocolo SC (Fig. 2 e 3), tanto no descongelamento a 75°C (77,36 versus 54,1%) quanto a 37°C (71,0 versus 54,6%), respectivamente. Também não houve efeito da temperatura de descongelamento sobre o teste supravital, dentro de cada protocolo. Não

se observou correlação entre motilidade e número de espermatozoides vivos. Zuccari (1998) relatou diferença considerável entre os percentuais de células móveis e espermatozoides com membrana plasmática íntegra, sendo a motilidade pós-descongelamento de 40% e o número de espermatozoides íntegros de 21%.

Após a avaliação do sêmen descongelado pelo teste hiposmótico, independentemente do tipo de descongelamento a 75 ou 37°C (Fig. 2 e 3), verificaram-se 20,4% de reação ao Hos-t 100 para o tratamento com resfriamento prévio antes do congelamento *versus* 10,8% para o sem resfriamento (P<0,05). Comparando-se o Hos-t 100 do sêmen fresco (31,5%) com o do sêmen congelado no protocolo CR (20,4%) ou no SC (10,8%), observou-se redução (P<0,05) da integridade da membrana da ordem de 35,2 e 67,7%, respectivamente. O resfriamento do sêmen antes de seu congelamento, aparentemente, conferiu maior eficiência na preservação da integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides, provavelmente por protegê-la contra o choque térmico na faixa crítica entre 19 e 8°C. Os resultados de Hos-t 100 para o protocolo CR foram superiores aos encontrados por Cottorello (2002), que também avaliou sêmen equino congelado usando esse mesmo teste.

Na avaliação da longevidade do sêmen descongelado, observou-se que, independentemente do protocolo de congelamento, houve queda da motilidade espermática, ao longo do TTR. Dentro do mesmo protocolo, não foram observadas diferenças ($P>0,05$) de motilidade espermática, quando se compararam as duas formas de descongelamento (Fig. 4A e 4B). Borg et al. (1997), ao compararem o descongelamento do sêmen equino a 75 e a 37°C, também não encontraram diferenças na motilidade espermática e na porcentagem de espermatozoides vivos. Vidament et al. (2001), ao estudarem a motilidade espermática do sêmen descongelado a diversas temperaturas e tempos de descongelamento (37°C e 30seg, 50°C e 10seg, 50°C e 20seg, 60°C e 10seg, 75°C e 5seg, 75°C e 10seg e 75°C e 15seg), não observaram diferenças entre os tratamentos, exceto para o descongelamento a 75°C e 15 segundos, que diferiu dos demais, quando a motilidade foi zero.

Com relação à motilidade espermática ao longo do TTR, verificaram-se diferenças ($P<0,05$) entre os tratamentos, independentemente do método de descongelamento (Fig. 4C e 4D). No protocolo com resfriamento prévio, observou-se melhor motilidade, em ambos os descongelamentos. A diferença em relação ao protocolo SC manteve-se até o final do TTR. Vidament et al. (2000) e Heitland et al. (1996) também verificaram melhor motilidade pós-descongelamento para o sêmen submetido ao resfriamento antes do congelamento.

Embora o declínio da motilidade possa ser explicado com base em mudanças no transporte ativo e na permeabilidade da membrana plasmática da região da cauda do espermatozoide, é possível que alteração na

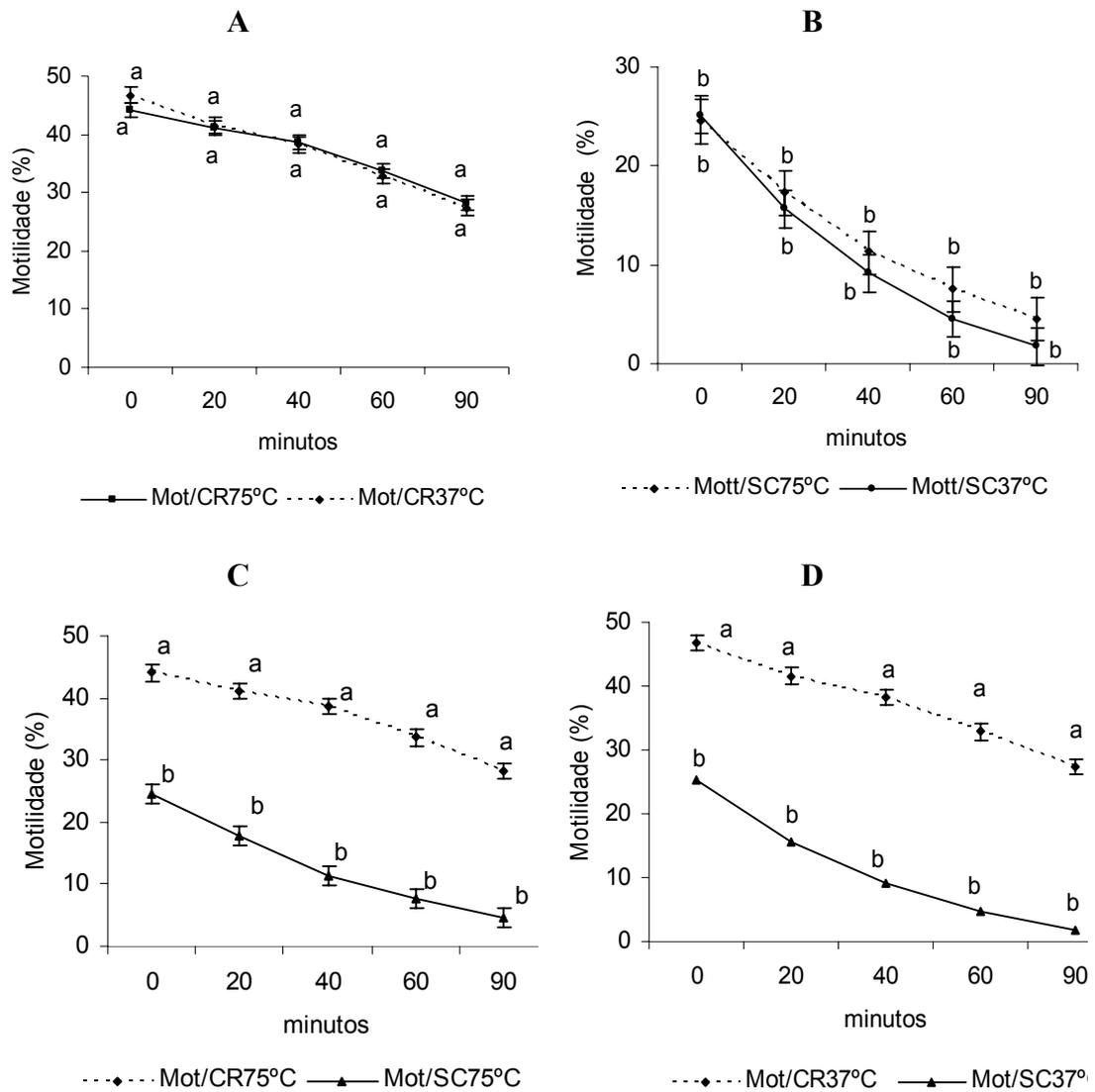
energia disponível ou danos aos elementos do axonema possam contribuir para esse declínio. Dessa forma, são esperados resultados de baixa motilidade, sem encontrar alto nível de lesão na membrana plasmática (Watson, 1995). Esse fato pode explicar os menores valores de motilidade durante o TTR para o tratamento sem resfriamento prévio, pois, ao se compararem os protocolos com resfriamento prévio, no momento do descongelamento, a redução dos valores da integridade de membrana (teste supravital) foi 25%, ao passo que a diferença de motilidade entre eles foi 45%.

Durante o TTR, o vigor espermático foi superior ($P<0,05$) para o sêmen congelado com resfriamento prévio, em ambas as temperaturas de descongelamento (Fig. 5C e 5D). Independentemente do procedimento de congelamento, o vigor foi maior ($P<0,05$) quando o descongelamento foi realizado a 75°C por sete segundos (Fig. 5A e 5B). Segundo Zhao e Buhr (1996), o congelamento reduz a atividade da enzima Ca-ATPase envolvida na motilidade espermática. Possivelmente, o descongelamento a 75°C, associado ao resfriamento prévio do sêmen, conferiu maior proteção às membranas espermáticas e às enzimas ATPases. Cochran et al. (1984) compararam o descongelamento do sêmen a 75°C por sete segundos com o de 37°C por 30 segundos e verificaram melhor taxa de motilidade pós-descongelamento para o primeiro protocolo.

CONCLUSÕES

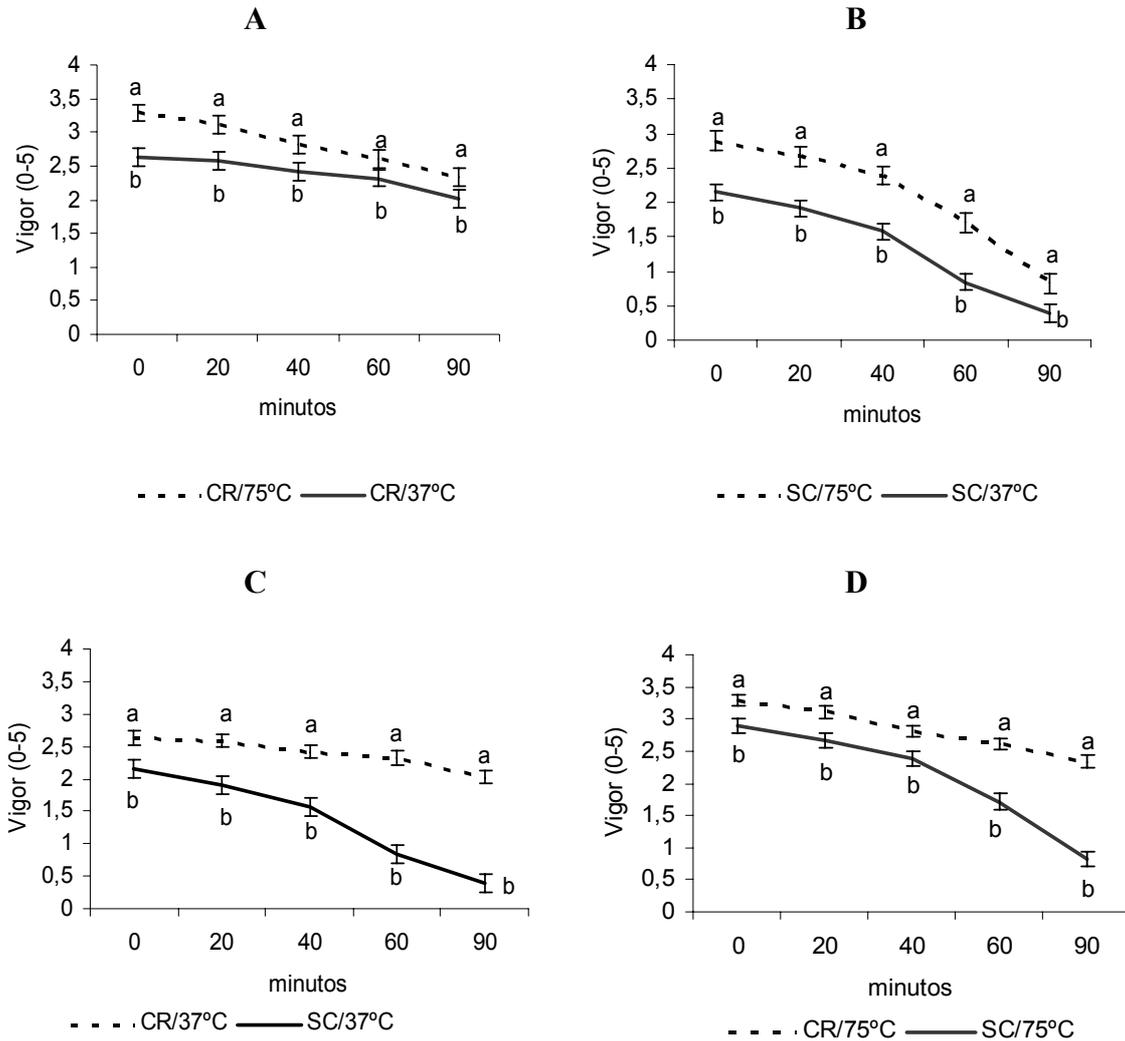
O resfriamento prévio antes do congelamento foi benéfico ao sêmen equino, conferindo maior longevidade aos espermatozoides no pós-descongelamento.

Efeito do resfriamento do sêmen equino...



Letras distintas nas curvas indicam diferenças ($P < 0,05$) entre tratamentos.

Figura 4. Motilidade total (%) durante o teste de termorresistência (TTR) do sêmen congelado com resfriamento prévio (CR) e sem resfriamento (SC), descongelados a 75°C e a 37°C.



Letras distintas nas curvas indicam diferenças (P<0,05) entre tratamentos.

Figura 5. Vigor espermático do sêmen submetido ao resfriamento antes do congelamento (CR) e sem resfriamento (SC) em duas temperaturas de descongelamento (75 e 37°C), durante o teste de termoresistência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARTH, A.D.; OKO, R.J. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Ames, IA: Iowa State University, 1989. 285p.

BORG, K.; COLEBRANDER, B.; FAZELI, A. et al. Influence of thawing method on motility, plasma membrane integrity and morphology of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v48, p.531-536, 1997.

COCHRAN, J.D.; AMANN, R.P.; FROMAN, D.P. 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.2, p.25-28, 1984.

CORREA, J.R.; ZAVOS, P.M. The hypoosmotic swelling test: its employment as assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membranes. *Theriogenology*, v.42, p.351-360, 1994.

- COTTORIELLO, A.C. *Criopreservação de sêmen eqüino utilizando associação do etilenoglicol e glicerol*. 2002. 47f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- FÜRST, R. *Efeito do resfriamento do sêmen eqüino sobre sua congelabilidade*. 2002. 46f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- GRAHAM, J.K. Analysis of stallion sêmen and its relation to fertility. *Vet. Clin. North Am.: Equine Pract.*, v.12, p.119-130, 1996.
- HEITLAND, A.V.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L. et al. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Equine Vet. J.*, v.28, p.47-53, 1996.
- JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. *Ars Vet.*, v.10, p.156-165, 1994.
- KAYSER, F.P.; AMANN, R.P.; SHIDELER, R.K. et al. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.38, p.601-614, 1992.
- KLOPPE, L.H.; VARNER, D.D.; ELMORE, E.G. et al. Effect of insemination timing on the fertilizing capacity of frozen/thawed equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.29, p.429-439, 1988.
- MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GUNZEL, A. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J. Reprod. Fertil.*, suppl.27, p.47-51, 1979.
- MORAN, D.M.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L. et al. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.38, p.999-1012, 1992.
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v.38, p.209-222, 1992.
- QUINN, P.J.; CHOW, P.Y.W.; WHITE, I.G. Evidence that phospholipids protect ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J. Reprod. Fertil.*, v.60, p.403-407, 1980.
- VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L. et al. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*, v.29, p.1043-1055, 1988.
- VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P. et al. Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.54, p.907-919, 2000.
- VIDAMENT, M.; YVON, J.M.; COUTY, G. et al. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA 82. *Anim. Reprod. Sci.*, v.68, p.201-218, 2001.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.7, p.871-891, 1995.
- ZHAO Y.; BUHR M.M. Localization of various ATPases in fresh and cryopreserved bovine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, v.44, p.139-148, 1996.
- ZUCCARI, C.E.S.N. *Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina*. 1998. 121f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.