

Viabilidade do sêmen equino armazenado em sistema de polietileno para transporte por oito horas

Viability of Equine Semen Stored in a Polyethylene System for Transport for Eight Hours

Alisson Ceccato Maciel¹, Vinicius Camargo², Rodrigo Costa Mattos¹ & Sandra Fiala Rechsteiner^{1,3}

ABSTRACT

Background: Equine semen storage and shipment, being it colled or frozen, allows the veterinarian to direct matings, providing the use of genetically superior stallions, which are mostly located in breeding stations or training centers. Achieving good pregnancy rates depends, beyond the moment of artificial insemination (AI), on factors related to the semen cooling, such as: system used for transport, cooling rate, final storage temperature, storage time and individual variation among stallions, such as age and resistance to cooling. Based on these aspects, this experiment was conducted in order to test a polyethylene system to ship equine semen.

Materials, Methods & Results: A total of 87 ejaculates from five stallions with known fertility were used. The stallions aged between 6 to 14 years old, being three Thoroughbred and two Miniature Pony horse. The ejaculates were collected twice a week using a Hannover artificial vagina. After each collection, the semen sample was macroscopically evaluated for appearance, color and smell. A semen sample was used to evaluate the parameters of total motility, vigor and concentration, being these last three parameters assessed by counting 100 sperm cells for analysis. These analysis were performed using an optical microscope, being the concentration taken with a Neubauer chamber after dilution of 1:20 (semen: citrate formol). Subsequently to this, the semen was diluted 1+1 (diluent+semen) with skim UHT milk, and divided into four aliquots of equal volume, yielding a total of four groups. In the control group (GC) the semen was analyzed immediately after dilution (zero h - 0-h). Samples from other groups were stored for eight h (8-h) in three different devices: Equitainer® (GE), BotuFLEX® (GB) or Polyethylene System - Cooled (SP) and non-Cooled (SPN). During storage of the samples the cooling curve of the system under study was evaluated, using a digital thermometer. To estimate the sperm viability, the parameters of total sperm motility and vigor were evaluated, the integrity of plasma membrane were evaluated using CFDA / PI, and the plasma membrane functionality using the hiposmotic test (HOST), being also examined the percentage of spermatozoa considered morphologically normal (sperm morphology). The SP showed a PM integrity and sperm morphology as the only parameters that did not occur a statistical difference when compared to Equitainer® and the BotuFLEX® (averages of the CFDA/PI = 71.12%, 73.29%, 71.32 and averages of morphology = 80.50%, 82.29% and 81.28%, respective values of each parameter to SP, GE and GB, while SPN showed mean values lower than the GC and GE for all parameters (averages of total motility = 50.65% and 62, 60%; averages of vigor = 1.78 and 2.43; averages of CFDA/PI = 72.56% and 78.30%; averages of HOST = 43.56% and 48.87%; averages of morphology = 77.17% and 84.82%, respectively for SPN and GE). Compared to BotuFLEX®, the SPN had no significant difference only for the parameter of PM functionality (HOST).

Discussion: The average temperature of SP was 18.0°C, and the SPN was 18.2°C. The SP was equal or similar to the other used systems, but the SPN showed no difference when compared to PS. However NPS was worse than the other systems from this experiment. These results show that the PS might be an alternative to ship equine semen for eight h, compared to the other cooled systems studied in this work.

Keywords: equine, cooled semen, passive cooling device.

Descritores: equino, sêmen resfriado, sistema de transporte passivo.

INTRODUÇÃO

A inseminação artificial é a base para outras biotecnologias da reprodução em equinos [4]. Na espécie equina a refrigeração e o transporte de sêmen para inseminação artificial são largamente utilizados [11], sendo que o procedimento é rotina desde o final da década de 80 [9].

Apesar da melhora em termos de desempenho reprodutivo, através da aplicação de novas tecnologias e técnicas de manejo, alguns obstáculos ainda persistem na produção equina.

Atualmente existem diferentes metodologias e tipos de sistemas para o transporte de sêmen equino, porém alguns veterinários, ao transportar o sêmen por um trajeto curto, ainda insistem em colocar o mesmo em caixas de isopor, sem refrigeração ou mantendo-o em contato direto com a fonte de resfriamento.

Analisando o atual mercado de sistemas refrigerados para o transporte de sêmen, este estudo teve como objetivo geral verificar a eficiência de um sistema de Polietileno para o transporte de sêmen equino refrigerado por um período de até oito horas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal (REPROLAB) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em Porto Alegre.

Animais

Foram utilizados cinco garanhões saudáveis, com fertilidade comprovada, com idades entre 6 e 14 anos de idade, sendo três da raça Puro Sangue Inglês e dois da raça Pônei Miniatura Brasileiro. Todos os animais se encontravam em atividade sexual, com produção espermática estabilizada. O regime adotado foi de duas coletas semanais, realizadas em um intervalo de 48 h uma da outra, resultando em um total de 87 ejaculados utilizados, sendo 64 deles para a avaliação do Sistema de Polietileno Refrigerado (SP) e 23 para o Sistema de Polietileno Não-Refrigerado (SPN).

Todos os animais se encontravam no mesmo local, e sujeitos às mesmas condições sanitárias e de manejo, mantidos em piquetes individuais, com pastagem nativa composta predominantemente por espécies de ciclo estival (gramíneas e leguminosas perenes),

suplementados com alfafa e aveia branca em grãos duas vezes ao dia, com sal mineral e água *ad libitum*.

Coleta e avaliação do sêmen

As coletas de sêmen foram realizadas com vagina artificial (VA) modelo Hannover, utilizando uma égua como manequim. A temperatura interna da VA esteve sempre entre + 42 a + 45°C. A fração gel foi removida com o auxílio de um filtro de *nylon* e o volume do ejaculado mensurado em proveta graduada.

Em seguida, a amostra de sêmen foi avaliada macroscopicamente quanto ao aspecto, coloração e odor, com o objetivo de se eliminar qualquer amostra que apresentasse alguma anormalidade (amostras com urospermia, por exemplo). Uma amostra foi coletada e utilizada para avaliação dos parâmetros de motilidade, vigor e outra para concentração. Estas análises foram realizadas em microscópio óptico, sendo a concentração espermática realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer após diluição na proporção de 1:20 (sêmen : formol citrato). Posteriormente, o sêmen foi diluído na proporção de 1+1 (sêmen + diluente) com leite desnatado^{®1}. Foram analisadas as seguintes características (0-h): motilidade total e vigor espermático através da microscopia óptica, integridade de membrana plasmática (CFDA/PI), funcionalidade de membrana plasmática (HOST) e morfologia espermática (% de espermatozoides normais), através da coloração de Cerovsky, sendo estes últimos três parâmetros avaliados através da contagem de 100 células espermáticas por análise.

Em seguida, a amostra foi dividida em três alíquotas de 15 mL para armazenamento, as quais foram mantidas em três diferentes sistemas de armazenamento e transporte de sêmen por um período de oito h: Equitainer II^{®2}, BotuFLEX^{®3} ou Sistema de Polietileno - Refrigerado (SP)⁴ e o Não Refrigerado (SPN)⁴. O BotuFLEX[®] foi sempre mantido a 5°C, utilizando um tubo Falcon com água em seu interior com o objetivo de perfazer o volume total de armazenamento, o mesmo sendo realizado também no Equitainer II[®]. Quanto à utilização dos diferentes Sistemas de Polietileno - SP e o SPN - o mesmo ocorreu de forma individualizada e distinta: algumas amostras foram armazenadas no SP, enquanto outras, de dias diferentes, armazenadas no SPN. No entanto, as duas formas de armazenamento foram realizadas dentro do mesmo período do ano, e de forma aleatória.

Transcorrido o período das oito horas de armazenamento, as amostras foram retiradas dos respectivos sistemas de refrigeração e colocadas em banho-maria à temperatura de 37°C, e novamente avaliadas quanto aos parâmetros de motilidade total, vigor espermático, integridade e funcionalidade de membrana plasmática e morfologia espermática.

Curva de resfriamento Sistema de Polietileno

A avaliação da curva de resfriamento foi realizada concomitantemente ao período de oito h de armazenamento das alíquotas com termômetro digital. Os sistemas estudados foram mantidos em ambiente com temperatura controlada, sempre a 25°C, durante todo o período de armazenamento. O bulbo do termômetro foi mantido no interior do Sistema de Polietileno, evitando o contato do mesmo com a fonte de resfriamento, quando da presença desta. Um observador se manteve na frente do visor por todo o período de avaliação, anotando cada oscilação de temperatura. Um total de quatro amostras foi utilizado para obter os dados de temperatura para cada um dos Sistemas de Polietileno estudados - Refrigerado e Não-Refrigerado, sendo a mensuração dos valores de temperatura feita de forma isolada, ou seja, um sistema de cada vez.

Análise estatística

Os dados são apresentados em médias \pm desvio padrão. Para análise estatística dos resultados obtidos foi realizada análise de variância considerando um delineamento inteiramente casualizado e a comparação de médias entre os tratamentos foi verificada através de teste *Least Significant Difference (LSD)* - (diferença

mínima significativa -DMS), com significância de 5%, utilizando o software Statistix 9.0.

RESULTADOS

Os valores médios de concentração e volume (livre de gel) dos ejaculados obtidos dos cinco garanhões utilizados neste experimento foram, respectivamente, de $139,60 \pm 85,91$ ($\times 10^6$ /mL) e $34,76 \pm 16,60$ (mL).

Nas Tabelas 1 e 2, estão descritos os valores de motilidade total, vigor, CFDA/PI, HOST e morfologia espermática respectivamente para o SP e o SPN.

Conforme observado na Tabela 1, para todos os parâmetros avaliados, não se observou diferença entre o SP e os demais sistemas estudados.

Na Tabela 2, verifica-se que o SPN apresentou valores médios inferiores ao Equitainer® para todos os parâmetros avaliados, exceto a morfologia espermática. Em comparação ao BotuFLEX® o SPN apresentou valores médios inferiores para os parâmetros de motilidade total, vigor espermático, integridade de membrana plasmática (CFDA/PI) e morfologia espermática, não apresentando diferença estatística apenas para o parâmetro de funcionalidade de membrana plasmática (HOST).

As curvas de resfriamento foram obtidas concomitantemente ao período de armazenamento das alíquotas, sempre com os respectivos sistemas avaliados sob as mesmas temperaturas externas, de 25°C, sendo as curvas do SP e do SPN expostas na Figura 1. A temperatura média do SP foi de 18,09°C, e para o SPN foi de 18,22°C.

Tabela 1. Médias e valores de *P* observados após 8 horas de resfriamento no Sistema de Polietileno (SP).

Parâmetro	SP	Equitainer	BotuFLEX
Motilidade Total (%)	45,00 \pm 2,47 ^a	49,29 \pm 2,60 ^a	46,40 \pm 2,60 ^a
Vigor	2,04 \pm 0,97 ^a	2,18 \pm 0,10 ^a	2,01 \pm 0,10 ^a
CFDA/PI (%)	71,12 \pm 1,12 ^a	73,29 \pm 1,49 ^a	71,32 \pm 1,49 ^a
HOST (%)	39,70 \pm 1,27 ^a	41,21 \pm 1,35 ^a	39,76 \pm 1,35 ^a
Morfologia (% normais)	80,50 \pm 1,27 ^a	82,29 \pm 1,25 ^a	81,28 \pm 1,25 ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam valores estatisticamente diferentes ($P < 0,005$).

Tabela 2. Médias e valores de *P* observados após 8 horas de resfriamento no Sistema de Polietileno Não-Refrigerado (SPN).

Parâmetro	SPN	Equitainer	BotuFLEX
Motilidade Total(%)	45,00 ± 2,47 ^a	49,29 ± 2,60 ^a	46,40 ± 2,60 ^a
Vigor	2,04 ± 0,97 ^a	2,18 ± 0,10 ^a	2,01 ± 0,10 ^a
CFDA/PI (%)	71,12 ± 1,12 ^a	73,29 ± 1,49 ^a	71,32 ± 1,49 ^a
HOST (%)	39,70 ± 1,27 ^a	41,21 ± 1,35 ^a	39,76 ± 1,35 ^a
Morfologia (% normais)	80,50 ± 1,27 ^a	82,29 ± 1,25 ^a	81,28 ± 1,25 ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam valores estatisticamente diferentes (*P* < 0,005).

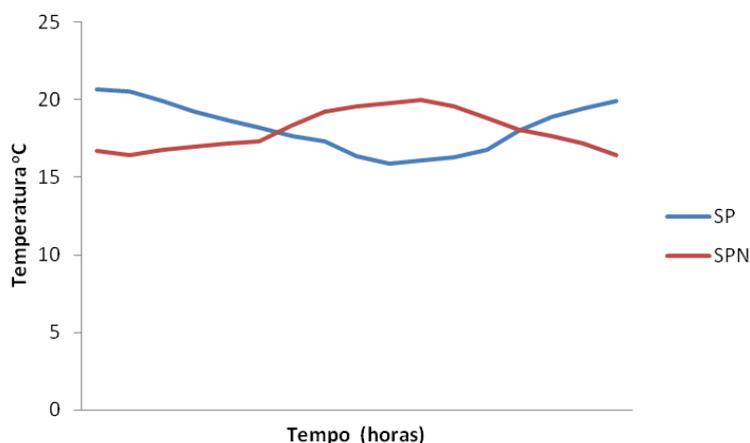


Figura 1. Curva de refrigeração dos Sistemas de Polietileno Refrigerado (SP) e Não-Refrigerado (SPN).

DISCUSSÃO

A refrigeração do sêmen é uma biotécnica utilizada para aumentar a longevidade de espermatozoides fora do trato reprodutivo, o que otimiza o seu uso e, por consequência, aumenta o número de produtos obtidos de animais de genética superior [5]. O ciclo da refrigeração inclui a redução da temperatura, o armazenamento e posterior reaquecimento do sêmen para posteriormente ser utilizado [21], tendo como resultado esperado que a célula espermática mantenha a sua integridade estrutural e função semelhante à célula espermática do sêmen fresco [2].

Muitos fatores interferem na taxa de fertilidade do sêmen refrigerado, como por exemplo, as diferenças individuais inerentes ao ganhão, o processamento do sêmen, o diluente utilizado e a metodologia de refrigeração [3]. A capacidade de prever a fertilidade é melhorada sempre que vários testes sejam utilizados em combinação, além de análises de múltiplas amostras [20].

No presente estudo, a motilidade total e o vigor espermático foram realizados concomitantemente, através da microscopia óptica. Este método permite determinar, de forma subjetiva, uma estimativa da porcentagem de espermatozoides com movimento em um ejaculado [6], bem como o vigor destes movimentos [14]. A motilidade espermática é um dos principais métodos de avaliação de espermatozoides [17], sendo ela um indicador da qualidade da célula espermática e um componente de rotina no exame andrológico do ganhão [7]. A fertilidade no ganhão tem sido associada com a morfologia e a motilidade espermática [12], apesar de que testes de fertilização *in vitro* não foram correlacionados com a motilidade [19].

A motilidade total e o vigor apresentados pelo SP não apresentaram diferença quando comparado ao Equitainer® e ao BotuFLEX®. Ao se avaliar a motilidade total e o vigor espermático apresentado pelo SPN, o mesmo apresentou valores médios inferiores aos demais tratamentos utilizados.

Ainda, esta diminuição da motilidade ocorrida no SPN em comparação aos tratamentos estudados neste trabalho (Equitainer® e o BotuFLEX®) pode ser explicada também em termos de mudanças no transporte ativo e permeabilidade da membrana plasmática [21], sendo que quando o armazenamento ocorre por períodos mais longos, a motilidade total diminui [15].

Apesar desta igualdade apresentada para o parâmetro de motilidade total entre o SP, o Equitainer® e o BotuFLEX®, seus valores médios foram inferiores à motilidade total reportada pelo CBRA [6] para sêmen refrigerado ($\geq 50\%$). O contrário se observou com os valores médios da motilidade total observada no SPN, no Equitainer® e no BotuFLEX®. Apesar de a motilidade total do SPN (50,65%) apresentar diferença em relação a motilidade total do Equitainer® e BotuFLEX® (62,60% e 61,52%, respectivamente), estes valores se apresentaram superiores ao reportado pelo CBRA [6].

No presente estudo, a integridade de membrana foi avaliada através da utilização de duas colorações fluorescentes: CFDA e PI. A utilização conjunta do CFDA com o PI é a forma mais segura para se avaliar a integridade de membrana do que a utilização isolada destes corantes [8].

A ocorrência de danos na membrana espermática devido ao processo de refrigeração [1,15], não foi evidenciada no presente estudo, quando da utilização do SP.

Quanto à funcionalidade de membrana plasmática, comparando os valores encontrados pelo SP e SPN com os demais sistemas refrigerados estudados, o SP não diferiu do Equitainer® nem do BotuFLEX®, sendo que o SPN não diferiu do BotuFLEX®, porém diferiu do Equitainer®.

Para se avaliar a funcionalidade de membrana, o Teste Hiposmótico (HOST) foi o de eleição para nossas avaliações. O HOST foi inicialmente utilizado para avaliar a função da membrana plasmática e a capacidade de fertilização do espermatozoide humano, no entanto, soluções hiposmóticas também têm sido utilizadas para avaliar o espermatozoide equino [16].

A porcentagem de espermatozoides normais do SP não diferiu do Equitainer® nem do BotuFLEX®, já no SPN foi inferior aos demais tratamentos. Apesar das diferenças encontradas entre o SPN e os demais tratamentos para a porcentagem de espermatozoides normais, tanto o SPN quanto o SP apresentaram valores mínimos para este parâmetro de acordo com o que cita

a literatura [6]. Outros autores [18] também demonstraram que o tempo de refrigeração não interferiu nas alterações morfológicas.

Em um estudo que avaliou a fertilidade de 88 garanhões de 13 diferentes raças, foi observada uma relação positiva entre a porcentagem de espermatozoides normais e a porcentagem de prenhez por ciclo e porcentagem de prenhez no primeiro ciclo [13].

As altas médias de temperatura do SP (18,09°C) e do SPN (18,22°C) podem ter sido um fator crucial na não manutenção de algumas características espermáticas estudadas neste trabalho, porém em um transporte de sêmen por um período não superior a 12 h, a temperatura de armazenamento do sêmen pode ser estar entre 20 e 15°C, sendo recomendadas temperaturas inferiores a 10°C para períodos de transporte superiores a estas 12 h [12].

Estudos *in vivo* não foram realizados neste trabalho, porém os resultados apresentados permitem dizer que o SP não causou danos à célula espermática que comprometessem sua integridade de membrana plasmática, dados os valores médios obtidos no presente trabalho quanto aos parâmetros de integridade de membrana plasmática e morfologia espermática.

CONCLUSÃO

O Sistema de Polietileno Refrigerado pode ser utilizado para a conservação do sêmen, uma vez que não acarretou danos ao sêmen equino durante o período de armazenamento estudado. O Sistema de Polietileno Refrigerado não apresentou diferenças em relação aos demais sistemas comerciais estudados, sendo assim, este pode ser indicado como um sistema alternativo para transporte de sêmen equino refrigerado por até oito horas, com vantagem de ser pequeno, prático e de baixo custo.

MANUFACTURERS

¹BR Foods S.A. Curitiba, PR, Brazil.

²Hamilton Research Inc. Ipswich, MA, USA.

³Botupharma Biotecnologia Animal. Botucatu, SP, Brazil.

⁴Thermics®. Montevideo, Uruguay.

Ethical approval. Esta pesquisa foi realizada após avaliação e aprovação do Comitê de Ética em Experimentação animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) - protocolo n° 9918/2012

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 **Amann R.P. & Pickett B.W. 1987.** Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science*. 7: 145-173.
- 2 **Aurich C. 2005.** Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 89(1-4): 65-75.
- 3 **Aurich C. 2008.** Recent advantages in cooled-semen technology. *Animal Reproduction Science*. 107(3-4): 268-275.
- 4 **Aurich J.E. 2012.** Artificial Insemination in Horses – More than a century of practice and research. *Journal of Equine Veterinary Science*. 32: 458-463.
- 5 **Brinsko S., Varner D. & Blanchard T. 2000.** Transported Equine Semen. In: Ball B.A. (Ed). *International Veterinary Information Service (OVIS)*. New York: Recent Advances in Equine Reproduction, pp.207-400.
- 6 **CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2013.** *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 91p.
- 7 **Foster M.L., Varner D.D., Hinrichs K., Teague S., Lacaze K. & Blanchard T.L. 2011.** Agreement between measures of total motility and membrane integrity in stallion sperm. *Theriogenology*. 75(8): 1499-1505
- 8 **Harrison R.A.P. & Vickers S.E. 1990.** Use of fluorescent probe to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 88: 343-352.
- 9 **Heckenbichler S., Deichsel K., Peters P. & Aurich C. 2011.** Quality and fertility of cooled-shipped stallion sêmen at the time of insemination. *Theriogenology*. 75: 849-856.
- 10 **Katila T., Combes G.B., Varner D.D. & Blanchard T.L. 1997.** Comparison of three containers used for the transport of cooled stallion semen. *Theriogenology*. 48: 1085-1092.
- 11 **Loomis P.R. 2006.** Advanced methods for handling and preparation of stallion Semen. *Veterinary Clinics North American Equine Practice*. 22(3): 663-676.
- 12 **Love C.C. & Kenney R.M. 1998.** The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. *Theriogenology*. 50: 955-972.
- 13 **Love C.C. 2011.** Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology*. 76: 547-557.
- 14 **Mies Filho A. 1975.** *Reprodução dos animais e inseminação artificial*. 4.ed. Porto Alegre: Livraria Sulina editora, pp.463-513.
- 15 **Moran D.M., Jasko D.J., Squires E.L. & Amann R.P. 1992.** Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 38: 999-1012.
- 16 **Nie G.J. & Wensel J.G.W. 2001.** Adaptation of hypoosmotic swelling test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. *Theriogenology*. 55: 1005-1018.
- 17 **Pickett, B.W. 1993.** Seminal extenders and cooled semen. In: Mckinnon A.O. & Voss J.L. (Eds). *Equine Reproduction*. 2nd edn. Philadelphia: Lea & Febiger, pp.746-754.
- 18 **Samper J.C. & Morris C.A. 1998.** Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology*. 49: 895-903.
- 19 **Tartaglione C.M. & Ritta M.N. 2004.** Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 62: 1245-1252.
- 20 **Varner D.D. 2008.** Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology*. 70 (3): 448-462.
- 21 **Watson P.F. 1995.** Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*. 7: 871-891.

