

CANCIMANSI, J.A.N., ANDRADE, M.P. e SILVA, J.F.S. Efeito da temperatura na coleta do sêmen eqüino sobre a motilidade ao longo de sua conservação sob refrigeração. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 42, Ed. 147, Art. 987, 2010.



**PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.**

## **Efeito da temperatura na coleta do sêmen eqüino sobre a motilidade ao longo de sua conservação sob refrigeração**

---

Juli Angélica Narváez Cancimansi<sup>1</sup>, Marina Penna Andrade<sup>2</sup>, José Frederico Straggiotti Silva<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Mestranda em Ciência Animal, Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA), Centro de Ciência e Tecnologias Agropecuária (CCTA), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

<sup>2</sup>Médico Veterinário, CCTA, UENF.

<sup>3</sup>Professor Doutor Associado, LRMGA, CCTA, UENF, Campos dos Goytacazes – RJ.

---

### **Resumo**

Quarenta e dois ejaculados foram coletados em vagina artificial (V.A.) modelo Hannover modificada por meio de um dispositivo em forma de “Y” invertido, cujas extremidades desembocam em 2 copos coletores. Um deles é mantido à temperatura ambiente e o outro é resfriado a  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . A superioridade da motilidade da porção do ejaculado coletada no copo refrigerado em relação à coletada no copo à temperatura ambiente, foi mantida após o processamento do sêmen resfriado ( $6 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) em todos os momentos subseqüentes de análise (24, 48 e 72 horas). Em comparação com a coleta em copo convencional, a coleta em copo refrigerado possibilitou a utilização de 38,9% a mais dos ejaculados, considerando o parâmetro de 40% de motilidade mínima

CANCIMANSI, J.A.N., ANDRADE, M.P. e SILVA, J.F.S. Efeito da temperatura na coleta do sêmen eqüino sobre a motilidade ao longo de sua conservação sob refrigeração. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 42, Ed. 147, Art. 987, 2010.

necessária para sua utilização em programas de inseminação artificial com sêmen eqüino resfriado. Tendo em vista os resultados obtidos, recomenda-se a coleta de sêmen eqüino em uma vagina artificial equipada com um copo coletor resfriado à temperatura de  $22 \pm 1$  °C.

**Palavras-chave:** Eqüino, Sêmen, Coleta refrigerada, Motilidade espermática

### **Effect of temperature at the collection of equine semen on motility along its storage under cooling.**

#### **Abstract**

Forty-two ejaculates were collected in an artificial vagina (A.V.), Hannover model, modified by a device in inverted "Y" shape, whose edges flowed into cups, one at room temperature and the other one cooled at  $22 \pm 1$ °C. The better motility of the ejaculate portion collected into the cooled cup compared to the ejaculate collected into the cup at room temperature was sustained after processing the cooled semen ( $6 \pm 1$ °C) at all subsequent moments of analysis (24, 48 and 72 hours). Comparing to the collection with the conventional cup, the collection with the cooled cup has made it possible to use 38.9% more of the ejaculate, considering the parameter of 40% minimum motility required for its use in equine semen cooling programs. Having in mind the obtained results, the collection of equine semen into an artificial vagina equipped with a collector cup cooled at  $22 \pm 1$ °C temperature is recommended.

**Keywords:** Equine, Semen, Cooled collect, Spermatic motility

#### **Introdução**

Os espermatozóides são células especializadas em uma função, a de fertilizar oócitos e, para isto, possuem características específicas. Além de apresentarem um mecanismo eficiente de movimentação, que permite que as células sejam transportadas ao longo do trato reprodutivo feminino para o sítio onde ocorrerá a fertilização, os espermatozóides estão programados a

passarem por alterações celulares seqüenciais, denominadas de capacitação e reação de acrossoma, que são temporalmente e espacialmente essenciais para que ocorra a fertilização do oócito (JASKO, 1992). Quando a manipulação do sêmen para seu resfriamento e/ou congelamento ocorre de forma inapropriada, pode afetar a viabilidade espermática, o desencadeamento da capacitação e reação de acrossoma e, conseqüentemente, a fertilização do oócito.

A primeira etapa da manipulação de sêmen eqüino consiste na sua coleta, que é realizada, principalmente, com o uso de uma vagina artificial (V.A.), para este utilizam-se diferentes modelos de V.A. e diferentes tipos de copos coletores são acoplados a eles (ALLEN, 2005). Imediatamente após a coleta do sêmen, o processo de deterioração dos espermatozóides tem início, portanto, este deve ser minimizado pela diluição e resfriamento do sêmen; se este permanece refrigerado a 4°C pode permanecer viável por até 48-72 horas, mantendo boas taxas de fertilidade (BATALLIER *et al.*, 2001). Em uma revisão, Pickett (1995), demonstrou que à medida que o tempo de armazenamento aumenta, a taxa de fertilidade diminui, principalmente quando o sêmen é armazenado por mais de 12 h a 20°C e 48h a 5°C. Heiskanen *et al.* (1994) demonstraram taxas de prenhez de 65% por ciclo depois de 3 dias de armazenamento do sêmen a 4°C. Carvalho e Papa (2003), avaliando diluentes seminais para armazenamento de sêmen resfriado, obtiveram uma taxa de prenhez de 80%, utilizando sêmen resfriado por 96 horas, demonstrando um aumento da viabilidade espermática devido à eficiência do diluente ITA7.

A manutenção da vida fértil do espermatozóide eqüino é uma ferramenta biotecnológica importante em programas de transporte e inseminação artificial com sêmen resfriado. A tecnologia de resfriamento de sêmen equino vem sendo muito desenvolvida e utilizada por criadores, apesar dos diversos fatores envolvidos que podem afetar a qualidade da célula espermática. O resfriamento do sêmen de garanhões para seu transporte e subsequente inseminação artificial tem se difundido na indústria eqüina. Isto se explica,

principalmente, pela baixa proporção de garanhões (20-40%) cujo sêmen responde bem ao congelamento (VIDAMENT *et al.*, 1997).

Até o momento, poucos trabalhos científicos têm sido desenvolvidos abordando os cuidados com a manipulação do sêmen no momento da coleta. Sabe-se, entretanto, que esta é uma etapa muito importante, já que é quando ocorre uma mudança drástica do ambiente em que se encontram os espermatozoides. Portanto, o procedimento da coleta, independentemente da biotecnologia utilizada, é decisivo para a obtenção de uma boa taxa de prenhes.

O objetivo deste trabalho de pesquisa foi otimizar a conservação de sêmen eqüino refrigerado ( $6 \pm 1$  °C), aumentando sua sobrevida por meio de um resfriamento imediato a uma temperatura de  $22 \pm 1$  °C no momento da coleta e ao longo de seu processamento por meio do desenvolvimento de um copo coletor refrigerado para manter uma temperatura de  $22 \pm 1$  °C no momento da coleta.

### **Material e Métodos**

Quarenta e dois ejaculados de três garanhões sadios da raça Mangalarga Marchador foram usados neste estudo. Os ejaculados foram coletados em vagina artificial modelo Hannover modificada. A vagina artificial modelo Hannover foi modificada por meio de um dispositivo em forma de "Y" invertido, cujas extremidades desembocam em 2 copos coletores. Um deles é mantido à temperatura ambiente e o outro é resfriado a  $22 \pm 1$ °C.

O copo coletor refrigerado se compôs, externamente, por um cano de PVC de 75 mm e, internamente, por um de 50 mm. O espaço entre eles é preenchido com gel de gelo reciclável comercial. Para a realização da coleta, foi colocado um tubo Falcon<sup>®</sup> de 50 ml dentro do cano de 50 mm, para onde uma das porções do ejaculado escoava. A outra porção escoava para um tubo Falcon<sup>®</sup> do mesmo tamanho, que foi envolvido por papel alumínio, para evitar a incidência de luz sobre o sêmen. Tanto a vagina artificial como os condutos

CANCIMANSI, J.A.N., ANDRADE, M.P. e SILVA, J.F.S. Efeito da temperatura na coleta do sêmen eqüino sobre a motilidade ao longo de sua conservação sob refrigeração. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 42, Ed. 147, Art. 987, 2010.

que levavam o sêmen aos copos coletores, eram internamente revestidos por luva plástica para palpação ginecológica de animais domésticos.

O resfriamento do copo coletor ocorreu através do congelamento a  $-20 \pm 1^{\circ}\text{C}$  do gel de gelo reciclável comercial, previamente à sua utilização. Imediatamente após a coleta, verificava-se a temperatura do sêmen contido no copo refrigerado para haver a certificação de que esta não estava abaixo de  $19^{\circ}\text{C}$ , que é o início da faixa crítica de choque térmico de sêmen de eqüino (entre  $19$  e  $8^{\circ}\text{C}$ ).

Imediatamente após a coleta procedeu-se a uma pré-diluição, na proporção de uma parte de sêmen para três partes de diluente. O sêmen foi diluído com o diluente SouzaSilva 1 (10% de leite em pó desnatado em água bidestilada acrescido de 0,4g Agrovét®) (SOUZA *et al.*, 2001) diretamente nos recipientes em que se encontravam (tubo Falcon® resfriado x convencional). O diluente foi adicionado às duas porções de sêmen à temperatura ambiente ( $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ). Uma platina térmica específica para a leitura computadorizada, equipada de uma câmara de  $20 \mu\text{m}$  de profundidade, foi preenchida com o sêmen diluído.

A determinação da concentração e análise da motilidade espermática, foram feitas com a utilização do Analisador de motilidade Hamilton Torn Research® (HTM-CEROS-versão 10.8).

Depois de determinadas a motilidade total e progressiva, o sêmen teve sua concentração final ajustada a  $50 \times 10^6$  spz./ml, para a conservação das amostras sob refrigeração.

Após a diluição final do sêmen, uma amostra deste foi colocada entre lâmina e lamínula e mantida por 3 minutos sobre a placa aquecedora à temperatura de  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Cinco campos foram selecionados, sendo determinadas a motilidade total e progressiva. Imediatamente após a diluição das amostras, a porção coletada no copo refrigerado era mantida em banho-maria (à temperatura de  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , volume 200 mL de água) por cerca de 15 minutos e a porção coletada no copo convencional, mantida à temperatura ambiente ( $25-29^{\circ}\text{C}$ ). Em seguida, os dois tubos contendo as amostras já

diluídas, foram colocados em um mesmo recipiente contendo água que foi submetido à temperatura de  $6 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , tendo-se início, então, a curva de resfriamento (velocidade de  $0,05^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ).

O mesmo procedimento de leitura da motilidade total e progressiva descrito acima para a análise foi realizado às 24, 48 e 72 horas pós-resfriamento.

O experimento foi montado utilizando-se 03 garanhões, sendo os ejaculados organizados sob a forma de sub-blocagem para a análise de variância de dois tratamentos com 42 repetições para a análise imediatamente pós-coleta. Trinta e seis destes ejaculados foram analisados 24 horas após o resfriamento, 40 deles, 48 horas após e os 8 restantes, 72 horas após.

### **Resultados e discussão**

A análise computadorizada da motilidade total (média de 42 coletas) no tempo 0 (zero) foi para a porção do sêmen coletado à temperatura ambiente de 64,95%, enquanto que para a porção escoada para o copo refrigerado foi de 75,81%, estando esta diferença assegurada estatisticamente ( $P < 0,0001$ ) (Tabela 1 e Figura 1).

Com relação à motilidade progressiva destas mesma amostras seminais verificou-se também uma diferença altamente significativa entre a porção coletada à temperatura ambiente (28,96%) e a porção coletada de forma refrigerada (40,17%) (Tabela 1 e Figura 2). Segundo Jasko (1994), ejaculados com motilidade progressiva menor que 40% após a diluição não são recomendáveis para programas de resfriamento, isto significa que utilizando-se a metodologia de coleta em copo resfriado obteve-se uma maior quantidade de ejaculados recomendáveis a serem utilizados em programas de inseminação artificial com sêmen resfriado que quando coletou-se utilizando-se o copo coletor convencional.

CANCIMANSI, J.A.N., ANDRADE, M.P. e SILVA, J.F.S. Efeito da temperatura na coleta do sêmen eqüino sobre a motilidade ao longo de sua conservação sob refrigeração. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 42, Ed. 147, Art. 987, 2010.

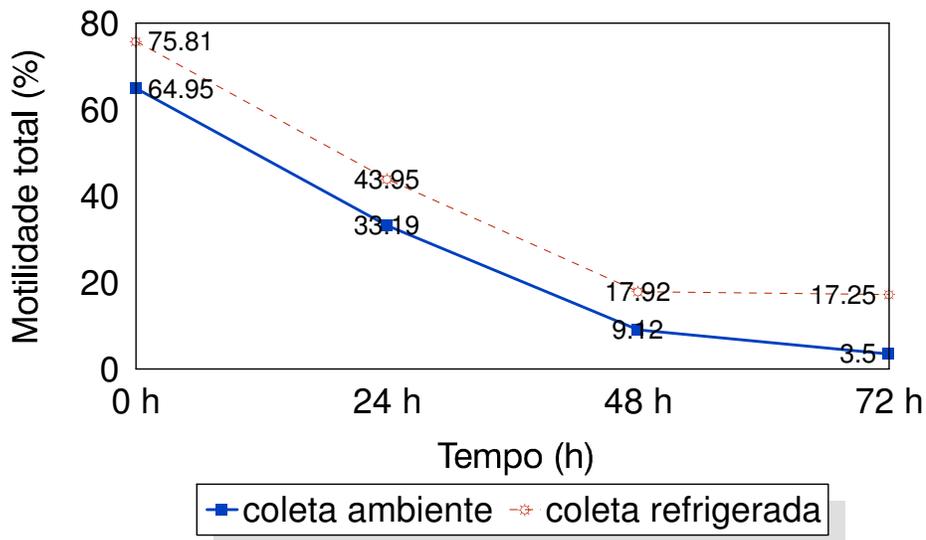
**Tabela 1:** Motilidade Total e Progressiva de amostras de sêmen eqüino coletadas à temperatura ambiente e a 22°C.

Tempo	motilidade	n	Tratamento			
			1 (% média)	2 (% média)	Valor - P	CV(%)
0	MT	42	64,95	75,81	<0,0001	11,3
	MP	42	28,96	40,17	<0,0001	24,8
24	MT	36	33,19	43,95	<0,0001	21,8
	MP	36	9,51	12,99	<0,0034	37,8
48	MT	40	9,12	17,92	<0,0001	46,8
	MP	40	4,43	9,69	<0,0020	76,1
72	MT	8	3,5	17,25	<0,0035	61,3
	MP	8	1,25	8,5	<0,011	86,9

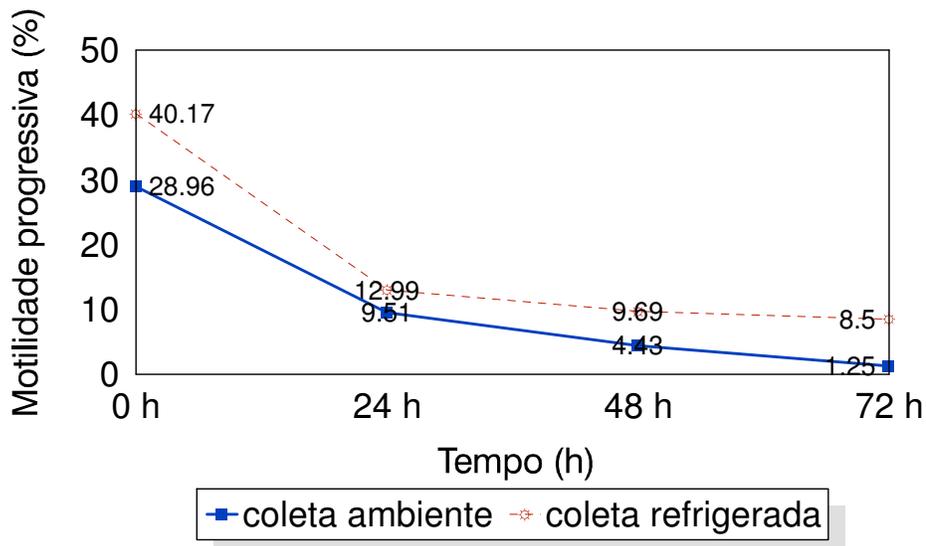
A superioridade da motilidade da porção de sêmen coletado de forma refrigerada, manteve-se assegurada estatisticamente em relação à porção coletada à temperatura ambiente nos três tempos (24, 48 e 72 horas pós-coleta).

Na análise nos percentuais de motilidade descrita acima, correspondentes as figuras 1 e 2, verifica-se uma queda, tanto da motilidade total como progressiva no decorrer da conservação do sêmen resfriado, isto é, às 24 h, 48 h e 72 h, tal fato explica e corrobora com Pickett (1995) que demonstrou que à medida que o tempo de armazenamento do sêmen resfriado aumenta a taxa de fertilidade diminui.

Cabe ressaltar que não foi feita uma avaliação prévia da motilidade espermática da população estudada, para verificar se os valores mínimos preconizados por Jasko (1994) estavam sendo atendidos, já que este trabalho tem como objetivo principal verificar as diferenças dentro das metodologias de coleta. Para serem efetivamente usados em programas de resfriamento de sêmen, os ejaculados são analisados de forma individual no sentido de verificar se preenchem os requisitos mínimos para serem utilizados em tais programas.



**Figura 1:** Efeito do copo coletor à temperatura ambiente *versus* o copo coletor resfriado sobre a motilidade total (MT) em garanhões.



**Figura 2:** Efeito do copo coletor à temperatura ambiente *versus* o copo coletor resfriado sobre a motilidade progressiva (MP) em garanhões.

A motilidade progressiva é um dos atributos importantes na avaliação do potencial fertilizante de uma amostra seminal de eqüino, portanto concentrou-se, neste trabalho de pesquisa, numa análise mais detalhada desta característica seminal quando superior a 40%, visto ser um parâmetro

CANCIMANSI, J.A.N., ANDRADE, M.P. e SILVA, J.F.S. Efeito da temperatura na coleta do sêmen eqüino sobre a motilidade ao longo de sua conservação sob refrigeração. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 42, Ed. 147, Art. 987, 2010.

indispensável, de acordo com Jasko (1994), para que ejaculados sejam recomendáveis a serem utilizados em programas de resfriamento de sêmen eqüino.

Na avaliação da motilidade progressiva (MP) verificou-se que, das 42 coletas seminais executadas neste trabalho, 18 apresentaram uma motilidade progressiva acima de 40%, quando o ejaculado coletado fluía para o copo coletor resfriado; enquanto que quando fluía para o copo convencional, apenas 11 desses ejaculados apresentaram a MP acima de 40%.

A média verificada para a motilidade progressiva dos 18 ejaculados coletados em copo resfriado foi de 58,72 %, enquanto que para a porção dos mesmos ejaculados que fluíram para o copo convencional, encontrou-se uma média de 41,05 %.

Portanto, a coleta em copo resfriado possibilitou a utilização de 38,9% dos ejaculados a mais do que quando coletados de forma convencional. Sete dos 18 ejaculados que escoaram para o copo à temperatura ambiente, apresentaram uma motilidade progressiva abaixo de 40% que, de acordo com Jasko (1994), seria o limite para a utilização do ejaculado em programas de inseminação com sêmen resfriado.

Os dados resultantes deste estudo apresentam maior relevância para regiões de clima quente, como é o caso do hemisfério sul, onde os meses de outubro a março são os mais quentes e correspondem ao período da estação fisiológica de monta em eqüinos. É muito importante ressaltar que a temperatura ambiente teve influência sobre a temperatura do copo resfriado, já que o controle da temperatura acima da faixa de choque térmico para sêmen de eqüino, era possível somente em dias quentes. Houve casos de dias com temperaturas mais amenas (23°C) em que a temperatura do copo refrigerado esteve abaixo de 18°C causando motilidade anômala, característica de choque térmico.

O efeito positivo do uso do copo coletor refrigerado sobre a motilidade do sêmen eqüino coletado dentro das condições climáticas ambientais descritas no experimento, foi verificado em todos momentos analisados, corroborando, de

CANCIMANSI, J.A.N., ANDRADE, M.P. e SILVA, J.F.S. Efeito da temperatura na coleta do sêmen eqüino sobre a motilidade ao longo de sua conservação sob refrigeração. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 42, Ed. 147, Art. 987, 2010.

certa maneira, com a recomendação de Jasko (1992) de se iniciar o resfriamento o mais rápido possível após sua coleta.

Uma das possíveis explicações para o efeito positivo do uso do copo coletor resfriado se baseia na temperatura da vagina artificial no momento da coleta. O sêmen encontra-se à temperatura corporal do cavalo e, ao ser ejaculado, entra em contato com a porção posterior da mucosa da V.A., cuja temperatura varia de 42 a 44°C, para então fluir para o copo coletor. De acordo com Jasko (1992), considera-se que a 38°C o metabolismo das células espermáticas seja de 100% e que, a cada 10°C de queda da temperatura, ocorra uma redução de 50% do metabolismo dos espermatozóides. Provavelmente, o maior percentual da motilidade obtido das porções coletadas no copo resfriado, poderia ser explicado pelo fato de haver uma queda mais rápida da temperatura do sêmen após sua ejaculação e contato com a mucosa da vagina artificial. O estresse térmico devido à elevação transitória da temperatura do sêmen ao entrar em contato com a mucosa da V.A., irá, no mínimo, acelerar os processos metabólicos das células espermáticas, precipitando a formação de catabólitos nocivos às diversas funções espermáticas, dentre elas a motilidade. A célula espermática, por ficar em contato com o copo coletor refrigerado durante o intervalo de cerca 5 minutos entre a coleta e análise do sêmen, teria o estresse térmico transitório da coleta revertido mais rapidamente.

A fim de se evitar o choque térmico, foi escolhida uma temperatura do copo coletor refrigerado de  $22 \pm 1$  °C, visto que segundo Watson e Morris (1988), taxas rápidas de resfriamento até 20°C não afetam a motilidade dos espermatozóides eqüinos. A maior motilidade da porção do sêmen coletada no copo refrigerado em relação à coletada à temperatura ambiente demonstrou a insensibilidade dos espermatozóides de desencadarem alterações características de choque térmico, ao entrarem em contato com uma temperatura de  $22 \pm 1$  °C.

Além do efeito da reversão imediata do estresse térmico decorrente da coleta refrigerada, a superioridade da motilidade da porção do ejaculado

CANCIMANSI, J.A.N., ANDRADE, M.P. e SILVA, J.F.S. Efeito da temperatura na coleta do sêmen eqüino sobre a motilidade ao longo de sua conservação sob refrigeração. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 42, Ed. 147, Art. 987, 2010.

coletado no copo refrigerado ( $6 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) em relação ao coletado no copo à temperatura ambiente foi mantida após o processamento do sêmen em todos os momentos subseqüentes de análise (24, 48 e 72 horas).

O presente trabalho de pesquisa trará grandes avanços no processo de resfriamento de sêmen de garanhões, porém é necessário que se investigue mais profundamente se os efeitos benéficos do uso do copo coletor refrigerado terão repercussão na taxa de fertilização das éguas usadas em programas de inseminação com sêmen eqüino resfriado.

### **Conclusões**

A coleta em copo resfriado possibilitou uma maior disponibilidade de ejaculados em relação à coleta realizada de forma convencional, considerando-se o parâmetro de 40% de motilidade progressiva mínima necessária para sua utilização em programas de inseminação artificial com de sêmen eqüino resfriado.

O efeito positivo do uso do copo coletor refrigerado sobre a motilidade do sêmen eqüino coletado dentro das condições climáticas ambientais descritas no experimento, foi verificado em todos momentos analisados.

Tendo em vista os resultados obtidos, recomenda-se a coleta de sêmen eqüino em vagina artificial equipada com um copo coletor resfriado à temperatura de  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

### **Referencias bibliográficas**

Allen, W.R. The Development and Application of the Modern Reproductive Technologies to Horse Breeding. *Reprod Dom Anim.*, 40, 310–329, 2005.

Batallier F., Vidament M., Fauquant J., Duchamp G., Arnaud G., Yvon J.M., Magistrini M. Advances in cooled semen technology. *Anim Reprod Sci* 68, 181–190, 2001.

Carvalho, G.A.; Papa, F.O. Estudo de diferentes diluentes sobre a viabilidade espermática, utilizando-se diversas formas de refrigeração com sêmen eqüino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* V.27, n.3, p.332-334, 2003.

CANCIMANSI, J.A.N., ANDRADE, M.P. e SILVA, J.F.S. Efeito da temperatura na coleta do sêmen eqüino sobre a motilidade ao longo de sua conservação sob refrigeração. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 42, Ed. 147, Art. 987, 2010.

Heiskanen, M.L.; Huhtinen M.; Pirhonen A.; Mäeenpää, P.H. Insemination results with slow-cooled stallion semen stored for 70 a 80h. *Theriogenology*, 42,1043-1051, 1994.

Jasko, D.J. The responses of spermatozoa to cooling and rates of cooling. *Proc. Techniques for Handling and Utilization of Transported Equine Spermatozoa and Embryos*, Colo. State U., Anim. Reprod. Biotech. Lab., p.3-16, 1992.

Jasko, D.J. Procedures for cooling and freezing of Equine Semen *PROCEEDINGS I Equine medicine congress*, São Paulo, Brasil, p. 156-164, 1994.

Pickett, B.W. Retrospective and review. *Biol.Reprod.Monogr*, 1,547-564, 1995.

Souza, G.V; Matta, M. F.R.; Matta, C.G. F. ; Fagundes, B. ; Cruz, G.M. ; Silva, C.L.; van Tilburg, M. F.; Fonseca, C.W. ; Barrabás, N. ; Soares, S.G. ; Souza, V. R. ; Silva, J.F.S. Comparação de antibióticos pró-análise e comerciais adicionados ao diluente seminal glicina-gema na motilidade de espermatozóides conservados a 5°C de garanhões. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.25, n.1, p.450-451, 2001.

Vidament, M.; Dupere, A.M.; Julienne, P.; Evain, A.; Noue, P.; Palmer, E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology* 48,907-917, 1997.

Watson, P.F.; Morris, G.J. Cold shock injury in animal cells. In: *Temperature and Animal Cells*. Ed. K. Bowler and B.J. Fuller. Cambridge, Company of Biologist Limited, pp. 311-340, 1988.