

AVALIAÇÃO FÍSICA DO SÊMEN DE GARANHÕES DA RAÇA CRIOULA PRÉ E PÓS CRIOPRESERVAÇÃO.

CAROLINA BRASIL¹; MARINA OTTE²; LÍDIA FARIAS²; GABRIELA SILVA²; BRUNA DA ROSA CURCIO³; CARLOS EDUARDO NOGUEIRA⁴.

¹Universidade Federal de Pelotas – UFPel – carolinalitchinabrasil@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – UFPel – marinaotte@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – UFPel – curciobruna@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – UFPel – cewn@terra.com.br

1. INTRODUÇÃO

O atual crescimento da raça Crioula no Brasil possibilita investimentos em biotecnologias, resultando em importante avanço genético para a raça. Dentro das biotecnologias reprodutivas difundidas, a criopreservação de sêmen é eficiente em maximizar o uso de garanhões geneticamente superiores, idosos ou já falecidos.

A criopreservação de sêmen é estudada desde a descoberta do agente crioprotetor glicerol em 1949, porém os resultados referentes à conservação da integridade do espermatozóide ainda não são os desejáveis (BARKER & GANDIER, 1957).

Dentre os testes existentes para avaliação, a motilidade espermática é um dos principais métodos de avaliação física da preservação de espermatozoides e constitui um elemento importante na estimativa da viabilidade espermática (KENNEY *et al.*, 1983; VARNER *et al.*, 1988; PICKET, 1992). A avaliação da motilidade espermática determina a percentagem de espermatozoides totais com movimento em um ejaculado. Para se obter uma avaliação mais precisa é possível avaliar a motilidade progressiva que esta relacionada com alta fertilidade (PICKETT, 1992).

O objetivo deste trabalho foi avaliar as características físicas do sêmen pré e pós criopreservação de garanhões da raça Crioula com diferentes idades em distintas estações do ano.

2. METODOLOGIA

Nove garanhões da raça Crioula foram utilizados no estudo. Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com a idade, o grupo 1: pertence aos garanhões de até 10 anos de idade; e o grupo 2: garanhões acima de 10 anos de idade. Estes animais foram mantidos sob um regime regular de colheita de sêmen sendo consideradas duas estações do ano: os meses de outono/inverno e os meses de primavera/verão. Somou-se um total de 95 amostras submetidas à criopreservação e análises.

As coletas de sêmen foram realizadas utilizando vagina artificial modelo Hannover (GOTZE, 1949). A temperatura interna da vagina artificial ficava entre 40° C e 42° C, conforme adaptação do garanhão (MATTOS, 1995).

Inicialmente, para exame macroscópico do sêmen, procedeu-se a avaliação do aspecto do ejaculado, que foi avaliado de acordo com sua consistência e coloração. A seguir foi feita a separação da fração de gel, quando existente, com pipeta Pasteur e filtragem da porção rica do sêmen através de filtro específico. O volume do ejaculado foi determinado em proveta estéril.

A motilidade progressiva e a motilidade total dos espermatozoides foi registrada logo após a filtragem do sêmen. A avaliação das características,

motilidade e vigor foi realizada de forma subjetiva pelo mesmo avaliador, conforme método definido por Kenney et al., 1983.

A motilidade progressiva foi avaliada pela percentagem de espermatozóides que se movimentavam ativamente em círculos amplos e para frente. Considerou-se como motilidade total a percentagem de espermatozóides que apresentavam movimento. Para diminuir erros na observação, no mínimo duas lâminas eram preparadas por amostra, sendo observados no mínimo cinco campos em cada. Para determinação da concentração espermática utilizou-se contagem em câmara hematómetrica (Neubauer), segundo protocolo adaptado de Krause, 1996.

Para a criopreservação dos ejaculados, utilizou-se a técnica descrita por PAPA et. al 2008. Como método de descongelamento utilizava-se banho-maria a temperatura regulada em 37°C e procedia-se com a imersão das palhetas por 30 segundos. Após submetia-se o sêmen para exame físico pós descongelamento e teste de termo-resistência rápido (TTR).

Para análise estatística, foi utilizado o software Statistix 10. No teste de Shapiro-Wilk as variáveis não apresentaram distribuição normal. Para comparação das variáveis dependentes foi utilizado o teste T (Two-sample). O nível de significância foi atribuído aos valores de $p < 0,05$. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (EPM).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação física do sêmen, foi observado que os garanhões do grupo 1, demonstraram motilidade superior pré e pós criopreservação quando comparados aos garanhões do grupo 2, conforme descrito na tabela 1. Entretanto, em garanhões mais velhos (> 10 anos) houve maiores valores de concentração e motilidade pré e pós criopreservação nos meses de outono e inverno em comparação aos garanhões jovens, conforme descrito na tabela 2.

Em relação ao protocolo de criopreservação utilizado em nosso estudo, os resultados da avaliação dos parâmetros utilizando o sistema convencional foram semelhantes aos descritos na literatura com utilização de sistema automatizado. Este achado demonstra que é um método de baixo custo e relativamente simples para a avaliação na qualidade do sêmen após a criopreservação (MAZIERO et. al, 2013).

Foi observada motilidade média geral de 74,44% pré criopreservação. Esta média esta de acordo com o descrito por Hafez & Hafez, 2004, que descreve como motilidade média geral satisfatória pós coleta de sêmen 74,44%.

Goolsby et al., 2004 utilizando diferentes protocolos de criopreservação obteve de 19 a 24% de motilidade pós criopreservação em garanhões da raça Quarto de Milha durante a temporada reprodutiva. Entretanto, em nosso estudo, foi observada uma motilidade média de 34,44% pós criopreservação, sendo superior ao descrito anteriormente, sugerindo maior resistência do sêmen de garanhões da raça Crioula quando submetidos ao processo de criopreservação.

Garanhões de até 10 anos de idade demonstraram ao exame de motilidade progressiva pré e pós criopreservação seminal resultados superiores quando comparados garanhões acima de 10 anos de idade. Este resultado esta de acordo com o descrito por Dowsett & Knott, 1996.

Tabela 1. Comparação das variáveis físicas entre os grupos 1 e 2, motilidade pré criopreservação, vigor pré criopreservação e concentração pré criopreservação, motilidade pós criopreservação e vigor pós criopreservação.

VARIÁVEIS FÍSICAS	Grupo 1	Grupo 2
Motilidade pré criopreservação	81.45 ^a ± 1.47	76.95 ^b ± 1.43
Vigor pré criopreservação	3.16 ^a ± 0.06	3.06 ^a ± 0.06
Concentração	189.9 ^a ± 24.5	169.22 ^a ± 12.85
Motilidade pós criopreservação	41.45 ^a ± 1.64	33.35 ^b ± 1.13
Vigor pós criopreservação	2.9 ^a ± 0.05	2.81 ^a ± 0.05

^{a,b} letras diferentes na linha demonstra diferença significativa entre os grupos (p<0.05).

Tabela 2. Comparação das variáveis físicas entre os grupos 1 e 2 de acordo com as estações do ano (Primavera/Verão e Outono/Verão).

VARIÁVEIS FÍSICAS	Grupo 1		Grupo 2	
	Primavera/Verão	Outono/Inverno	Primavera/Verão	Outono/Inverno
Motilidade pré criopreservação	81.11 ^a ± 1.82	81.59 ^a ± 1.95	70.55 ^a ± 3.20	79.45 ^b ± 1.41
Vigor pré criopreservação	3.11 ^a ± 0.11	3.18 ^a ± 0.08	2.94 ^a ± 0.09	3.10 ^a ± 0.07
Concentração	139.0 ^a ± 22.11	210.73 ^a ± 32.57	133.44 ^a ± 17.57	183.22 ^b ± 16.15
Motilidade pós criopreservação	41.11 ^a ± 2.46	41.59 ^a ± 2.11	29.16 ^a ± 1.62	35.00 ^b ± 1.37
Vigor pós criopreservação	2.88 ^a ± 0.11	2.90 ^a ± 0.06	2.55 ^a ± 0.12	2.91 ^a ± 0.06

^{a b} letras diferentes nas linhas demonstram diferença significativa no mesmo grupo (p<0.05).

A variação na qualidade seminal pré e pós criopreservação demonstrou ser maior nas estações de outono e inverno em garanhões acima de 10 anos de idade. Os dados apresentados confirmam que a criopreservação de sêmen realizada nos meses prévios a estação reprodutiva resultam em melhores resultados na qualidade seminal pós criopreservação em garanhões da raça Crioula. Este resultado é semelhante em garanhões da raça Quarto-de-Milha (WRENCK et al, 2010).

4. CONCLUSÕES

Foram observadas melhores características físicas seminais pré e pós criopreservação em garanhões da raça Crioula com idade superior à dez anos nos meses de outono e inverno, ou seja, anteriores a estação de reprodutiva.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARKER CA, GANDIER SCC. Pregnancy in mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. **Can J Comp Med**, v.21 (2), p.47-51, 1957.

DOWSET T K. F.E KNOTT L. M. The influence of age and breed on stallion semen Department of Farm Animal Medicine and Production The University of Queensland, St Lucia, Australia, **Elsevier**, 1996.

GOOLSBY, HEATHER, A.; B; ELANTON JR, J.R.; PRIEN, S.D. **Journal of Equine Veterinary Science**, pag 314-318, august 2004.

GOTZE, R. **Besamung und Unfruchtbarkeit der Haussaugetiere**. Scharper Verlag, Hannover, 1949.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri/SP: Manole, 2004.

KENNEY, R.M.; HURTGEN, J.; PIERSON, R.; WITHERSPOON, D.; SIMONS, J. **Manual for clinical fertility of the stallion**. Hastings- E.U.A., Society for Theriogenology, 1983.

KRAUSE, D. **Untersuchungen am Bullensperma unter Berücksichtigung der Fertilitäts diagnostischen Bedeutung der Befund**. Tese (Livre Docência em Medicina Veterinária). Escola Superior de Veterinária – Hannover, Alemanha, 1996.

MATTOS, R. **Influencia de diferentes métodos de preservação de sêmen equino sobre a fertilidade, motilidade espermática e contaminação bacteriana**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, UFRGS. 1995.

HARTWIG F. P., LISBOA F. P., MARTIN I., PAPA F.O. Evaluation of Sperm Kinetics and Plasma Membrane Integrity of Frozen Equine Semen in Different Storage Volumes and Freezing Conditions. **Journal of Equine Veterinary Science** 33 (2013) 165-168.

WRENCH, C.R.F. PINTO, G.R. KLINEFELTER , D.J. DIX,W.L. FLOWERS, C.E. FARIN. Effect of season on fresh and cryopreserved stallion semen. **Animal Reproduction Science** 119 (2010) 219–227.

PAPA FO, ZAHN FS, DELL'AQUA JÁ JR., ALVARENGA MA. Utilização do diluente MP50 para a criopreservação do sêmen equino. **Bras J Anim Reprod** 2008; 26:184.

PICKETT, B.W. Seminal extender and cooled semen. In: MCKINNON, A. O. VOSS, J.L.: **Equine Reproduction**, Filadelfia: Lea & Febiger, p. 746- 754. 1992.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L.; GARCIA, M.C.; KENNEY, R. M. Effects of cooling rate and storega temperature on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v. 29, n. 5, p. 1043- 1054, 1988.