

MORFOLOGIA ESPERMÁTICA DE SÊMEN EQUINO: ANÁLISE Á FRESCO E RESFRIADO ATÉ 48 HORAS

NICOLE GREITAS GONÇALVES¹; IZANI ACOSTA BONEL²; CAROLINE VIÉGAS PINTO³; CARINE DAHL CORCINI⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – nicolefreitasg@outlook.com

² Universidade Federal de Pelotas – izanibonel@hotmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – carolineviegas18@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – corcinicd@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia da reprodução compreende todas as técnicas utilizadas como ferramentas para aumentar a eficiência reprodutiva. Dentre elas, está a utilização de sêmen resfriado, que segundo a literatura consegue preservar a célula espermática de forma viável de 24h a 72h, esta preservação se dá pela utilização de diluentes e crioprotetores que tem como função manter a integridade da membrana celular e evitar a formação de cristais de gelo.

A utilização de diluentes no sêmen é importante para manter a qualidade da dose assim como garantir o sucesso na inseminação artificial ou na conservação de material genético, tendo como propósito a preservação da viabilidade dos espermatozoides, aumento da quantidade de doses, facilidade no transporte, assim como melhorar a qualidade da inseminação artificial. Os diluentes podem ser feitos com variações da fórmula de Kenney et al (1975) ou os comerciais que são uma combinação de substância que muda de acordo com a marca e composição específica.

No entanto, o uso bem-sucedido de esperma refrigerado envolve a preservação da célula espermática durante o transporte sem perder a capacidade de fertilização. Portanto, a tecnologia de refrigeração permitiu que o sêmen equino mantivesse uma temperatura mínima de 5°C, prolongando assim a viabilidade do esperma por até 48 horas (SILVA, et.al., 2017). Para saber a viabilidade e a concentração do espermatozoide utilizamos alguns métodos, como: avaliação do aspecto físico, análise microscópica, teste de motilidade, teste de vigor, teste de integridade de membrana e teste de morfologia.

Estudos tem salientado manipulação de agentes estabilizadores de membrana, considerado o sitio primário de dano durante a criopreservação, e implementando uso de antioxidantes, como carotenoides, visando minimizar o estresse oxidativo. Com intuito da introdução de um estabilizador de membrana de origem vegetal, lecitinas de soja comerciais em diferentes apresentações e métodos de adição aos diluentes têm sido utilizadas em estudos na criopreservação de seminal.

O teste de morfologia é importantíssimo para avaliação da qualidade do esperma e sua capacidade de fertilização. A morfologia dos espermatozoides está diretamente relacionada a sua funcionalidade e capacidade de penetrar no óvulo e fertilizá-lo. Os espermatozoides possuem uma estrutura específica, incluindo a cabeça, peça intermediária e cauda. Tal teste permite avaliar se os espermatozoides apresentam anormalidades nessas estruturas, como cabeça piriforme, alongada ou dupla, deformidades na peça intermediária ou na cauda.

Este estudo objetivou avaliar a morfologia de 2 diferentes lipossomas contendo 45% (S45) e 75% (S75) de fosfatidilcolina de soja, em um diluente

comercial (BotuFlex®) e as possíveis concentrações de uso. Avaliou-se a morfologia espermática do sêmen equino fresco e resfriado a 5°C por 48h.

2. METODOLOGIA

Previamente a chegada das amostras, a caixa térmica já era ligada para que reduzisse a temperatura, os lipossomas eram retirados da geladeira, as raques e microtubos identificados.

Foram recebidas 5 amostras de sêmen equino, já diluídas com BotuFlex®, dentro de caixa isotérmica com auxílio de gelos reutilizáveis. Após a chegada das amostras utilizamos uma pipeta de 5mL para quantificar as doses e depois foi feita a divisão em 13 microtubos e adicionados os lipossomas S45 e S75, das seguintes concentrações 10mm, 20mm e 150mm. O primeiro tratamento (T1) é o controle, onde é o sêmen com o diluente; T2: é 1uL de S45 de 10mm; T3: 4uL de S45 de 10mm; T4: 1uL de S45 de 20mm; T5: 4uL de S45 de 20mm; T6: 1uL de S45 de 150mm; T7: 4uL de S45 de 150mm; T8: é 1uL de S75 de 10mm; T9: 4uL de S75 de 10mm; T10: 1uL de S75 de 20mm; T11: 4uL de S75 de 20mm; T12: 1uL de S75 de 150mm; T13: 4uL de S75 de 150mm; na sequência colocamos os microtubos previamente identificamos nas raques e os inserimos na caixa térmica há 5°C.

Realizamos o esfregaço com o sêmen fresco e após 48h. A avaliação morfológica do sêmen foi realizada através das lâminas coradas com panótipo básico. Para a preparação das lâminas foi coletado uma gota de cada tratamento a ser analisada, fazendo o esfregaço e coloração, da seguinte forma: após o esfregaço secar ele foi imerso nos corantes do panótipo básico por 1 minuto. Análise em microscopia de fase sob aumento de 1000 X com óleo de imersão onde foram contadas um total de 200 células, verificando a porcentagem de anormalidades dos espermatozoides em sua cabeça, peça intermediária e cauda, com auxílio de contador manual.

Utilizou-se o programa statistix para avaliação estatística, através da análise ANOVA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela abaixo temos os dados das médias de acordo com o tratamento e os parâmetros morfológicos avaliados, ou seja, espermatozoide normal, cauda dobrada (CD), cauda enrolada (CE), gota proximal (GP), gota distal (GD), cabeça isolada (CI), cauda dobrada com gota (CDG) e cabeça piriforme (PIR).

Tabela 1 – Média dos valores da análise morfológica dos 5 machos, relação entre tempo e tratamento.

Trat	Normal	CD	CE	GP	GD	CI	CDG	PIR
1	135,80 ^{AB}	45,00 ^A	8,60 ^A	5,60 ^A	0,40 ^{AB}	1,60 ^B	0,80 ^A	1,40 ^{AB}
2	128,40 ^B	54,60 ^A	11,20 ^A	2,80 ^{BC}	0 ^B	2,80 ^{AB}	3,61 ^B	0 ^B
3	137,20 ^{AB}	41,20 ^A	13,00 ^A	2,20 ^{BC}	0,60 ^A	4,40 ^{AB}	1,11 ^B	1,40 ^{AB}
4	134,80 ^{AB}	48,20 ^A	11,60 ^A	2,60 ^{BC}	0,40 ^{AB}	2,20 ^{AB}	1,39 ^B	0,20 ^B
5	139,20 ^{AB}	43,40 ^A	10,20 ^A	3,20 ^{ABC}	0,40 ^{AB}	2,20 ^{AB}	0,40 ^{AB}	1,0 ^B
6	132,20 ^B	45,80 ^A	11,40 ^A	3,20 ^{ABC}	0,20 ^{AB}	4,60 ^A	-2,78 ^B	2,60 ^A
7	135,00 ^{AB}	43,40 ^A	14,20 ^A	1,60 ^C	0 ^B	4,60 ^A	3,05 ^B	1,20 ^{AB}
8	122,40 ^B	49,80 ^A	17,80 ^A	4,40 ^{AB}	0,20 ^{AB}	4,40 ^{AB}	2,22 ^B	1,0 ^B
9	142,20 ^{AB}	41,20 ^A	12,20 ^A	1,20 ^C	0 ^B	2,80 ^{AB}	2,22 ^B	0,40 ^B
10	143,60 ^{AB}	37,60 ^A	10,60 ^A	1,80 ^{BC}	0,20 ^{AB}	4,40 ^{AB}	0,40 ^{AB}	1,40 ^{AB}

11	127,60 ^B	53,40 ^A	14,00 ^A	0,80 ^C	0 ^B	2,80 ^{AB}	1,67 ^B	1,40 ^{AB}
12	158,20 ^A	28,20 ^A	9,00 ^A	1,40 ^C	0 ^B	3,00 ^{AB}	3,05 ^B	0 ^B
13	141,60 ^{AB}	41,20 ^A	9,80 ^A	1,80 ^{BC}	0 ^B	4,20 ^{AB}	0,40 ^{AB}	1,0 ^B

Letras maiúsculas distintas (A-B-C) na coluna indicam diferença estatística entre os tratamentos. Abreviaturas: espermatozoide normal (NOR), cauda dobrada (CD), cauda enrolada (CE), gota proximal (GP), gota distal (GD), cabeça isolada (CI), cauda dobrada com gota (CDG) e cabeça piriforme (PIR). Tratamentos: O primeiro tratamento (T1) é o controle, onde é o sêmen com o diluente; T2: é 1uL de S45 de 10mm; T3: 4uL de S45 de 10mm; T4: 1uL de S45 de 20mm; T5: 4uL de S45 de 20mm; T6: 1uL de S45 de 150mm; T7: 4uL de S45 de 150mm; T8: é 1uL de S75 de 10mm; T9: 4uL de S75 de 10mm; T10: 1uL de S75 de 20mm; T11: 4uL de S75 de 20mm; T12: 1uL de S75 de 150mm; T13: 4uL de S75 de 150mm.

Na espécie equina, o total de defeitos entre primários e secundários, não deve ultrapassar 30% (CBRA, 1998) para o sêmen ser comercializado. Ao avaliar os defeitos morfológicos espermáticos podemos perceber que não houve diferença significativa em nenhum tratamento em relação aos defeitos de cauda dobrada e enrolada; contudo nas seguintes anomalias de GP nos tratamentos 1, 7, 9, 11 e 12; GD nos tratamentos: 2, 3, 7, 9, 10, 11, 12 e 13; CI nos tratamentos: 1, 6 e 7; na CDG nos tratamentos: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11 e 12 e PIR nos tratamentos: 2, 4, 5, 6, 8, 9, 12 e 13 também não houve diferença. Divergindo Alves et al. (2005) lendo a morfologia espermática de garanhões revelou: gota citoplasmática proximal e gota citoplasmática distal.

Contudo encontramos diferença significativa em alguns tratamentos e anomalias, tais como: GP nos tratamentos: 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 e 13; GD nos tratamentos: 1, 4, 5, 6, 8 e 10; CI nos tratamentos: 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12 e 13; CDG nos tratamentos: 5, 10 e 13, e na PIR nos tratamentos: 1, 3, 7, 10 e 11. Nosso estudo corrobora com Meurer (2021) em que obteve diferença significativa nas anomalias de GP, GD, CI, CE, CD e CDG.

Porém esses defeitos não significam, necessariamente a infertilidade do garanhão. Bielanski (1975) encontrou garanhões com altos índices de anormalidades morfológicas com excelente fertilidade. Todavia, Kenney (1983) verificou que a concentração espermática, a percentual de espermatozoides morfolologicamente normais e a motilidade eram as características seminais que melhor explicavam a variação na taxa de prenhez obtida no fim de uma temporada de monta. Tais características serviram de base para determinar um padrão qualitativo que pudesse auxiliar na interpretação do exame de sêmen.

4. CONCLUSÕES

Concluimos que houve diferença significativa em quase todos as anomalias avaliadas de acordo com cada tratamento. Contudo, entendemos que animais com alta taxa de defeitos morfológicos espermáticos podem sim ter bons índices de fertilidade e isso pode estar atrelado a presença de defeitos compensáveis.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S.G., Gribeiro Filho, A.L., Snoeck, P.P.N., Chalhoub, M., Bittencourt, R.F., Portela, A.P.M., Almeida, A.K., Melo, M.I.V. e Henry, M.. Efeito da solução, da fixação em formol-salina e do tempo de incubação sobre os resultados do teste hiposmótico para sêmen equino congelado. **Ciên. An. Bras.**, 6: 219-225. 2005.

ARAÚJO, A.M.S.; Araújo, S.A.C. Patologias espermáticas mais comuns em garanhões da raça pônei brasileira. **Arch. Zootec.** 60 (229): 145-148. 2011.

BIELANSKI, W. The evaluation of stallion semen in aspects of fertility control and its use for artificial insemination. **J. Reprod. Fertil.** 1975. 23. p19-23.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2ª ed. Belo Horizonte. 1998. p49.

KENNEY R.M., Hurtgen, J.P., Pierson, R. Withersponn, D. and Simons, J. Manual for clinical fertility evaluation of the stallion. **Society for Theriogenology.** Hastings, NE. 1983. p100 .

MEURER, E. P. **Correlação da morfologia espermática com a taxa de concepção no uso de inseminação artificial em equinos.** 2023. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal de Uberlândia.

SILVA, L. T. da;Maia, M. da S.; Aquino, J. J. de; Moura, C. E. B. Comparação morfológica da célula espermática equina no sêmen fresco e refrigerado. **III ENCONTRO ANUAL DE BIOFÍSICA,** Recife, 2017. **ANAIS: ENCONTRO ANUAL DA BIOFÍSICA.** p22-25.