

AValiação DO POTENCIAL DE FERTILIDADE DO SÊMEN CRIOPRESERVADO DE GARANHÕES: ANÁLISES DA ESTRUTURA ESPERMÁTICA ATRAVÉS DE SONDAS FLUORESCENTES E DA MOTILIDADE PELO SISTEMA CASA.

Daniel Anderson Martiliano da Silva (Bolsista PIBIC/CNPq); Deyse Naira Mascarenhas Costa (Co-orientadora, Doutoranda em Ciência Animal - UFPI); Yatta Linhares Boakari (Colaboradora, Médica Veterinária); Prof. Dr. Assoc. José Adalmir Torres de Souza (Orientador, Depto de Clínica e Cirurgia Veterinária – UFPI)

Introdução

Os danos causados ao espermatozóide durante o processo de criopreservação podem resultar na redução da proporção de espermatozoides viáveis, assim como na capacidade funcional destes (WATSON, 2000). Bons resultados na criopreservação são dependentes da qualidade do sêmen, bem como das interações entre diluidores, crioprotetores e curvas de congelação e descongelação, com intuito de minimizar os danos causados pelo choque térmico (PICKETT E AMANN, 1992).

O objetivo deste trabalho foi avaliar, de forma comparativa, o potencial de fertilidade do sêmen criopreservado de garanhões das raças Quarto de Milha e Mangalarga Machador por meio da análise da estrutura espermática através de sondas fluorescentes e da motilidade pelo Sistema CASA.

Metodologia

Foram utilizados 12 garanhões com idade entre 3 e 5 anos, sendo seis da raça Quarto de Milha e seis da raça Mangalarga Machador. De cada animal foram colhidos seis ejaculados, por meio de vagina artificial, com intervalo mínimo de 48 horas entre as colheitas. Os ejaculados com motilidade espermática mínima de 60% foram diluídos no meio de resfriamento Botu-sêmen® na diluição de 1:1. Após a diluição, as amostras foram centrifugadas com uma força de 650G por 10 minutos, o sobrenadante desprezado e os “pellets” foram ressuspensos utilizando os meios de congelação Tris-gema ou Botu-crio®. A seguir o sêmen envasado em palhetas e congeladas em máquina TK 3000, na curva de congelação rápida. Após a descongelação, o sêmen foi avaliado quanto à integridade da membrana espermática e acrossoma e a atividade mitocondrial, segundo a técnica descrita por Celeghini (2005) e análise da motilidade espermática pelo sistema CASA. Na análise do sêmen pós-descongelação, utilizou-se o modelo estatístico fatorial 2x2 com seis repetições. Para as médias foi realizado o teste SNK de comparação a 5% de probabilidade.

Resultado e discussão

Como pode ser visto na tabela 1, o percentual da integridade da membrana plasmática e acrossomal diferiram significativamente ($P > 0,05$) comparado os dois diluentes. O diluente Botu-crio® proporcionou um maior percentual de espermatozoides com a membrana plasmática intacta, valores semelhantes foram encontrados por Crespillo et al. (2006). Terraciano et al., (2008) trabalhando com as curvas de criopreservação automatizada e convencional, observou diferença significativa ($P < 0,05$) entre as curvas, tendo a curva automatizada que proporcionado um maior percentual de células espermáticas íntegras. Os espermatozoides diluídos no Tris mostraram maior percentual de integridade do acrossoma, e o percentual de espermatozoides com função mitocondrial não diferiram significativamente ($P < 0,05$) entre os diluentes. Estes valores estão de acordo com os descritos por

Alvarenga et al., (2000). Nascimento (2006), trabalhando em três concentrações espermáticas não observou diferença significativa ($P>0,05$) nas três concentrações para a integridade acrossomal, já o potencial mitocondrial diferiu ($P<0,05$) na terceira concentração, mais concentrada, apresentando um valor menor que as demais.

Tabela 1 – Médias e desvios padrão da integridade de membrana plasmática (%), integridade de acrossoma (%), função mitocondrial (%) de espermatozói de equino das raças Quarto de Milha e Mangalarga Machador em dois diluidores

Estruturas	Diluentes	
	Botu-crio®	Tris
Membrana Plasmática	58,00±1,47 ^a	44,70±1,47 ^b
Acrossoma	5,66±3,46 ^b	18,91±1,14 ^a
Mitocôndria	68,16±3,67 ^a	68,35±4,03 ^a

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si ($P<0,05$).

Ao se observar a tabela 2, os percentuais obtidos referentes à motilidade progressiva demonstram que houve uma interação significativa entre as raças e os diluentes, dessa forma, os ejaculados diluídos no Botu-crio® apresentaram valores de motilidade superiores ao Tris e, entre as raças, a Mangalarga Marchador apresentou valores superiores com a utilização deste diluente. Zimmermann (2007), analisando sêmen em dois tempos e dois diluentes, observou no segundo tempo diferença significativa ($P>0,05$) com relação à motilidade progressiva e BCF entre os dois diluentes. Isso pressupõe que o tempo entre a coleta e a análise pode ter influenciado nos parâmetros espermáticos analisados.

Tabela 2 – Médias e desvios padrão referentes a motilidade progressiva (%) e (BCF) de espermatozói de garanhões das raças Quarto de Milha e Mangalarga Machador, segundo o diluente, avaliados pelo CASA

Raça	Motilidade		BCF	
	Botu-crio®	Tris	Botu-crio®	Tris
Quarto de Milha	16,39±40,84 ^{Ba}	5,87±3,64 ^{Ab}	8,58±0,26 ^{Ab}	9,06±0,84 ^{Aa}
Mangalarga Machador	39,97±55,41 ^{Aa}	7,97±18,00 ^{Ab}	8,42±3,12 ^{Aa}	7,26±2,01 ^{Bb}

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si ($P<0,05$).

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna, não diferem entre si ($P<0,05$).

Conclusão

O diluente Botu-Crio® se mostrou superior, proporcionando uma melhor qualidade no sêmen dos garanhões.

Apoio: CNPq; UFPI

Referências bibliográficas

ALVARENGA, M. A.; GRAHAM, J. K.; KEITH, S. L.; et al. Alternative cryoprotector for freezing stallion spermatozoa. **14th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION**. Proceedings, Stockholm, p. 157, 2000.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeito da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozói de utilizando sondas fluorescentes**. 2005. p186. Tese (Doutorado em Reprodução Animal), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CRESPILHO, A.M.; PAPA, F.O.; ALBERTI, K.; et al. Eficiência comparativa entre dois diluidores para a Congelação de sêmen bovino sobre os padrões de Motilidade e integridade de membrana plasmática. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, SP, Vol. 22, nº3, 229-235, 2006.

NASCIMENTO, J. Efeito da concentração espermática e volume sobre as características do movimento espermático (CASA) e sobre membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial (microscopia de epifluorescência) de espermatozóides eqüinos criopreservados. **Dissertação** (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo, 2006.

PICKETT, B. W.; AMANN, R. P. Cryopreservation of semen. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, Cap. 83, p. 769-789, 1992.

TERRACIANO, P.B.; BUSTAMANTE-FILHO, I.C.; MIQUELITO, L.V.; et al. Criopreservação de espermatozóides eqüinos comparando duas curvas de congelamento combinadas com diluentes comerciais: uma análise laboratorial. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.1972-1977, 2008.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, n. 2, p. 481-492, 2000.

ZIMMERMANN, M. F. **Efeito do crioprotetor dimetilformamida de amostras em sêmen equino descongeladas utilizando-se dois diferentes diluentes comerciais**. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade de Brasília- Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2007.

Palavras-chave: Garanhão. Sondas. CASA.