

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MEIOS DILUENTES UTILIZADOS PARA EQUINOS NA CONSERVAÇÃO DE SÊMEN ASININO REFRIGERADO

Vicente Antonio da Silva Neto¹; Luis Eduardo Pereira de Andrade Ferreira²

¹Instituto Federal da Paraíba, vicenteantonio88@hotmail.com; ²Instituto Federal da Paraíba, L_educardo@hotmail.com

Resumo: A inseminação artificial com sêmen congelado em asininos ainda caminha a passos curtos, sofrendo interferência de vários fatores, por esse motivo, uma forma que vem sendo amplamente difundida entre os produtores de equídeos é o uso de sêmen refrigerado. Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar a influência de três diferentes meios diluentes usados para equinos, dois comerciais e um produzido seguindo recomendações do meio Kenney, sobre o sêmen asinino refrigerado por fonte de frio passiva, disposto em containers descartáveis para avaliação de motilidade e vigor a cada 12 horas, até completar o período de 72 horas. Na avaliação em conjunto da motilidade e vigor espermático é possível notar uma boa manutenção dessas características espermáticas, necessárias para a fecundação, até às 24 horas, com uma pequena redução até as 36, para todos os grupos, mantendo até esse momento padrões aceitáveis para utilização “*in vivo*”.

Palavras-chave: asininos, sêmen, refrigeração.

1. Introdução

Ao longo dos anos, a espécie asinina (*Equus asinus*), apesar de ter importância econômica no mercado agropecuário, na produção de jumentos e muares, é notoriamente pouco estudados com relação às suas biotecnologias reprodutivas (PEÑA-ALFARO ET AL., 2012). O estudo dessa espécie, em particular o jumento nordestino, abundante em nossa região com aproximadamente 1,08 milhões de animais (IBGE, 2012), pode vim a ajudar a salvar algumas raças que lutam contra a extinção, a exemplo das raças Poitou que possuíam cerca de 180 exemplares no mundo, e o Jumento Brasileiro com aproximadamente 80 cabeças (MARIANTE ET AL., 2000).

A inseminação Artificial (IA) com sêmen refrigerado vem sendo amplamente difundida nas ultimas décadas (NUNES ET AL, 2006), pois a IA com sêmen congelado em asininos, ainda necessita de aprimoramento técnico, e sofre com a variação individual dos garanhões, baixo rendimento por ejaculado, intenso manejo das fêmeas antes da IA. Levando a maior custo, além de taxas de prenhes que oscilam mais que as obtidas com monta natural, ou IA, tanto com sêmen fresco, quanto com refrigerado (BACKMAN ET AL., 2004).pelo frio.

A diluição e o resfriamento do sêmen prolongam a sobrevivência e protegem os espermatozoides de condições adversas, maximizam o número de fêmeas a serem inseminadas, diminuem a consanguinidade, reduzem a possibilidade de transmissão de doenças, tanto pelo transito de animais quanto pelo coito (LOOMIS E SQUIRES, 2005).

O processo de resfriamento de sêmen requer tecnologia e equipamentos mínimos que permitam a coleta, avaliação, diluição e o seu armazenamento. Apesar de sua simplicidade, diversos fatores são capazes de influenciar negativamente na viabilidade espermática após a refrigeração, como a composição do meio diluente, os protocolos de refrigeração, métodos de transporte e a individualidade do reprodutor (ROCHA, 2012).

Uma variedade de meios diluentes com a combinação de diversos componentes (açúcares, eletrólitos, tampões, gema de ovo, leite, antioxidantes, etc.) tem sido desenvolvida com o pensamento de melhorias para o sêmen de equídeos (PADILLA & FOOTE, 1991).

Os diluidores mais utilizados para resfriamento do sêmen de asininos possuem macromoléculas oriundas da gema de ovo ou leite, capazes de proteger os espermatozoides contra as lesões causadas pelo frio. Apesar de autores como Ferreira (1993) e Mello et al. (2000) relatarem a superioridade dos diluidores contendo gema de ovo em relação aos a base de leite em pó desnatado, a literatura ainda se apresenta escassa e controversa a respeito da composição dos diluentes para diluição e refrigeração de sêmen asinino destinado à inseminação (BOETA & QUINTERO, 2000, ROSSI, 2008; CARVALHO, 2011).

De acordo com Batellier et al. (2001), quando as amostras estão armazenadas em torno de 4° C, a diluição com um diluente contendo leite, já em uma refrigeração a 15° C, as amostras de sêmen são favorecidas quando se utiliza um diluente sem leite (MAGISTRINI ET AL, 1992)

Independente da origem das macromoléculas presentes nos principais diluidores para sêmen asinino, Squires et al. (1999) concluíram que para a estocagem por um período superior a doze horas, o sêmen diluído deve ser refrigerado lentamente até 5° C. Onde o armazenamento entre 5 e 4° C é mais eficaz para manutenção da viabilidade dos espermatozoides do que as temperaturas mais baixas, entre 0 e 2° C.

Machado et al. (2002) desenvolveram um novo sistema de refrigeração passiva composto por duas caixas de isopor, uma interna medindo 15 x 11 cm, e uma externa medindo 25 x 16

cm, e como fonte de gelo os autores compararam o gelo reciclável gelatinoso e o gelo derivado de polímero (Ice Foam®). Os autores utilizaram o sistema Equine Express®, utilizado comercialmente nos EUA, como controle. Ficou comprovado que o dispositivo que utilizou o gelo Ice Foam® foi eficaz na manutenção da temperatura (16° C por um período superior a 24 horas) e manteve a motilidade e viabilidade espermática durante o período avaliado, mostrando-se superior ao Equine Express®. O dispositivo criados por Machado et al. (2002) mostraram-se como uma alternativa eficaz e economicamente viável para o transporte de sêmen diluído e refrigerado de equídeos.

O presente experimento teve como objetivo avaliar dois diferentes meios de refrigeração comerciais, com características similares e a base de leite e açúcares, comparados ao meio Kenney, conforme descrito por Kenney et al. (1975), reproduzido no Laboratório de Ensino em Biotecnologia da Reprodução – IFPB. Em um sistema de refrigeração passiva descartável em relação a manutenção da viabilidade espermática através da motilidade total e vigor espermático.

2. Metodologia

O presente experimento foi realizado no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba (IFPB) – campus Sousa, localizado no alto sertão da Paraíba, região de clima tropical árido, apresentando latitude sul de 6°, 50' e 14,69", e 30°, 17,43' e 43,69" de longitude oeste, precipitação média anual de 894, além de apresentar altitude de 234 metros acima do mar (DNOCS, 2015).

Foram utilizados 7 ejaculados de três jumentos da raça Nordestina, previamente submetidos a exame andrológico, e todos tiveram libido satisfatória durante as coletas. pertencentes ao Instituto Federal da Paraíba – campus Sousa, onde são mantidos e recebem alimentação (feno e concentrado), e água “*ad libitum*”. Todos os garanhões foram vermifugados antes de iniciar o experimento.

Os ejaculados foram colhidos com auxílio de vagina artificial, preenchida com água entre 45 e 50°C e ar, para mimetizar temperatura e pressão da vagina da fêmea. O sêmen foi filtrado por de um filtro de nylon, modelo nacional, para a separação da fração de gel. Como manequim, foram utilizadas jumentas em cio, devidamente contidas. Após a colheita o sêmen

foi imediatamente levado para o Laboratório de Ensino em Biotecnologia da Reprodução (LEBRE) para avaliação e preparo das amostras.

Cada ejaculado foi inicialmente avaliado quanto ao volume, medido em tubo falcon graduado, ao aspecto, que varia de aquoso a leitoso, à coloração, que vai de branco acinzentado a branco leitoso, e ao odor. Logo após, uma alíquota de 10 μ L de sêmen foi depositada em uma lâmina pré-aquecida a 37° C, e foi avaliada no microscópio óptico em um aumento de 200 vezes, para se determinar o vigor (0 – 5) e a motilidade (0 – 100%), esta avaliação foi feita em um sistema duplo-cego, onde duas pessoas avaliaram separadamente, e ao final fizeram a média dos resultados.

A concentração espermática foi aferida em uma câmara de Neubauer, a partir de uma solução de dezenove partes de água destilada, para uma parte de sêmen. Essa solução descansou durante 2 minutos na câmara, para a sedimentação e posterior contagem das células espermáticas.

Após a avaliação inicial, o sêmen desses animais foram divididos em alíquotas de 1 ml, estas diluídas na proporção de 1:3, uma parte de sêmen para três partes de diluente, em três tratamentos diferentes: Meio Comercial 1 (MC1), Meio Comercial 2 (MC2), e um meio produzido no laboratório (LEBRE) a base do meio Kenney (MK) que utiliza leite em pó desnatado (KENNEY ET AL, 1975).

As amostras foram distribuídas em containers descartáveis, produzidos com duas caixas térmicas de isopor – uma interna com capacidade para 2,5 L, medindo 19 x 1,3 cm, e a externa com capacidade para 8 L, medindo 25,5 x 19,5 cm – com fonte de frio de gelo reciclável de gel a base de polímero acrílico. As amostras foram avaliadas, nos aspectos de motilidade total e vigor espermático, a cada 12 horas, até completar o período de 72 horas.

Os dados foram analisados por meio do programa computacional SigmaStat. Para todas as análises estatísticas realizadas, foi adotado nível de significância (P) de 5%. Nos casos que ocorreram significância no teste F, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Para as variáveis não paramétricas, na comparação entre os grupos será empregado o teste de Kruskal-Wallis.

3. Resultados e Discussão

Avaliando-se o efeito de momento, dentro dos grupos, com relação à motilidade espermática, foi constatado uma redução progressiva para todos os grupos, que demonstraram um padrão de redução estatisticamente similar, concordando com Farrás et al. (2014), que avaliaram o MC1 com sêmen equino em duas temperaturas diferentes, e mostram que a motilidade total apresenta diferença em todos os momentos avaliados, sendo cada momento inferior ao seu antecessor. Apesar do declínio similar aos outros, o Meio Comercial 2 apresenta-se com uma curva menos acentuada que os demais as 36 horas de avaliação.

Ao compararmos os resultados entre os grupos, ainda com relação à motilidade, não foram constatadas diferenças estatísticas em nenhum momento, demonstrando uma similaridade em todos os grupos nas características de conservação espermática asinina.

Avaliando a figura e tabela 1 observamos que até às 24 horas todos os grupos se mantêm com o padrão de motilidade aceitável, indicando um possível bom resultado em taxa de prenhes utilizando sêmen asinino refrigerado até esse momento. Porém apesar da ausência de diferença estatística os meios comerciais utilizados se demonstram com valores de motilidade médios acima de 30 % no momento 36, enquanto o meio Kenney já apresenta valor inferior a 30 %, o que pode levar a redução das taxas de prenhes após esse momento. Já as 48 horas os resultados de motilidade, apesar de presentes atingem valores que reduzem a aplicabilidade de utilização de sêmen asinino refrigerado após esse momento, com valores próximos de 0% após 48 horas.

Sabe-se que motilidade total e a capacidade fecundante não possuem correlação absoluta, tornando essa avaliação imprecisa para estimar a viabilidade espermática (CARVALHO & PAPA, 2003). Porém, Jasko et al. (1992) encontraram através da análise computadorizada uma relação entre motilidade total, motilidade progressiva e velocidade média com a fertilidade, dessa forma, tem-se na análise computadorizada, maior precisão na avaliação de viabilidade espermática que análises subjetivas.

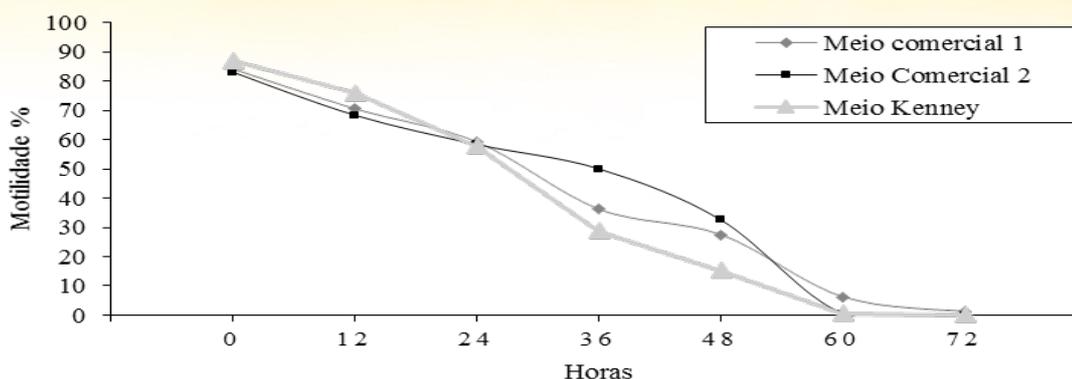


Fig.1. Distribuição das médias das motilidades espermaticas, de jumentos nordestinos submetidos a diluição com três meios diferentes, no decorrer de três dias, com avaliações a cada 12 horas.

Tabela 1

Medias das motilidades espermaticas de jumentos nordestinos submetidos à refrigeração com diferentes meios de diluição.

	Horas de refrigeração						
	0	12	24	36	48	60	72
M.C.1	84%	71%	59%	36%	28%	6%	1%
M.C.2	84%	68%	58%	50%	33%	1%	0%
M.K.	87%	76%	58%	29%	15%	1%	0%

Na análise do vigor espermático com relação ao efeito momento em cada grupo, foi constatado que ocorreu um comportamento similar ao da motilidade, com os três grupos se comportando estatisticamente semelhante, concordando com Silva et al. (2011), onde comparam as médias de vigor espermático armazenados em geladeira a 5° C até o período de 72 horas.

Confrontando os valores médios dos vigores espermáticos entre cada grupo notou-se a não ocorrência de diferença estatística entre eles, conforme observado na figura e tabela 2. Porém os meios comerciais se mantiveram com vigor superior ao meio Kenney preparado no laboratório, com ênfase no momento 36 onde o meio comercial 2 se destaca com valores médios superiores e a partir das 48 horas de avaliação, nas quais o meio comercial 1 se apresenta com uma manutenção do vigor e uma queda menos acentuada de seus valores.

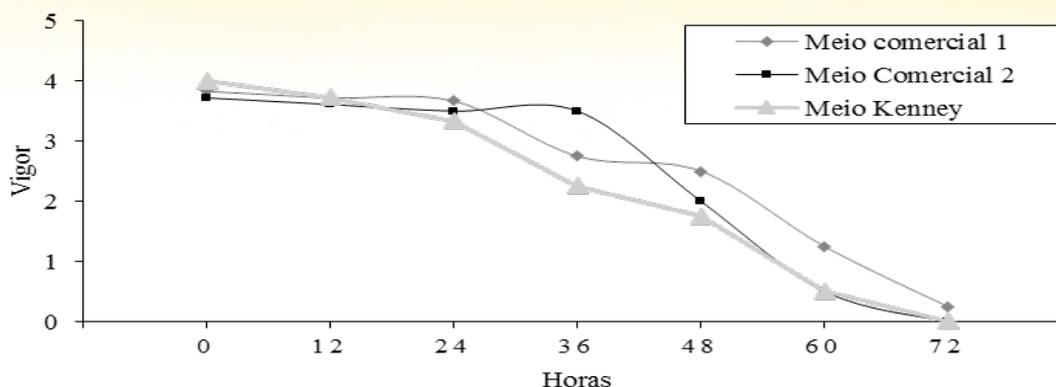


Fig.2. Distribuição das médias dos vigores espermáticos, de jumentos nordestinos submetidos a refrigeração diluídos com três meios diferentes, no decorrer de três dias, com avaliações a cada 12 horas.

Tabela 2

Medias dos vigores espermáticos de jumentos nordestinos submetidos a refrigeração com diferentes meios de diluição.

	Horas de refrigeração						
	0	12	24	36	48	60	72
M.C.1	3,83	3,722	3,667	2,75	2,5	1,25	0,25
M.C.2	3,72	3,611	3,5	3,5	2	0,5	0
M.K.	4	3,72	3,33	2,25	1,75	0,5	0

4. Conclusões

Na avaliação em conjunto da motilidade e vigor espermático é possível notar uma boa manutenção dessas características espermáticas, necessárias para a fecundação, até às 24 horas, com uma pequena redução até as 36, para todos os grupos. Porém até esse momento com padrões aceitáveis para a utilização em vivo. Já após as 48 horas, começamos a observar que os meios comerciais se demonstraram com uma maior capacidade em manter a longevidade espermática de sêmen proveniente de jumento nordestino.

Tendo em vista a subjetividade dos testes realizados para as análises de motilidade total e vigor espermático, ainda são necessários novos estudos, utilizando o método CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), sistema automático (hardware e software) utilizado para visualizar digitalizar e analisar imagens sucessivas, fornecendo informações acuradas do momento individual de cada célula (AMANN e KATZ, 2004).

5. Referencias Bibliográficas

BACKMAN, T.; BRUEMMER, J. E.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Pregnancy rates of mares inseminated with semen cooled for 18 hours and then frozen. **J anim sci**, v. 82, p. 690 – 694, 2004.

BOETA, M.; QUINTERO, L. Z. Utilización de la leche descremada ultrapasteurizada como diluyente de semen de burro, destinado a la inseminación de yeguas. **Vet. mex.**, v. 31, n. 1, p. 67 – 69, 2000.

CARVALHO, L. E. Fertilidade de éguas inseminadas com sêmen fracionado de jumentos da raça Pêga, diluído, resfriado e estocado a 5° C em contêiner especial. 2011. 193 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, **Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, MG.

CARVALHO, G.A.; PAPA, F.O. Estudo de diferentes diluentes sobre a viabilidade espermática utilizando-se diversas formas de refrigeração com sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, p. 332-334, 2003

FERREIRA, M. F. L. Efeito de diluentes e taxa de resfriamento sobre a motilidade espermática e fertilidade do sêmen de jumentos (*Equus asinus*). Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, **Universidade Federal de Minas Gerais**. Belo Horizonte, MG.

KENNEY, R. M.; BERGAGMAN, R. V.; COOPER, W, L. Minimal contamination techniques for breeding mares. Technique and preliminary findings. **Proc. Am. Assoc. Equine Pret.**, v. 21, p. 327 – 336, 1975.

LOOMIS. P. R.; SQUIRES, E. L. Frozen semen management in equine breeding programs. **Theriogenology**, v. 64, p. 480 – 491, 2005.

MACHADO, M. S.; LEÃO, K. M.; GOMES, G. M.; MACEDO, L. P.; ALVARENGA, M. A. Efeitos de diferentes sistemas de transporte sobre a qualidade do sêmen refrigerado equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p. 194 – 196, 2002.

MELLO, S. L. V.; HENRY, M.; SOUZA, M. C. Effect of Split ejaculation and seminal extenders on longevity of donkey semen preserved at 5° C. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 52, n. 4, p. 372 – 378, 2000.

ROSSI, R. Comparação de dois diluidores na fertilidade de éguas inseminadas com sêmen asinino a fresco ou resfriado. 2008. 209 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, **Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, MG.

SQUIRES, E. L.; BRUBAKER, J. K.; McCUE, P. M.; P. M.; PICKETT, B. W. Effect of sperm number and frequency of insemination on fertility of mares inseminated with cooled semen. **Theriogenology**, v. 28, p. 709 – 718, 1998.

AMANN, R.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 yers. **J Androl**. V. 25, p. 317 – 325, 2004.

BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON, J.M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction**

Science, v. 68, p.181-190, 2001.

Departamento Nacional de Obras contra Seca. Perímetro irrigado de São Gonçalo. Disponível em:

http://www.dnocs.gov.br/~dnocs/doc/canais/perimetros_irrigados/pb/sao_goncalo.htm Acesso

em: setembro de 2016.

FARRÁS, M. C.; FIORATTI, E. G.; NETO, C. R.; DO CARMO, M. T.; DE OLIVEIRA, R. A.; PAPA, F. O. M. A. Comparação de diferentes temperaturas de armazenamento de sêmen refrigerado de garanhões da raça Mangalarga Marchador e Quarto de Milha. **Veterinária e Zootecnia**, 21(1), 187-195, 2014.

IBGE 2012. Produção da Pecuária Municipal (PPM). **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, Rio de Janeiro, RJ. 63p.

JASKO DJ, HATHAWAY JA, SCHALTENBRAND VL, SIMPER WD, SQUIRES EL. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.37, p.1241-1252, 1992.

MAGISTRINI, M.; COUTY, I.; PALMER, E. Interactions between sperm packaging, gas environment, temperature and diluent on fresh stallion sperm survival. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 88 (Suppl.), p.97-110, 1992.

MARIANTE, A. S.; CAVALCANTE, N. Animais do descobrimento. Raças domésticas da história do Brasil. **Embrapa sede / Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia**, p. 182 – 183, 2000. 228 p.

NUNES, D. B.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; COSTA E SILVA, E. V. Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 30, n. 1/2, p. 42 – 56, jan./jun. 2006.

PADILLA, A.W.; FOOTE, R.H. Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 8, p. 3308-3313, 1991.

PEÑA-ALFARO, C. E.; SOUZA, N. L.; BARROS, L. O. Fisiologia e biotecnologia da reprodução de asininos. **Ciência Animal**, 22 (1), p. 207 – 218, 2012.

ROCHA, N. M. A. Taxa de gestação em éguas inseminadas com sêmen resfriado de jumentos, utilizando diluidor a base de leite desnatado – gema de ovo com duas concentrações de glicose. 2012. 190 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, **Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, MG.

SILVA, R. P. et al. Avaliação de dois diluentes de refrigeração e o efeito da presença do plasma seminal sobre a viabilidade do sêmen equino refrigerado. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 20, Ed. 167, Art. 1126, 2011.



(83) 3322.3222
contato@conidis.com.br
www.conidis.com.br

