

## RELAÇÃO ENTRE TAXA DE PREENHEZ POR CICLO, MOTILIDADE E TESTES DE FLUORESCÊNCIA ESPERMÁTICA EM EQUINOS DA RAÇA CRIOULA

**ANTUNEZ, Lucas<sup>1</sup>; HARTWIG, Felipe Pires<sup>1</sup>; SANTOS, Rodrigo Stauffert<sup>1</sup>; BIANCHI, Ivan<sup>2</sup>; CURCIO, Bruna da Rosa<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup>Acadêmico de Medicina Veterinária – UFPel. [lucas\\_antunez@hotmail.com](mailto:lucas_antunez@hotmail.com)

<sup>2</sup>Professor Adjunto Faculdade de Veterinária – UFPel. [curciobruna@hotmail.com](mailto:curciobruna@hotmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

Os negócios que envolvem a criação e a utilização do cavalo têm uma destacada importância no contexto mundial. No Brasil, o agronegócio que envolve a criação de cavalos, movimentou valores superiores a R\$ 7 bilhões e gera mais de 600 mil empregos diretos (JUNIOR, 2006). Para atender as necessidades requeridas por esta atividade, muitos esforços têm sido realizados no intuito de desenvolver, aprimorar e difundir biotecnologias.

A espécie equina sob condições naturais apresenta os menores índices de fertilidade quando comparada às demais espécies de animais domésticos. Portanto, é evidente a necessidade da aplicação de biotecnologias em reprodução assistida com foco na avaliação do potencial reprodutivo, diagnóstico de distúrbios reprodutivos e as potenciais alternativas terapêuticas.

O garanhão desempenha um importante papel na cadeia da equideocultura e deve apresentar adequado potencial de fertilidade, o que varia individualmente de acordo com a qualidade do sêmen (BARTH e OKO, 1989).

Com o intuito de avaliar o potencial de fertilidade dos indivíduos, são realizadas coletas para avaliação da qualidade seminal. A cada coleta, o sêmen é avaliado quanto suas características macroscópicas de volume, coloração, viscosidade e aspecto. Em seguida, são analisados o percentual de motilidade e o vigor espermático com auxílio de microscopia. Adicionalmente, são determinadas a concentração e características morfofuncionais dos espermatozoides. Através dos testes disponíveis podem ser avaliados parâmetros como morfologia espermática, integridade de membrana plasmática e integridade de acrossoma.

A avaliação da fertilidade em garanhões com base na morfologia espermática e motilidade, utilizando microscopia de luz, são utilizadas há muitos anos. Este tipo de exame desempenha um papel importante no estabelecimento dos padrões normais de fertilidade nesta espécie (KENNEY, 1983; JASKO, 1990). No entanto, a correlação da fertilidade de um garanhão com o resultado de um único teste laboratorial não é alta quando comparada à utilização de múltiplos testes (PICKETT et al, 1990).

A membrana plasmática e o acrossoma do espermatozoide estão intimamente envolvidos no processo de fertilização do oócito. Durante o processo de capacitação espermática e reação acrossômica a membrana plasmática e seus constituintes devem estar intactos para que ocorra uma série de eventos que irão culminar na desestabilização e fusão da membrana plasmática celular com a membrana externa do acrossoma (PICKETT et al, 1989).

A reação do acrossoma é necessária para que ocorra a penetração do espermatozóide na zona pelúcida do oócito promovendo a fertilização (SIEME, 2009).

Alterações tanto na membrana plasmática quanto no acrossoma do espermatozóide são relevantes no que diz respeito ao poder fecundante destas células e com conseqüente influência na fertilidade do garanhão.

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi determinar a correlação dos parâmetros morfofuncionais espermáticos tradicionais associados à integridade de membrana plasmática e integridade de acrossoma, sobre o índice de prenhez de éguas cobertas por garanhões da Raça Crioula.

## 2. METODOLOGIA

Foram utilizados dois garanhões que se apresentaram clinicamente saudáveis durante a estação reprodutiva 2009/2010 dos quais foram avaliados oito ejaculados de cada.

As amostras utilizadas foram adicionadas ao diluente Botu-Sêmen® na fração 3:1 (diluente-sêmen) e acondicionadas em recipiente para resfriamento e transporte a 15°C Botu-Box®. O sêmen foi mantido no recipiente por no mínimo 4 horas antes do início das análises com o intuito de completar a curva de resfriamento.

Subseqüentemente o sêmen foi encaminhado ao laboratório onde os parâmetros seminais analisados foram: volume da fração livre de gel do ejaculado, motilidade, vigor, concentração espermática, número total de células por ejaculado, morfologia, integridade de membrana plasmática e integridade de acrossoma. As avaliações de vigor e motilidade foram realizadas por microscopia óptica. A concentração espermática foi realizada através da contagem em câmara de Neubauer. A morfologia espermática foi analisada em microscopia óptica através de lâmina corada através da técnica de Ceróvsky. Em microscopia de fluorescência foram analisadas as integridades de membrana plasmática e acrossoma, através de sondas fluorescentes de Carboxifluoresceína e Iodeto de propídio e FITC – IP, respectivamente.

Os índices de fertilidade foram avaliados através das taxas de prenhez por ciclo, sendo monitoradas 44 éguas, com média de oito anos de idade, em sistema de monta natural dirigida.

Para avaliação estatística foi utilizada análise de variância, com comparação entre médias através do teste LSD, através do software STATISTIX®.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise morfológica, o garanhão A obteve média de 75% de células normais contra 73% do garanhão B ( $p > 0,05$ ). O número total médio de células por ejaculado foi de 4,51 bilhões para o garanhão A e 3,52 bilhões para o garanhão B ( $p < 0,05$ ). O número médio de serviços por ovulação (1,27; 1,31) e o número médio de serviços por prenhez (1,67; 1,61) não diferiram significativamente entre os garanhões A e B, respectivamente.

As médias correspondentes à integridade de membrana (CFDA e IP – Figura 1), motilidade espermática, integridade de acrossoma (FITC – IP –

Figura 2) e as taxas de prenhez por ciclo dos garanhões estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Integridade de acrossoma, integridade de membrana, motilidade espermática e taxas de prenhez por ciclo dos garanhões.

Garanhão\Avaliação	Integridade de Acrossoma	Integridade de Membrana	Motilidade	Prenhez/Ciclo
A	76% <sup>a</sup>	76% <sup>a</sup>	88% <sup>a</sup>	76% <sup>a</sup>
B	78% <sup>a</sup>	73% <sup>a</sup>	63% <sup>b</sup>	81% <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes nas colunas demonstram diferença estatística ( $P < 0,05$ )

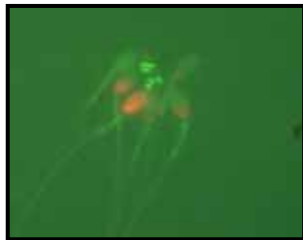


Figura 1: Espermatozoides verdes (membrana íntegra) = CFDA + IP.

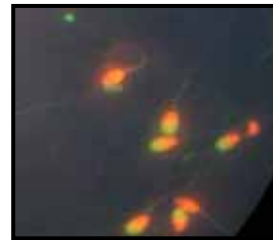


Figura 2: Espermatozoides verde e vermelho (acrossoma íntegro) = FITC - IP.

De acordo com os resultados do presente estudo, as médias de motilidade diferiram entre os garanhões ( $P < 0,05$ ). Em contrapartida, as taxas de prenhez por ciclo, bem como a porcentagem de integridade de membrana plasmática e de acrossoma, por microscopia de fluorescência não apresentaram diferença estatística ( $P > 0,05$ ). Esses resultados reforçam a sensibilidade e objetividade das técnicas de microscopia de fluorescência na determinação da viabilidade espermática. As análises de motilidade total e motilidade progressiva constituem importantes avaliações do sêmen do garanhão, no entanto, sua análise isolada é subjetiva e insuficiente na determinação da viabilidade celular e potencial de fecundação do espermatozoide. Sendo assim pode haver baixa viabilidade espermática apesar de alta motilidade em ejaculados sendo que os espermatozoides podem apresentar alterações em outros parâmetros como patologias espermáticas, integridade de membrana, integridade de acrossoma, entre outros.

Considerando a íntima relação entre integridade de membrana plasmática e integridade de acrossoma com o poder fecundante dos espermatozoides, o presente estudo evidenciou a relação desses parâmetros com a fertilidade *in vivo*. Apesar da diferença de motilidade, os parâmetros de integridade de acrossoma, integridade de membrana e índices de prenhez por ciclo não diferiram entre os garanhões.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo reforçam a importância da utilização de múltiplos testes e de avaliações objetivas e de alta sensibilidade na avaliação seminal de garanhões. Além de confirmar a subjetividade da análise isolada da motilidade em relação à viabilidade espermática. Visto que são diversos os parâmetros a serem avaliados que interferem na viabilidade da célula espermática tendo influência direta na fertilidade do garanhão.

## 5. REFERÊNCIAS

BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, p.285, 1989.

GRAHAM, J.K., KUNZE, E., HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity and mitochondrial function using flow cytometry. **Biol. of Reproduc.** Vol. 43. p. 55 – 64. 1990.

JASKO, D.J.; LEIN, D.H., FOOTE, R.H. Determination of the relationship between sperm morphologic classification and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). **J. Am. Vet. Med. Association.** Vol. 197. p. 389 – 394. 1990.

JUNIOR, P.G. (2006): **Estudo do complexo do agronegócio do cavalo no Brasil. Centro de estudos avançados em economia aplicada da ESALQ, confederação da Agricultura e pecuária do Brasil.** P. 5-68.

KENNEY, R.M., HURTING, J., PEARSON et al. Manual for breeding soundness examination of stallions. **J. Soc. Theriogenology.** Vol. 9. 1983.

NISHIMUNE, Y.; OKABE, M. Mammalian male gametogenesis, growth, differentiation and maturation of germ cells. **Development and Growth Differentiation**, v.34, p.479-486, 1993.

PICKETT, B.W., AMANN, R.P., MCKINNON, A.O., SQUIRES, E.L., VOSS, J.L. Management of the stallion for maximum reproductive efficiency II, Bulletin of Colorado States University, 1989, 126p

SIEME, H. Semen evaluation. In: **Equine Breeding management and artificial insemination**. Second edition. Saunders Elsevier. 6, 57-74. 2009.

WILHELM, K.M., GRAHAM, J.K., SQUIRES, E.L. Comparison of the fertility of cryopreserved stallion sperm with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. **Theriogenology.** Vol. 46. p. 559 – 578. 1996.