

## Scientific Electronic Archives

Issue ID: Sci. Elec. Arch. Vol. 16 (8)

August 2023

DOI: <http://dx.doi.org/10.36560/16820231766>

Article link: <https://sea.ufr.edu.br/SEA/article/view/1766>



## Efeito de diferentes diluentes na qualidade do sêmen refrigerado de eqüinos

### Effect of different extenders on the quality of refrigerated equine semen

*Corresponding author*

**Gabriela Ferreira da Silva**

Universidade Federal de Mato Grosso – Campus Sinop  
[ventingabriela@gmail.com](mailto:ventingabriela@gmail.com)

**Limber Meneses Guzman**

Médico Veterinário

**Vanessa Correa Scarpin**

Médica Veterinária.

**Daniela Mello Pereira**

Universidade Federal de Mato Grosso – campus Sinop

**Denise Silva Okano**

Universidade Federal de Mato Grosso – campus Sinop

**Resumo.** O avanço das biotecnologias e o constante uso do sêmen refrigerado na espécie equina proporcionou a otimização da inseminação artificial (IA), intensificando desse modo, a utilização de produtos, como os diluentes comerciais, que possibilitam melhorias na manutenção e na qualidade seminal durante o processo de resfriamento. O presente trabalho teve como objetivo avaliar características seminais de motilidade e vigor, em diferentes diluentes comerciais (a base de leite desnatado, de caseína, e de leite com adição de colesterol), e em momentos distintos, sendo eles 12, 24 e 36 horas. De acordo com os resultados obtidos para análises seminais de motilidade e vigor, não se observou diferença estatística para os meios testados. Concluindo-se que em todos os meios houve uma boa manutenção da longevidade da célula espermática, sendo assim, indicados para o emprego no resfriamento do sêmen equino.

**Palavras-chaves:** refrigeração, motilidade, vigor.

**Abstract.** The advancement of biotechnologies and the constant use of refrigerated semen in the equine species has enabled the optimization of artificial insemination (AI), thus intensifying the use of products, such as commercial diluents, which enable improvements in maintenance and seminal quality during the process of cooling. The present study aimed to evaluate seminal characteristics of motility and vigor, in different commercial extenders (based on skimmed milk, casein, and milk with added cholesterol), and at different times, namely 12, 24 and 36 hours. According to the results obtained for seminal analyzes of motility and vigor, no statistical difference was observed for the tested media. Concluding that in all media there was a good maintenance of the longevity of the sperm cell, therefore, indicated for use in the cooling of equine semen.

**Keywords:** refrigeration, motility, vigor.

### Introdução

Com o avanço das biotecnologias da reprodução várias melhorias foram feitas para que as técnicas tivessem melhor aplicabilidade e maximização de recursos.

O uso do sêmen refrigerado na espécie equina proporcionou a otimização da inseminação artificial (IA) (LOOMIS, 2006), podendo utilizar sêmen de garanhões de alto valor genético e de diversas localidades, sem que eles precisassem se deslocar. Tendo como vantagens a economia da

hospedagem, diminuição de estresse e risco de acidente durante o transporte (BRINSKO & VARNER, 1992; NUNES et al., 2006).

O sêmen pode ser refrigerado de dois modos, ativo ou passivo, sendo o último o mais utilizado no Brasil. A forma de refrigeração passiva é feita por meio de caixas isotérmicas. (SILVA FILHO, 1994). No mercado nacional existem vários modelos disponíveis, como a Botu-box®, Max-Sêmen®, Botutainer® e Botuflex® (PUGLIESI, 2009). A utilização dessas caixas visa o declínio lento da temperatura, tendo em vista os danos causados pelo frio ao espermatozoide. A faixa de maior sensibilidade da célula espermática equina é entre 19° a 8° C, e nesse momento a taxa de resfriamento deve ser de -0,05 °C (KAYSER et al., 1992; MORAN et al., 1992).

As caixas comercializadas no mercado mantem a temperatura de 15 a 20°C ou 5°C. Sendo que, para o uso do sêmen em menor tempo, ou seja, até 12 horas após sua colheita, a temperatura mais utilizada para manutenção desse espermatozoide é de 15 a 20°C, no entanto para destinos que excedem esse tempo, o ideal é que o sêmen fique em um ambiente em torno de 5°C (CANISSO et al., 2008). A Botuflex® possibilita o transporte em ambas temperaturas, sendo que para a curva atingir 15°C se utiliza uma fonte de gelo biológico reciclável, já para atingir a temperatura de 5°C se utiliza dois gelos, de acordo com o que indica o fabricante.

Para melhor utilização do sêmen refrigerado, foram desenvolvidos diversos diluentes para as diferentes espécies animais e estão disponíveis no mercado. Os diluentes são fontes de nutrição e proteção dos espermatozoides contra injúrias durante o processo de refrigeração (BRINSKO & VARNER, 1992).

Em sua fórmula existe diversos componentes (açúcares, tampões, gema de ovo, leite, antioxidantes, entre outros), responsáveis por funções como, inibição do crescimento bacteriano, proteção contra choque térmico, fornecimento de energia, além de aumentar o volume da dose inseminante (PADILLA & FOOTE, 1991; PICKET & AMANN, 1987)

O primeiro e mundialmente conhecido, é o diluidor a base de leite em pó desnatado. (KENNEY et al., 1975). Tendo ele como base, as empresas foram fazendo novas adições, como a caseína e o colesterol. A caseína tem como função impedir a ação de proteínas que causam desestabilização de membrana, e está presente nos diluidores comerciais como o Botusêmen Gold®, e INRA 96® (ALVARENGA et al., 2017). Já o colesterol, presente em diluentes como o Botusêmen Special®, tem como função manter a estabilidade da membrana plasmática do espermatozoide, de acordo com o que relata o fabricante.

Dessa maneira, a busca e a implementação de novos ingredientes aos diluentes é constante, visando sempre a manutenção e longevidade do sêmen (PUGLIESI, 2009).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar três meios diluentes comerciais, em três diferentes tempos, para analisar características seminais de motilidade e vigor.

## Material e Métodos

Utilizou-se o ejaculado de três garanhões, da raça Quarto de Milha, com idade entre 18 e 20 anos, sexualmente ativos e clinicamente sadios, alojados em dois haras da região de Araçatuba, no interior do estado de São Paulo. As coletas obtidas no meses de dezembro e janeiro, foram realizadas por meio de vagina artificial e o sêmen imediatamente após cada coleta era filtrado, separado da fração gel, e avaliado em relação as características de motilidade (0 -100%), vigor (1-5), volume e cor.

Logo em seguida, o ejaculado de cada garanhão era dividido e diluído na proporção 2:1 (diluidor: sêmen), em três diluentes comerciais diferentes. Foram utilizados diluentes a base de leite desnatado (Botusêmen®), de caseína (Botusêmen Gold®) e de leite com adição de colesterol (Botusêmen Special®), sendo representados respectivamente como diluentes 1, 2 e 3. Para cada amostra, foi utilizado 1 ml de sêmen, e estas foram armazenadas em caixas de transporte próprias (Botuflex®), com dois gelos em seu interior, para serem refrigeradas em uma curva lenta, até atingirem a temperatura de 5 graus Celsius.

As amostras eram avaliadas imediatamente após a diluição e durante o processo de refrigeração, com 12, 24 e 36 horas pós-refrigeração, analisando em cada um desses momentos a motilidade e o vigor.

Todas as análises seminais foram feitas por meio de microscópio óptico, por avaliação subjetiva de dois avaliadores, utilizando-se lâmina e lamínula previamente aquecidas. Sendo que, as amostras eram separadas em diferentes caixas isotérmicas, de acordo com o tempo da análise, para evitar variação de temperatura durante o processo de avaliação.

## Análise estatística

Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. O teste de Shapiro-Wilk foi usado para verificar a normalidade dos dados. Para a comparação dos dados referentes à Motilidade e Vigor para os diferentes diluentes ao longo do tempo foram usadas ANOVA two-way de medidas repetidas, seguidas do *post hoc* de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%.

## Resultados e Discussão

Em relação aos resultados, não se observou diferença significativa para os parâmetros de motilidade (Figura 1) e vigor (Figura 2) entre os três diluentes testados, nos tempos de doze, 24 e 36 horas.

A motilidade é uma análise clássica utilizada para avaliação do sêmen, sendo ele fresco, resfriado ou descongelado (ARRUDA et al., 2007).

Sendo uma técnica de grande valor e muito empregada na rotina laboratorial, especialmente para determinar a qualidade seminal (ARRUDA et al., 2011). Vale ressaltar, que a motilidade não tem correlação direta com a capacidade fecundante, existindo outros fatores envolvidos que podem a predizer melhor (CARVALHO & PAPA,2003).

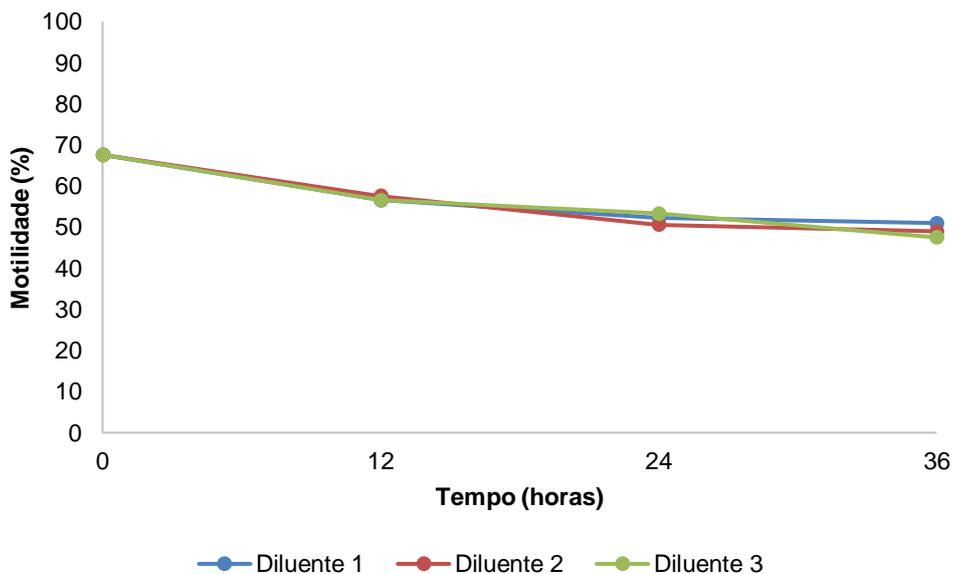
Avaliando a tabela 1, nota-se que a motilidade e o vigor espermático dos garanhões 2 e 3 apresentaram valores aceitáveis até o período de 36 horas, demonstrando que para a amostra utilizada, ambos garanhões são satisfatórios para refrigeração de sêmen. Não obstante, o garanhão 1, apresentou motilidade de 35% e vigor de 2,5, não atingindo portanto os padrões satisfatórios para utilização do sêmen refrigerado, de acordo com o CBRA (2013), em que ressalta que é necessário uma motilidade espermática maior ou igual a 50%, e um vigor, maior ou igual 3. Vale enfatizar o efeito individual do macho presente na espécie equina, posto que, nem todo garanhão está apto ao resfriamento do sêmen, pois pode não apresentar uma motilidade progressiva ideal (CANISSO et al., 2008). Isso, pelo fato, da seleção desses animais serem baseadas no padrão racial e performance atleta, e não especificamente de acordo com parâmetros reprodutivos, podendo resultar em animais de baixa eficiência reprodutiva (NUNES et al., 2006).

Fatores como a frequência de coletas, mão de obra inexperiente, preparo e uso de materiais inadequados afetam a qualidade seminal, assim como, o efeito individual do garanhão ao diluente, o tipo de armazenamento, e a temperatura utilizada, influenciam na eficiência da técnica de resfriamento (AURICH, 2008 ; PUGLIESI, 2009).

No que diz respeito ao vigor, é uma análise que estima a intensidade do movimento do espermatozoide, sendo classificado de 1 a 5, onde 1 é mais lento e 5 mais rápido (CBRA, 2013). Mesmo não apresentando diferença significativa, pode-se observar uma tendência de um vigor melhor no diluente a base de leite com adição de colesterol (Diluyente 3), em todos os períodos testados (Figura 2).

No que concerne, todos os diluentes (a base de leite desnatado, o de caseína, e o de leite com adição de colesterol) apresentaram uma boa capacidade de manutenção da célula espermática durante o período de 36 horas. Dado que, no caso do diluente a base de leite desnatado, o resultado encontrado foi semelhante ao constatado por Farrás, (2008).

Almejando melhores resultados, e maior correlação com a qualidade seminal, um maior número de testes devem ser empregados para analisar a viabilidade dos espermatozoides submetidos a refrigeração, sendo estes relacionados a integridade de membrana, visto que, é uma das características mais afetadas pelos efeitos deletérios que ocorrem durante o processo. Com esse propósito, os corantes fluorescentes (sondas fluorescentes e fluorocromos), e o teste hiposmótico, podem ser empregados como análises criteriosas em relação a integridade funcional e estrutural da célula espermática (ARRUDA et al., 2007 ; MELO et al., 2005).



**Figura 1-** Distribuição das médias de motilidade, em três meios diluentes diferentes com avaliação nas horas 12, 24 e 36 pós-refrigeração.

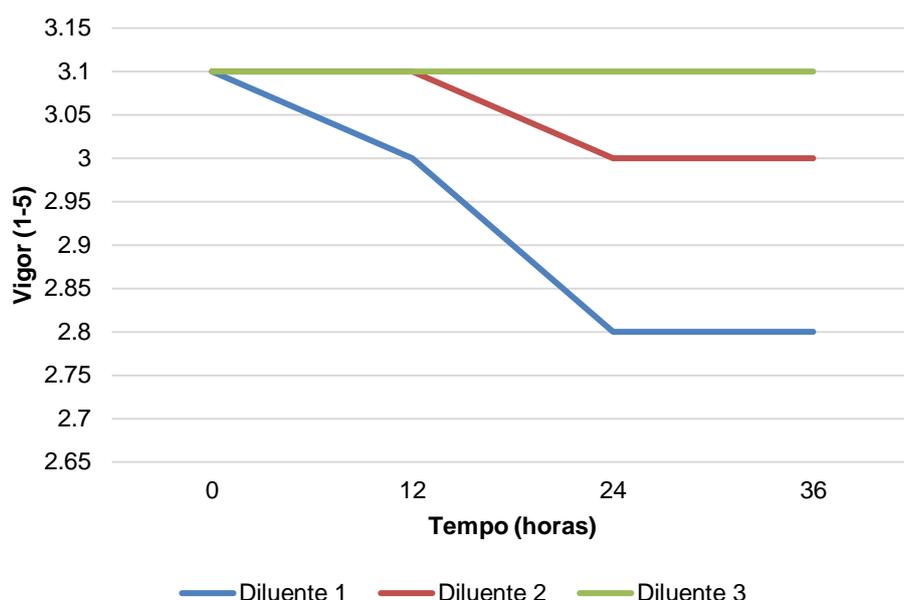


Figura 2- Distribuição das médias do vigor, em três meios diluentes diferentes com avaliação nas horas 12, 24 e 36 pós-refrigeração.

Tabela 1. Parâmetros de motilidade e vigor em três meios diluentes comerciais, nos tempos 12, 24 e 36 horas.

Sêmen	Fresco	Diluyente 1			Diluyente 2			Diluyente 3			
		0h	12h	24h	36h	12h	24h	36h	12h	24h	36h
Garanhão 01											
Motilidade (0-100%)	35	10	5	1	10	5	2	10	5	1	
Vigor (1-5)	2,5	2	2	2	2,5	2	2	2,5	2,5	2,5	
Garanhão 02											
Motilidade (0-100%)	98	95	92	92	96	95	95	95	95	95	
Vigor (1-5)	4	4	3,5	3,5	4	4	4	4	4	4	
Garanhão 03											
Motilidade (0-100%)	70	65	60	60	65	50	50	65	60	60	
Vigor (1-5)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	

### Conclusão

Com base nos resultados obtidos, todos os diluentes (a base de leite desnatado, o de caseína, e o de leite com adição de colesterol) foram eficazes na manutenção das células espermáticas dentro do período de 36 horas. Assim sendo, todos são eficientes para utilização e implementação nas biotécnicas de sêmen refrigerado.

O diluente a base de leite com adição de colesterol apresentou uma tendência a manter o vigor espermático mais estável do que os demais diluentes, até o tempo de 36 horas.

Sendo importante evidenciar, a presença do efeito individual do garanhão, visto que, mesmo não apresentando diferença estatística, é sempre indicado testar vários produtos, para observar qual melhor se adequa ao indivíduo. E reforçar que para utilização do sêmen refrigerado, os garanhões devem se enquadrar nos parâmetros necessários de

acordo com CBRA para melhor garantia de sucessora aplicação da técnica.

O meio de refrigeração passivo utilizado se mostrou eficaz na manutenção da temperatura em 5 graus Celsius. Portanto, podendo ser utilizado com segurança para o transporte e manutenção da viabilidade espermática.

Tendo em vista novos estudos, além do modo subjetivo de avaliação, outras ferramentas podem ser empregadas, dentre elas, as realizadas por sistemas computadorizados, como o CASA (Computer assisted sperm analysis), pois é um programa que gera resultados mais objetivos e acurados, aprimorando assim a técnica de avaliação seminal.

### Referências

ALVERENGA, M.A.; PAPA, F.O.; NETO, C.R. Técnicas para o incremento da qualidade do sêmen de garanhões. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.41, n.1, p.81-85, 2017.

- ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; PERES, K.R.; RAPHAEL, C.F.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E. C.C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31,n.1, p.8-16,2007.
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; OLIVEIRA, L.Z NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K.M.; JAIMES, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.35, n.2, p.145-151, 2011.
- AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. *Animal Reproduction Science*, v.107, p.268-275,2008.
- BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D. Artificial insemination. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (Eds.). *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea &Febiger, 1992. p.790-797.
- CANISSO, I.F. et al. Inseminação Artificial em Equinos: sêmen fresco, diluído, resfriado e transportado. *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais*, v.6, n.3, p.389-398, 2008.
- 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.
- CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3 ed., Belo Horizonte: CBRA,91 p., 2013.
- KAYSER, J.P.; AMANN, R.P.; SHIDELER,R.K.; SQUIRES, E.L.; JASKO, D.J.; PUCKETT, B.W. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.38, n.4, p.601-614,1992.
- KENNEY, R.M.; BERGMAN R.V.; COOPER W.L. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. In: ANNUAL CONVECTION, AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS,1975. Proceedings...Boston: AAEP,1975. v.21, p.327-335.
- LOOMIS, P.R. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v.22, p.663-676,2006.
- MELO, M.I.V.; HENRY, M.; BEKER, A.R.C.L. Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen equino resfriado com diferentes diluidores. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.6, p.757-763,2005.
- MORAN, D.M.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.38, p.999-1012, 1992.
- NUNES, D.B.; ZUCCARI, C.E.S.N.; COSTA E SILVA, E.V. Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.30, n.1/2, p.42-56, 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.
- PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.7, p.289-302,1987.
- PUGLIESI, G. Viabilidade e fertilidade do sêmen equino resfriado a 5°C por 24 horas com dois diluidores. 2009. 123f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG,2009.
- SILVA FILHO, J.M. Aspects of the reproductive handling and of semen in the artificial insemination in mares. 1994. 402f. Thesis (Doctor Scientiae) – Department of Science Federal University of Viçosa. Viçosa, Minas Gerais, 1994.