

## MEIO DE CULTIVO CELULAR (HAM F10) NA CONGELABILIDADE DO SÊMEN EQUÍNO

Fabiola dos Santos Ramos<sup>1</sup>  
Lucina Vieira Pinto<sup>1</sup>  
Luiz Paulo Rigolon<sup>2</sup>  
Fábio Luiz Bim Cavalieri<sup>2</sup>  
Daniel Peraro<sup>1</sup>  
Max Gimenes Ribeiro<sup>2</sup>

**RESUMO:** O trabalho teve como objetivo verificar o efeito de dois diluidores na congelabilidade e fertilidade do sêmen equino. O experimento foi realizado no centro de reprodução animal da CESUMAR, no período de setembro de 2002 a abril de 2003. Foram utilizados dois garanhões das raças Quarto de Milha e Crioulo. O sêmen foi coletado com o auxílio de uma vagina artificial e o ejaculado diluído e congelado com dois diferentes diluidores (Martin et al. 1979 – controle e Martin et al. + 10% de HAM F10). Após avaliado, o sêmen foi diluído 1/1 no diluidor Kenney (1979) e centrifugado. Em seguida, o sêmen foi rediluído, envasado e permaneceu à temperatura de 5° C durante 80 minutos, sendo, posteriormente, mantido 15 min no vapor de nitrogênio e logo após congelado. Após a descongelação, o sêmen foi avaliado quanto à motilidade (0-100%) e ao vigor (0-5) espermático. Houve um aumento ( $p < 0,05$ ) da motilidade e vigor dos espermatozoides quando se incluiu o HAM F10 no meio de congelamento no momento do envase a 5° C. Todavia, a inclusão do HAM F10 não alterou a motilidade e o vigor dos espermatozoides pós-descongelação, o que poderia estar relacionado com a proporção do meio de cultivo celular no diluente de congelamento do sêmen equino. Desta forma, conclui-se que a inclusão de 10% do meio de cultivo celular HAM F10 aumentou a motilidade e o vigor dos espermatozoides antes do congelamento do sêmen, não alterando a motilidade e o vigor pós-congelamento do sêmen equino

**PALAVRAS-CHAVE:** equino, sêmen, congelação

### **CELL CULTIVATION MEDIUM (HAM F10) IN THE FREEZING OF EQUINE SEMEN**

**ABSTRACT:** *This work has had the objective of verifying the effects of two diluents in the freezing and fertility of equine semen. The experiment was carried out at the Animal Reproduction Center at CESUMAR, during the period from September 2002 and April 2003. A Quarter Mile and Creole stallions were used. The semen was collected with the help of a fake vagina and the result was diluted and frozen in two different types of diluents (Martin et al. 1979 – control; and Martin et al + 10% of HAM F10). After an initial evaluation, the semen was diluted 1/1 in a Kenney dilutor (1979) and centrifuged. Later, the semen was rediluted, bottled and kept at a temperature of 5°C during 80 min. After that, it was kept for 15 min in nitrogen vapor and then frozen. After thawing the semen was assessed in regard to its motility (0-100%) and spermatic vigor (0-5). There was an increase ( $p < 0.05$ ) in the motility and spermatozoa vigor when (HAM F10) was included in the freezing medium at the moment of bottling at 5°C. However, the inclusion of HAM F10 did not alter motility and spermatozoa vigor after thawing, which may be related to the proportion of cell cultivation medium in the freezing diluent of the equine semen. Therefore, we conclude that the inclusion of 10% of cell cultivation medium HAM F10 increased motility and spermatozoa vigor before the semen's freezing, but it did not alter motility and spermatozoa vigor after the equine semen's thawing.*

**KEYWORDS:** *Equine, semen, freezing.*

<sup>1</sup> Alunas do Curso de Medicina Veterinária do Cesumar

<sup>2</sup> Professores do Curso de Medicina Veterinária do Cesumar

## Introdução

A inseminação artificial é uma importante biotecnologia da reprodução animal, pois reduz o sobre uso do garanhão e riscos de injúrias, permite controlar as doenças sexualmente transmissíveis, contribui para o melhoramento genético, eleva a relação macho / fêmea e permite a utilização de indivíduos de grande valor genético que apresentam impedimento físicos à monta natural.

Uma das técnicas ainda muito difundida na reprodução equina é a utilização da inseminação artificial com sêmen resfriado, que apresenta ainda muitos inconvenientes, principalmente porque o período de utilização do sêmen se torna limitado. Dessa forma, a utilização da inseminação artificial com sêmen congelado proporciona inúmeras vantagens: armazenamento a baixas temperaturas por um período de tempo indeterminado, utilização do sêmen de animais excepcionais, mesmo após a perda da idade reprodutiva ou morte, facilidade de transporte do sêmen a grandes distâncias, entre outras (Neto, 1998). Todavia, a eficiência ainda está distante do sucesso obtido com a congelação do sêmen bovino (Amann e Pickett, 1987; Pickett et al., 1987). Klug et al. (1980) afirmaram que 15 a 20 % dos reprodutores estão aptos a doar sêmen com índices de congelabilidade aceitáveis.

Os procedimentos básicos para o sucesso da criopreservação exigem: um meio de diluição apropriado para a célula espermática, acondicionamento do sêmen em doses e recipientes adequados, uma curva de resfriamento lenta até os 5° C, diluidores que contenham agentes crioprotetores, uma curva de congelação relativamente rápida entre os 5° C e - 100° C, armazenamento do sêmen congelado a - 196° C e descongelação rápida de -196° C para 37° C (Pickett et al., 1987).

Os principais meios de congelação do sêmen equino são o Merk-gema (Martin et al., 1979), Glicina-gema (Papa et al., 1993) e BME adaptado (Neto, 1998). No entanto, todos esses meios ainda apresentam valores de motilidade e vigor espermático variando de 40 a 53% pós-descongelação e taxa de gestação de 40 a 50%. Desse modo, o desenvolvimento de novas técnicas de congelação do sêmen equino, pode trazer benefícios quanto aos índices de congelabilidade e fertilidade. Todavia, é importante observar que os trabalhos referentes à congelação de sêmen equino não mencionam a utilização de meios de cultivo celular, como o BME adaptado e o HAM F10, que são compostos de complexo aminoácidos, vitamínicos e componentes essenciais, que podem melhorar o nível de proteção celular, pela qualidade e quantidade de substâncias, que podem melhorar o nível de proteção celular, bem como fornecer substâncias nutricionais, anti-

oxidante e mantenedoras de pH e pressão osmótica semelhante ao do sêmen (Neto, 1998).

Assim torna-se importante avaliar o efeito da inclusão de meios de cultivo celular nos meios de congelação de sêmen equino. Neto (1998) observou um aumento na motilidade e vigor espermático ao incluir o BME (meio de cultivo celular) quando comparado aos meios tradicionalmente utilizados. Todavia, quanto ao HAM F-10, não existe relato na literatura sobre o seu efeito na congelabilidade do sêmen equino.

## Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da inclusão do meio HAM F10 na congelabilidade do sêmen equino.

## Material e métodos

O trabalho foi desenvolvido no setor de reprodução animal do centro de ensino superior de Maringá (CESUMAR), de setembro de 2002 a abril de 2003. Foram utilizados 10 ejaculados provenientes de 2 garanhões das raças Quarto de Milha e Crioulo, com 05 e 10 anos de idade, respectivamente. Os animais foram submetidos a um rigoroso exame clínico-reprodutivo e considerados aptos para o experimento.

Para a colheita do sêmen foi utilizada uma égua em cio devidamente contida e uma vagina artificial aquecida a uma temperatura de 45°C, formada por um tubo rígido (PVC), medindo 45 cm de comprimento e 15 cm de diâmetro, tendo na extremidade uma ponta semi-fechada onde se encaixou um tubo coletor com capacidade de 300 mL. Este tubo foi revestido com uma membrana flexível de látex com talco, simulando a vagina da fêmea equina.

Imediatamente após as colheitas, foram realizados exames macro e microscópicos dos ejaculados e os dados obtidos de cada animal foram anotados em fichas individuais. A congelação do sêmen foi realizada com base em dois diluidores, segundo Martin et al. (1979), e um novo diluidor composto de 90% de Martin et al. (1979) e 10% de HAM F10 (Tabela 1).

**Tabela 01.** Composição dos diluentes utilizados na congelação do sêmen equino.

Constituinte	Quantidade (ml)	
	Controle (Martin et al., 1979)	Controle + HAM F10 (Martin et al., 1979 + 10% HAM F10)
Solução de lactose a 11%	50.00	40.00
Diluyente Merck ou EDTA <sup>1</sup>	24.20	24.20
Gema de Ovo	20.00	20.00
Glicerol	5.00	5.00
HAM F10 <sup>2</sup>	-	10.00
Água bidestilada qsp	100.00	100.00

<sup>1</sup> Glicose monohidratada 6.0 gr; Citrato de sódio 0.375 gr; EDTA 0.370 gr; Bicarbonato de sódio 0.320 gr, Penicilina G 1000000 UI; Estreptomicina; 0.1 gr; Água bidestilada qsp 100 ml.

<sup>2</sup> SAIS INORGÂNICOS (mg/L): L-fenilalanina 5,00; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 44,100; L-prolina 11,50; CuSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,0025; L-Serina 10,50; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,834; L-treonina 3,57; KCl 285,000; L-triptofano 0,60; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 83,000; L-tirosina 2,61; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 152,800; L-valina 3,50; NaCl 7.400,000; NaHCO<sub>3</sub> 1.200,751; VITAMINAS (mg/L): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 153,700; Biotina 0,024; Pantotenato de Cálcio 0,715; AMINOACIDOS (mg/L): Cloreto de colina 0,698; L-alanina 9,00; Ácido Fólico 1,320; L-arginina.HCl 211,00; Inositol 0,541; L-asparagina.H<sub>2</sub>O 15,01; Niacinamida 0,615; L-ácido aspártico 13,00; Piridoxina.HCl 0,206; L-cisteína 35,00; Riboflavina 0,376; L-ácido glutâmico 14,70; Tiamina 1,000; L-glutamina 146,00; Vitamina B-12 1,360; Glicina 7,58; L-histidina.HCl.H<sub>2</sub>O 23,00; OUTROS COMPONENTES (mg/L): L-isoleucina 2,60; Glicose 1.100,00; L-leucina 13,00; Hipoxantina 4,00; L-lisina 29,00; Ácido Lipóico 0,20; L-metionina 4,48; Vermelho de Fenol 1,20; Piruvato de Sódio 110,00; Timidina 0,70.

Os ejaculados foram fracionados em duas alíquotas iguais e diluídos com uma solução de meio Kenney (1975), utilizado comumente no resfriamento do sêmen equino, na proporção de 1:1 e centrifugados por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensionado com os meios propostos para a congelação.

As doses foram envasadas em palhetas de 0,5 mL, cada uma contendo 100x10<sup>6</sup> espermatozoides e submetidas, primeiramente, a um período de estabilização de uma hora na geladeira a 5 °C. Em seguida, os palhetes foram suspensos a 3 cm do nível de nitrogênio líquido (vapor de nitrogênio) por 15 minutos e depois mergulhadas a -196 °C (nitrogênio líquido) e armazenadas em botijões criobiológicos. A descongelação das doses foi realizada em água, à temperatura de 38° C / 30 segundos. As avaliações do sêmen, após a descongelação, foram feitas da seguinte maneira: uma gota de sêmen foi colocada sobre uma lâmina aquecida a 38° C e examinada por meio de microscopia de contraste de fase com aumento de 100 e 400 X, sendo os resultados da motilidade emitidos em porcentagem (0-100%) e o vigor numa escala de 0 a 5 pontos, onde foram diferenciados os espermatozoides móveis dos imóveis. A motilidade e vigor dos espermatozoides foram avaliadas em cada etapa do processo: coleta, diluição no Kenney (1975), ressuspensão em meios diluidores, resfriamento a 5 °C, vapor de nitrogênio, congelação e descongelação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com dois tratamentos e dez repetições cada, de acordo com o modelo apresentado abaixo:

$$Y_{ij} = m + T_i + e_{ij}$$

Em que:

$Y_{ij}$  = Observação referente ao animal j, submetido ao tratamento i (i=1,2);

$T_i$  = Efeito do tratamento i (i= 1,2);

$e_{ij}$  = Erro aleatório associado a cada observação.

Para as análises da motilidade e vigor espermáticos foram utilizados os métodos dos quadrados mínimos, utilizando o sistema de análises estatísticas (SAEG 1998).

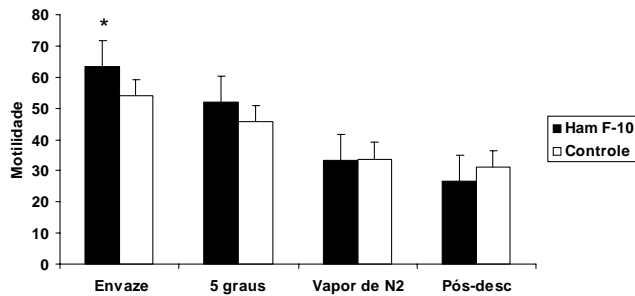
## Resultados e Discussão

Houve um aumento ( $p < 0,05$ ) na motilidade progressiva (Figura 01) no sêmen diluído com o meio contendo o HAM F10 no momento do envase do sêmen. A motilidade espermática propicia uma avaliação das condições fisiológicas de uma amostra de sêmen, portanto não se constitui em um prognóstico seguro da capacidade fecundante (Neto, 1998). Contudo, a motilidade espermática, mesmo sendo um exame subjetivo, representa um parâmetro útil na avaliação da viabilidade espermática. Pickett (1993) mostrou que a motilidade espermática, bem como o tempo de vida dos espermatozoides, são parâmetros importantes no critério de avaliação dos índices de fertilidade. A motilidade espermática, pós-descongelação, foram de 27 e 32% para os meios de Martin et al. (1979) e Martin et al. (1979) + HAM F10, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com Martin et al. (1979) que obtiveram valores de motilidade de 32% para o sêmen congelado em "pellets".

No entanto, segundo Katila (1997) a glicose é considerada a principal fonte de energia para a atividade metabólica e movimento dos espermatozoides contidos nos meios de diluição do sêmen. Todavia, More (1999) afirmou que outros açúcares, tais como a lactose, rafinose, frutose e o piruvato, podem exercer efeitos semelhantes e na tabela 01 podemos observar que o meio HAM F10 apresenta certa quantidade de piruvato, o qual poderia, além de outros componentes contidos no meio, estar favorecendo uma maior motilidade dos espermatozoides.

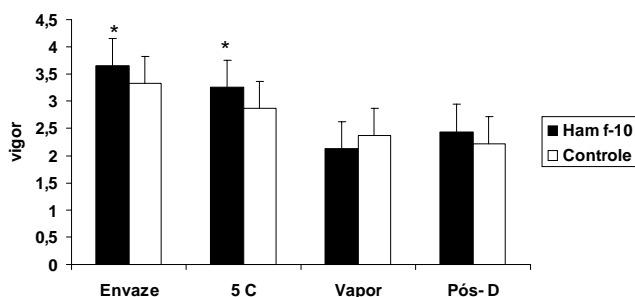
Por outro lado, não houve efeito ( $p > 0,05$ ) da inclusão do meio de cultivo celular HAM F10 na motilidade progressiva do sêmen equino nas outras diferentes fases do processo de congelação do sêmen. Esses resultados diferem daqueles encontrados por Neto (1998), os quais observaram um aumento na motilidade progressiva do sêmen após a descongelação no diluidor que continha o BME, um meio de cultivo celular; segundo os autores, este efeito positivo poderia estar relacionado com a melhora dos mecanismos

de proteção celular durante o processo de congelação impostos pelo meio de cultivo celular. No presente experimento, os nutrientes contidos na gema de ovo poderiam estar substituindo os efeitos benéficos no meio HAM F10 na motilidade progressiva do sêmen equino pós-descongelação, pois, de acordo com Vishwanath et al (2000) a gema de ovo apresenta uma lipoproteína que estabiliza a membrana plasmática dos espermatozoides, conferindo maior resistência aos mesmos das injúrias causadas à membrana celular durante o processo de congelação.



**Figura 1.** Valores das médias de porcentagem da motilidade do sêmen a fresco ( envase ) , a 5°C, ao vapor de nitrogênio e pós-descongelação nos diferentes diluidores (\* p<0,05).

Quanto ao vigor dos espermatozoides, houve efeito ( $p < 0,05$ ) da inclusão do meio HAM F10 somente no momento do envase e a posterior temperatura de 5°C (Figura 2). O vigor dos espermatozoides foi avaliado pela força com que o mesmo se movimenta no campo focalizado no microscópio. O aumento no vigor, nesta fase, poderia estar relacionado ao efeito das vitaminas e aminoácidos contido no meio de cultivo celular HAM F10, o qual foi adicionado no meio de Martin et al. (1979). Entretanto, não houve efeito da inclusão ( $p > 0,05$ ) do meio HAM F10 no vigor dos espermatozoides logo após a descongelação, o que não está de acordo com as observações de Neto (1998), que encontrou efeito positivo da inclusão de meios de cultivo celular no vigor espermático pós-descongelação do sêmen. Talvez a quantidade de 10% de substituição da solução de lactose a 11% não seja o suficiente para afetar o metabolismo e o nível de proteção dos espermatozoides após a congelação, sendo necessário verificar o efeito da inclusão de quantidades superiores de HAM F10 no meio de congelação de sêmen equino.



**Figura 2.** Valores das médias de vigor dos espermatozoides do sêmen fresco (envase) , a 5°C, ao vapor de nitrogênio e pós-descongelação nos diferentes diluidores (\* p<0,05).

## Conclusão

Com base nas condições em que o resfriamento foi realizado, pode-se concluir que a inclusão de 10% de meio de cultivo celular HAM F-10 não alterou a motilidade e o vigor espermático após a congelação de sêmen equino.

## Referências

- AMANN, R.P. Principals of cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal Equine Veterinary Science*. V.7, p.145-173, 1987.
- KATILA, T. Procedures for handling fresh stallion semen. *Theriogenology*, v. 48, n.7, p.1217-1227, 1997.
- KENNEY, R.M., et al. Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. *Proceedings American Association Equine Practitioner*. V.21, p.327-336, 1975.
- KLUG, E. et al. Las characteristics del ejaculado como criterio importante para seleccion de sementales en la insemination con semen congelado. *Archives Medicine Veterinaria*, v.12, p. 163-171, 1980.
- MARTIN, J.C. et al Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal Reproduction and Fertility*, suppl., v.27, p.47-51, 1979.
- MORE, M.D., Equine artificial insemination. Cab publishing, 341p, 1999.
- NETO, R.N.P. Avaliação da congelabilidade e fertilidade do sêmen equino frente a diferentes diluidores. Botucatu, 1998. 60p. Tese – Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- PAPA, F.O. et al. Glicina – Gema: proposta de um novo diluidor para congelação de sêmen equino. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 11, 1993, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1993, v.2, p.326, 1993.
- PICKETT, B.W. et al. Procedure for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination. Fort Collins: Colorado State University. 1987. p.125 (Bulletin, 03).
- VISHWANATH, R. SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.23-53, 2000.