

AVALIAÇÃO DA NECESSIDADE DO TEMPO DE EQUILÍBRIO NO CONGELAMENTO DE SÊMEN CAPRINO

Paula Letícia Nemes Schawb Gomes¹; Leandro Cavalcante Lipinski²; Raimundo Jorge Teles
de Araújo Pereira³

¹ Acadêmica do 8º período do curso de Medicina Veterinária do CESCAGE - Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais, Ponta Grossa - PR, Brasil. CEP: 84010-410.

² Professor Adjunto do curso de Medicina Veterinária do CESCAGE – Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais, Ponta Grossa – PR, Brasil.

³ Professor Titular e Coordenador do curso de Medicina Veterinária do CESCAGE - Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais, Ponta Grossa - PR, Brasil.

E-mail: rjtapereira@yahoo.com.br, raimundo@cescage.edu.br (autores correspondentes)

PALAVRAS-CHAVE: Criopreservação, espermatozóides, pequenos ruminantes.

ABSTRACT

ASSESSMENT OF EQUILIBRATION TIME IN THE FREEZING OF GOAT SEMEN

The process of cryopreservation causes a marked decrease in sperm viability. Essential measures are followed to prevent changes in sperm cells during freezing, such as the cooling of semen to 5°C before the freezing process. This study evaluates the effect of equilibration periods on quality of frozen goat semen. A total of 8 semen samples from one adult goat were collected by artificial vagina and cryopreserved. The experiment was performed in two stages: Group A – semen cooling to +5°C at 0,25 °C/min (equilibration time of 1 hour), and semen freezing to -120°C at 0,25°C/min; Group B – same cooling and freezing phases, but without the equilibration period (Group B). Analysis of progressive motility revealed that the equilibrium time at 5°C is unnecessary for cryopreservation of goat semen due to the fact that both groups showed a MIP of 65% after thawing.

KEYWORDS: Cryopreservation, small ruminants, sperm

INTRODUÇÃO

O sêmen caprino pode ser usado a fresco, resfriado ou congelado. Tanto o sêmen fresco bem como o resfriado apresentam fertilidade mais elevada, quando comparados ao congelado (SALAMON & MAXWELL, 2000), contudo o caprino por tratar-se de uma espécie que apresenta estacionalidade reprodutiva a utilização do sêmen em estado fresco ou

resfriado pode ficar limitado a determinados períodos do ano. Já o sêmen criopreservado por ser mantido por um longo período armazenado em nitrogênio líquido, apresenta maior aplicabilidade (TRALDI, 2006).

O sêmen caprino foi inicialmente congelado por SMITH & POLGE (1950), cujos autores registraram uma baixa fertilidade pós-descongelção, o que limitava a sua utilização prática, sendo, portanto motivo de muitas investigações no âmbito da criopreservação em todas as etapas envolvidas no processo (LEBOEUF et al., 2000).

O tempo de equilíbrio é considerado o tempo total em que os espermatozoides são mantidos em contato com o glicerol e todos os demais componentes do diluidor, previamente à congelção (BITTENCOURT et al., 2006). Durante esse período, ocorre o equilíbrio osmótico entre o meio intracelular espermático e extracelular, formado por todos os componentes osmoticamente ativos presentes no meio diluidor (SALAMON & MAXWELL, 2000). Segundo OETTLÉ (1986), um apropriado período de equilíbrio, assim como adequadas taxas de diluição e resfriamento celular, são fatores fundamentais para a prevenção do surgimento de alterações espermáticas durante o processo de criopreservação espermática, além do que uma otimização dos processos iniciais de pré-congelção pode aumentar os índices de viabilidade espermática pós-descongelção.

A inseminação artificial é considerada a mais antiga biotécnica da reprodução promovendo notáveis ganhos genéticos no melhoramento dos animais domésticos. O uso do sêmen congelado apresenta inúmeros benefícios como o melhor aproveitamento de reprodutores, facilidade no comércio e transporte de material genético superior, permitindo assim a introdução de novas linhagens no rebanho com maior segurança sanitária, preservação de genética diferenciada entre outras vantagens (SALAMON & MAXWELL, 1995).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a necessidade do uso do tempo de equilíbrio a 5°C antes do início da curva negativa de congelção de sêmen caprino.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de andrologia do Centro de Biotecnologia de Reprodução Animal do CESCAGE, localizado na cidade de Ponta Grossa-PR, durante o período de novembro a dezembro de 2008. Neste estudo foi utilizado 01 reprodutor da raça Boer, com idade de 04 anos e fertilidade comprovada. Foram realizadas 08 coletas de sêmen em dias alternados. O reprodutor foi mantido em pastagem de Aruana, com

água e sal mineral *ad libitum*, além da suplementação de 0,4kg/dia de concentrado comercial com 18% PB e feno de Tifton. As coletas do sêmen foram realizadas utilizando uma vagina artificial, tendo como manequim uma cabra com estro induzido ou natural.

Imediatamente após a coleta, o sêmen foi mantido em banho maria numa temperatura de 37°C para realização dos exames físicos (volume, cor e aspecto) e microscópico (turbilhão, vigor e motilidade progressiva). O turbilhonamento foi avaliado pela deposição de uma gota do sêmen sobre a lâmina aquecida observando-se movimentos de onda em escala de 0 a 5. A motilidade progressiva-MIP (0 a 100%) e o vigor (0 a 5) foram observados pela deposição de uma gota de sêmen diluído entre lâmina e lamínula com objetiva de 200x, de acordo com o indicado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) (HENRY & NEVES 1998). A determinação da concentração espermática foi feita com o auxílio da câmara de Neubauer, utilizando-se sêmen numa diluição de 1:400 em solução de formol-salina tamponada (SALAMON & MAXWELL, 2000).

O sêmen foi diluído em TRIS-GEMA-GLICEROL a 7%, sendo imediatamente envasado em palhetas de 0,25ml, lacradas com álcool polivinílico, numa dose inseminante de 100×10^6 espermatozoides/ml. Todo o processo de congelamento foi realizado na máquina TK3000[®], feito em duas etapas, sendo a primeira etapa referente à curva positiva (resfriamento a 0,25°C/min. até alcançar +5° C) e a segunda etapa referente à curva negativa (congelamento a partir de +5° C numa velocidade de 0,25%/min. até atingir -120°C). Para avaliar a influência do tempo de equilíbrio foram conduzidos 02 grupos experimentais: Grupo A – O sêmen resfriado foi mantido em equilíbrio por 1 hora na temperatura de +5°C, para então ser colocado na curva negativa e o Grupo B – O sêmen foi colocado diretamente na curva negativa sem fazer uso do tempo de equilíbrio. A descongelação em ambos os grupos estudados foi realizada em banho Maria a 37°C por 20 segundos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desde o primeiro registro do congelamento de sêmen caprino, realizado por SMITH & POLGE (1950), quando esses autores já reportavam baixos índices de fertilidade pós-descongelação, muitos estudos têm sido desenvolvidos sobre a criopreservação do sêmen caprino e todas as etapas envolvidas no processo (LEBOEUF et al., 2000). Neste contexto muitas investigações têm sido desenvolvidas para avaliar o efeito do tempo de equilíbrio sobre a qualidade espermática pós descongelação. Embora OETTLÉ (1986) tenha indicado que um apropriado período de equilíbrio, assim como adequadas taxas de diluição e

resfriamento celular, são fatores fundamentais para a prevenção do surgimento de alterações espermáticas durante o processo de criopreservação espermática, os resultados apresentados na literatura sobre a influência do período de equilíbrio sobre os índices de motilidade espermática pós descongelação são bastante conflitantes, cuja influência tem variado de 1 hora entre os trabalhos analisados. WESTHUYSEN (1978) verificou que maiores tempos de equilíbrio proporcionaram melhores índices de motilidade pós descongelação quando comparado a períodos de equilíbrio inferiores. Enquanto que SINHA et al. (1992) obtiveram os melhores resultados de motilidade espermática pós descongelação, utilizando um tempo de equilíbrio (TE) de 4h, DAS & RAJKONVAR (1993) e DAS & RAJKONVAR (1995) observaram que o sêmen mantido por 3h em TE obteve melhores índices de motilidade pós descongelação, em relação ao sêmen submetido a 1h de TE. Já BITTENCOURT et al. (2006) observaram que o tempo de equilíbrio de 2h (G2) foi o que obteve os melhores índices de viabilidade espermática pós descongelação. Discordando com todos os resultados da literatura, BARUAH et al. (2003) não verificaram diferenças significativas em relação às taxas de motilidade espermática e lesões acrossomais, para as amostras de sêmen equilibradas por 0,5, 1 e 1,5h. Estes resultados foram corroborados pelos encontrados no presente estudo, quando observamos uma similaridade nos índices de motilidade progressiva de 65% em ambos os grupos estudados, tanto sem utilização de tempo de equilíbrio bem como com um tempo de equilíbrio de 1h. Este resultado pode ser explicado diante do fato de que os diversos trabalhos apresentados na literatura utilizam diferentes metodologias, o que poderia interferir diferentemente nos resultados encontrados, além do que o tempo de equilíbrio a que os espermatozoides devem ser mantidos depende tanto da taxa de resfriamento que o sêmen será submetido previamente à congelação (SALAMON & MAXWELL, 1995), bem como da composição da fonte de açúcar presente no diluidor e da concentração de glicerol utilizada (LIGHTFOOT & SALAMON, 1969).

CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo indicam ser desnecessário a utilização de tempo de equilíbrio na temperatura de 5°C antes do início da curva negativa de congelação.

A não utilização do tempo de equilíbrio na congelação de sêmen caprino implica diretamente numa otimização do tempo disponibilizado durante todo o processo reduzindo em pelo menos 1 hora de trabalho empregado.

REFERÊNCIAS

BARUAH, C.K.; BISWAS, R.K.; DEKA, B.C.; BORGHAIN, B.N. Effect of glycerol equilibration periods on quality of frozen semen in Beetal x Assam local crossbred goats. **Indian Veterinary Journal**, Madras, v. 80, n. 8, p. 763-765, 2003.

BITTENCOURT, R. F., RIBEIRO FILHO, A. L., ALVES, S. G. G., BISCARDE, C. E., VASCONCELOS, M. F., OBA, E. O efeito do tempo de equilíbrio sobre a qualidade do sêmen caprino criopreservado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 7, n. 1, p. 27-37, 2006.

DAS, K. K.; RAJKONWAR, C. K. A study on the characteristics of Beatal buck semen and its freezability. **Journal of Veterinary Physiology and Allied Sciences**, Izatnagar, v. 12, n. 2, p. 6-16, 1993.

DAS, K. K.; RAJKONWAR, C. K. Effects of equilibration periods on the motility of frozen buck semen in raffinose egg yolk glycerol extender. **Indian Journal of Animal Research**, Haryana, v.29, n.2, p.141-144, 1995.

HENRY, M.; NEVES, J. P. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p.49, 1998.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.62, p.113-141, 2000.

LIGHTFOOT, R. J.; SALAMON, S. Freezing of ram semen by the pellet method. II. The effect of method of dilution, dilution rate, glycerol concentration, and duration of storage at 5°C prior to freezing on survival of spermatozoa. **Australian Journal of Biological Science**, Melbourne, v. 22, p. 1547-1560, 1969.

OETTLÉ, E. E. Changes in acrossome morphology during cooling and freezing of dog semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 12, p. 145-150, 1986.

SALAMON, S., MAXWELL W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 62, p. 77-111, 2000.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 37, p. 185–249, 1995.

SINHA, S.; DEKA, B. C.; BORGOHAIN, B. N.; TAMULI, M. K. Study on freezing of goat semen in skim milk extender with different glycerol levels and equilibration periods. **The Indian Journal of Animal Sciences**, New Delhi, v. 13, n. 1, p. 38-41, 1992.

TRALDI A. S. Biotécnicas aplicadas em reprodução de pequenos ruminantes. In: **FEINCO 3**, 2006.

WESTHUYSEN, J. M. VAN DER. Observations on the deep-freezing of Angora goat semen. **South African Journal of Animal Science**, Pretoria, v. 8, n. 2, p. 111-113, 1978.