

Reconcentração do sêmen congelado de carneiros por centrifugação da palheta após a descongelação: efeito sobre a cinética espermática

Ana Cláudia França de Freitas¹, Rebeca Santos da Silva¹, Cosme Washington Santos de Jesus², Gabriel Felipe Oliveira de Menezes³, Alexandre Nizio Maria⁴, Paulo César Falanghe Carneiro⁴, Hymerson Costa Azevedo⁴

Resumo

A inseminação artificial cervical (IAC) mostra-se uma opção economicamente viável para o incremento da produção de ovinos, desde que se consiga minimizar as dificuldades inerentes à técnica e à espécie e que se maximizem seus índices de fertilidade. O refluxo seminal durante a IAC devido à limitada capacidade volumétrica da cérvix promove uma diminuição de sêmen e consequentemente de espermatozoides disponíveis para o transporte ao sítio de fertilização. Nessa perspectiva, a centrifugação do sêmen ovino surge como alternativa para se depositar um elevado número de espermatozoides viáveis, em pequenos volumes de dose inseminante. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da centrifugação do sêmen descongelado sobre a cinética espermática a fim de analisar a viabilidade da reconcentração dos espermatozoides como meio de redução do volume da dose inseminante. Amostras de sêmen de cinco carneiros da raça Santa Inês foram congeladas em palhetas de 0,25 mL contendo 100×10^6 espermatozoides e submetidas à centrifugação por 10 minutos após a descongelação (37°C/ 30 segundos) para posteriormente serem avaliadas de acordo com os seguintes grupos de

¹ Médica-veterinária, mestre em Zootecnia, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE.

² Graduando em Medicina Veterinária, bolsista Fapitec/PIBIC, Faculdade Pio Décimo, São Cristóvão, SE.

³ Médico Veterinário, Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais, UFS, Aracaju-SE.

⁴ Zootecnista, doutor em Produção Animal, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

⁵ Engenheiro-agrônomo, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁶ Veterinário, doutor em Reprodução Animal, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

amostras removidas das palhetas: antes da centrifugação (NC – Controle) e, pós-centrifugação a 800 (96 g), 1000 (150 g) e 1200 (217 g) rpm. Foi realizada a análise da cinética espermática através de sistema computadorizado no momento da descongelação (TOh) e após incubação à 37°C por 2h (T2h) e 4h (T4h) sendo avaliados os parâmetros: motilidades total (MT) e progressiva (MP); velocidades do percurso médio (VAP), em linha reta (VSL) e curvilínea (VCL); retilinearidade (STR) e; linearidade (LIN). A maior força centrífuga usada (1200rpm - 217g) aumentou significativamente ($p < 0,05$) as velocidades (VAP, VCL, VSL), no TOh. Nos demais tempos de incubação T2h e T4h não diferiram ($p > 0,05$) para nenhum dos parâmetros cinéticos testados. A centrifugação da palheta de sêmen congelado de carneiros após descongelação a uma força centrífuga de 1200rpm (217g) durante dez minutos promove um aumento na velocidade cinética e não afeta a proporção de células com motilidade total e progressiva, linearidade e retilinearidade dos espermatozoides, podendo ser utilizada como estratégia de reconcentração espermática para redução do volume da dose inseminante e de refluxo seminal nas inseminações cervicais.

Palavras-chave: espermatozóide, fertilidade, refluxo seminal, ovinos.

Introdução

A produção de ovinos auxiliada com a inseminação artificial cervical (IAC) mostra-se uma opção economicamente viável, desde que se consiga minimizar as dificuldades inerentes à técnica e maximizar os índices de fertilidade na espécie. Uma dificuldade relatada é a ocorrência do refluxo seminal tendo em vista a limitada capacidade volumétrica da cérvix (RITAR et al., 1993; AZEVEDO et al., 1997; KERSHAW et al., 2005). O refluxo promove uma diminuição de sêmen disponível, levando a retenção de um número insuficiente de espermatozoides no útero das fêmeas para o transporte ao sítio de fertilização (JONDET, 1987). Nessa perspectiva a centrifugação do sêmen ovino surge como alternativa para se depositar um elevado número de espermatozoides viáveis, em pequenos volumes de dose inseminante (COLAS; GUERÍN, 1981).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da centrifugação do sêmen descongelado sobre a cinética espermática a fim de analisar a viabilidade da reconcentração dos espermatozoides como meio de redução do volume da dose inseminante.

Material e Métodos

Foram utilizados cinco carneiros da raça Santa Inês como doadores de sêmen, sendo colhidos três ejaculados de cada um por meio de vagina artificial à temperatura de $\pm 42^{\circ}\text{C}$ e uma fêmea em estro como manequim. As amostras colhidas foram mantidas em banho-maria a 32°C e avaliadas de acordo com o preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal CBRA (1998). Foram selecionadas para a congelamento amostras que apresentaram como parâmetros espermáticos mínimos 70% de motilidade e 3 de vigor avaliados subjetivamente, 60% de viabilidade pela coloração da eosina-nigrosina e no máximo 20% de alterações morfológicas em câmara úmida (PBS + glutaraldeído a 0,2%).

As amostras de sêmen foram diluídas em meio glicina-gema-leite (Osmolaridade: 281,5 mOsm e pH: 7,3), segundo Gonzalez (1996) com modificações realizadas por Bandeira (2011) e Rodello et al. (2011), e submetidas à congelamento automatizada em palhetas de 0,25mL com concentração espermática de $400 \times 10^6/\text{mL}$ (refrigeração a $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 5°C , estabilização por 90 minutos, congelamento a $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ - de 5°C à -80°C -, e $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ - de -80°C à -140°C - e, imersão em nitrogênio líquido à -196°C).

As palhetas contendo as amostras de sêmen foram descongeladas a $37^{\circ}\text{C}/30\text{s}$ e divididas em grupos (não centrifugado e centrifugados) durante 10 minutos em uma centrífuga (Centribio® – Mod. 80 2B, Centribio Co., LTDA, China) adaptada, sendo testadas três diferentes velocidades: 800, 1000 e 1200 rpm correspondendo a respectivamente 96, 150 e 217g. A análise da cinética espermática foi realizada por meio do software *Sperm Class Analyzer* (SCA®, Microptics, S.L. Versão 5.0, Barcelona, Espanha), imediatamente após a descongelamento (0h) e após a incubação em banho-maria (37°C) em solução de avaliação por duas (T2h) e quatro (T4h) horas, sendo considerados os seguintes parâmetros: motilidades total (MT) e progressiva (MP); velocidades do percurso médio (VAP), em linha reta (VSL) e curvilínea (VCL); retilinearidade (STR) e; linearidade (LIN).

Após a análise de variância, os dados foram submetidos ao teste de Scott-Knott a um nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

A maior força centrífuga usada (1200rpm – 217g) aumentou significativamente ($p < 0,05$) as velocidades do percurso médio (VAP), curvilínea (VCL) e em linha reta (VSL), no T0h (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito das diferentes forças de centrifugas (C) aplicadas à palheta de sêmen de carneiros imediatamente após a descongelação (T0h) e incubação (T2h e T4h) sobre os parâmetros de cinética espermática (média \pm desvio padrão).

PARÂMETRO	TEMPO	NC	C800	C1000	C1200
MT (%)	0h	57,0 \pm 10,4	54,2 \pm 14,5	56,2 \pm 16,8	54,8 \pm 21,8
	2h	21,2 \pm 11,7	25,5 \pm 15,3	20,2 \pm 19,9	23,0 \pm 17,7
	4h	5,6 \pm 4,0	7,2 \pm 10,3	6,3 \pm 8,2	5,0 \pm 6,5
MP (%)	0h	26,4 \pm 5,3	20,4 \pm 9,1	25,5 \pm 8,7	27,3 \pm 12,3
	2h	6,4 \pm 4,8	6,7 \pm 7,1	4,8 \pm 6,1	5,7 \pm 5,6
	4h	0,5 \pm 0,7	0,6 \pm 1,3	0,4 \pm 0,9	0,3 \pm 0,7
VCL (μm/s)	0h	192,1 \pm 12,4b	180,4 \pm 27,2b	193,8 \pm 27,9b	209,9 \pm 27,1a
	2h	141,5 \pm 18,3	136,1 \pm 27,7	137,3 \pm 21,4	142,7 \pm 30,9
	4h	93,6 \pm 20,0	92,5 \pm 33,7	80,7 \pm 31,0	77,7 \pm 36,9
VSL (μm/s)	0h	97,6 \pm 11,6b	87,1 \pm 23,4b	97,6 \pm 18,8b	109,4 \pm 25,5a
	2h	55,8 \pm 13,4	52,5 \pm 20,5	50,7 \pm 13,7	54,8 \pm 20,3
	4h	22,7 \pm 10,1	19,6 \pm 16,0	15,9 \pm 13,1	18,6 \pm 17,7
VAP (μm/s)	0h	122,4 \pm 10,5b	112,8 \pm 22,1b	123,3 \pm 19,7b	135,4 \pm 21,9a
	2h	79,5 \pm 13,8	77,3 \pm 19,9	75,9 \pm 14,3	81,0 \pm 19,7
	4h	47,8 \pm 11,0	46,7 \pm 19,1	39,4 \pm 16,8	38,8 \pm 22,1
LIN (%)	0h	50,65 \pm 3,5	47,5 \pm 6,2	50,0 \pm 3,6	51,5 \pm 7,7
	2h	38,5 \pm 6,5	37,5 \pm 9,1	37,7 \pm 6,9	37,3 \pm 9,2
	4h	22,4 \pm 6,6	18,1 \pm 11,1	17,8 \pm 8,3	19,7 \pm 13,6
STR (%)	0h	79,4 \pm 3,3	76,3 \pm 6,3	78,8 \pm 3,5	79,7 \pm 8,7
	2h	68,3 \pm 7,6	65,9 \pm 11,6	66,1 \pm 9,2	65,6 \pm 13,8
	4h	42,9 \pm 11,0	35,4 \pm 19,6	35,9 \pm 15,2	38,1 \pm 22,7

NC - grupo controle não centrifugado; C800, 1000 e 1200 – grupos centrifugados a 800, 1000 e 1200 rpm (96, 150 e 217g respectivamente); MT- motilidade total; MP - motilidade progressiva, VCL - velocidade curvilínea; VSL - velocidade em linha reta; VAP - velocidade do percurso médio; LIN - linearidade; STR - retilinearidade. Teste de Scott-knott $p < 0,05$ para médias seguidas de letras diferentes na mesma linha.

Os dados obtidos no T0h corroboram com aqueles encontrados por Gil et al. (2000) que trabalhando com reconcentração espermática antes da congelação e do envase do sêmen de ovinos relataram maiores valores das velocidades em linha reta e do trajeto médio para os grupos centrifugados (700 g/10min) em relação aos não centrifugados: VSL = $121,0 \pm 4,3$ vs. $104,0 \pm 4,3$; VAP = $133,1 \pm 3,8$ vs. $120,3 \pm 3,8$ respectivamente. Espermatozoides equinos centrifugados produziram mais energia quando comparados aqueles não centrifugados e, este fato, foi supostamente atribuído à ressuspensão das amostras em meios que oferecem novos substratos após a centrifugação, ou à própria centrifugação, que pode ter promovido um aumento no número de receptores para glicose e do metabolismo celular (VASCONCELOS et al., 2010).

Além disso, a centrifugação pode ter livrado os espermatozoides de alguns componentes viscosos do meio diluidor usados na congelação, a exemplo do glicerol e o OEP, permitindo que os espermatozoides presentes apresentassem maior velocidade quando diluídos na solução avaliadora. O aumento da viscosidade do meio diluidor tem sido relatado como uma barreira física ao movimento espermático. Bandeira (2011) observou uma redução significativa ($p < 0,05$) dos parâmetros MP, VCL, VSL, VAP e ALH, em virtude da viscosidade do meio testado.

Conclusões

A centrifugação da palheta de sêmen congelado de carneiros após descongelação a uma força centrífuga de 1200 rpm (217 g) durante dez minutos promove um aumento na velocidade cinética e não afeta a proporção de células com motilidade total e progressiva, linearidade e retilinearidade dos espermatozoides, podendo ser utilizada como estratégia de reconcentração espermática para redução do volume da dose inseminante e de refluxo seminal nas inseminações cervicais.

Agradecimentos

À Fapitec pela concessão da bolsa e a TK Equipamentos para Reprodução.

Referências

AZEVEDO, H. C.; MACHADO, R.; SANTOS, D. O.; SIMPLICIO, A. A. **Refluxo da dose inseminante e sua influência sobre a fertilidade de cabras leiteiras inseminadas artificialmente**. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 21, p. 144-145, 1997.

BANDEIRA, A. M. P. **Utilização da gelatina na refrigeração e congelamento do sêmen ovino**. 2011. Dissertação (Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2 ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 54 p.

COLAS, G.; GUERIN, Y. A new method for thawing frozen semen. *Theriogenology*, v. 16, p. 623-630, 1981.

FREITAS, A. C. F. **Avaliação do sêmen de carneiros submetido à reconcentração por centrifugação da palheta pós-descongelamento**. 2014. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

GIL, J.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology*, v. 54, p. 93-108, 2000.

GONZALEZ, C. I. M. **Avaliação "in vitro" e "in vivo" de sêmen ovino (Ovis aries) congelado em palhetas e "pellets" com diferentes diluidores**. 1996. 135 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

RITAR, A. J.; BALL, P. D.; OIJ MAY, P J. Examination of methods for the deep freezing of goat semen. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 2, p. 27-34, 1993.

RODELLO, L.; BICUDO, S. D.; FALLEIROS, M. B.; MONTEIRO, C. D.; SAKASHITA, S. M. Implicações da redução na concentração de gema de ovo no Meio glicina-gema-leite sobre a cinética, morfologia e Integridade de membranas espermáticas em sêmen ovino Criopreservado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 18, p. 239-248, 2011.

JONDET, R. Tecnologia do sêmen II. In: MIES FILHO, A. **Inseminação Artificial**. 6 ed. Porto Alegre: Ed. Sulina, 1987. p. 524 534-568. v. 2.

VASCONCELOS, A.B.; SANTANA, M.A.; SANTOS, A.M.C.; SANTORO, M.M.; LAGARES, M. A. Metabolic evaluation of cooled equine spermatozoa. **Andrologia**, v. 42, p. 106-111, 2010.

KERSHAW, C.M.; KHALID, M.; MCGOWAN, M. R.; INGRAM, K.; LEETHONGDEE, S.; WAX, G.; SCARAMUZZI, R. J. The anatomy of the sheep cervix and this influence of the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. **Theriogenology**, v. 64, p. 1225-1235, 2005.