

Scientific Electronic Archives

Issue ID: Sci. Elec. Arch. Vol. 11 (6)

December 2018

Article link

<http://www.seasinop.com.br/revista/index.php?journal=SEA&page=article&op=view&path%5B%5D=678&path%5B%5D=pdf>

Included in DOAJ, AGRIS, Latindex, Journal TOCs, CORE, Discoursio Open Science, Science Gate, GFAR, CIARDRING, Academic Journals Database and NTHRYS Technologies, Portal de Periódicos CAPES.



Resfriamento pré-congelação e viabilidade seminal de carneiros

Pre-freezing cooling and sheep seminal viability

A. C. Martinez¹; A. Pinto Neto²; C. M. Pereira Júnior¹; A. R. G. Almeida¹; R. N. Ribeiro¹; B. G. Becker²; W. Oliveira²

¹ Universidade Estadual de Maringá - Campus Umuarama

² Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Realeza.

Author for correspondence: adalgiza.neto@uffs.edu.br

Resumo. Avaliou-se em pool de sêmen ovino, diferentes tempos de resfriamento (R) pré-congelação sobre a motilidade (M) e o vigor (V) espermático após descongelação e TTR (Teste de Termo Resistência). Quatro carneiros Santa Inês foram submetidos a coletas de sêmen, em nove repetições. Após análise e confirmação das características seminais desejáveis de cada ejaculado, realizou-se um pool dos ejaculados dos quatro animais, diluído em Tris-gema modificado, aliqüotado em palhetas resfriadas por zero, uma, duas, três, quatro e cinco horas pré-congelação, congeladas e descongeladas. Avaliou-se a M e o V espermático, antes e após o R, e após a descongelação, quando também se realizou o TTR. Os dados foram comparados pelo Teste de Tukey. Houve diminuição da M e do V do pool seminal após uma a cinco horas de R antes da congelação, sendo que o tempo de R não alterou esses parâmetros. O pool espermático descongelado apresentou M e V superior após quatro horas de R, quando comparado a uma hora de R antes da congelação. No entanto, não se observou diferença nesses parâmetros ao ser submetido a uma, duas, três ou cinco horas de R antes da congelação. M e V semelhantes foram observados no pool seminal resfriado por duas a cinco horas antes da congelação. O sêmen descongelado, submetido ao TTR, apresentou M e V semelhante, independentemente do tempo de R antes da congelação. Concluiu-se que o R por quatro horas pré-congelação fornece melhor M e V pós descongelação, enquanto o R por duas a cinco horas gera padrão seminal aceitável pelo TTR.

Palavras chave: Congelação, ovino, resfriamento, sêmen, TTR.

Abstract. It was evaluated in ovine semen pool, different cooling times (C) pre-freezing on the motility (M) and the sperm vigor (V) after thawing and TRT (Thermo Resistance Test). Four Santa Inês sheep were submitted to semen collections in nine replicates. After analysis and confirmation of the desirable semen characteristics of each ejaculate, a pool of the ejaculates of the four animals, diluted in modified Tris-yolk, was aliquoted into vials cooled for zero, one, two, three, four and five hours pre-freezing, frozen and thawed. M and V spermatozoa were evaluated, before and after C, and after thawing, when TRT was also performed. The data were compared by Tukey's test. There was a decrease in the M and V of the seminal pool after one to five hours of C before freezing, and the C time did not change these parameters. The thawed sperm pool showed higher M and V after four hours of C when compared to one hour of C before freezing. However, no difference was observed in these parameters when subjected to one, two, three or five hours of C before freezing. M and V were observed in the seminal pool cooled for two to five hours before freezing. The thawed semen, submitted to TRT, presented similar M and V, regardless of the C time before freezing. It was concluded that C for four hours pre-freezing provides better M and V post-thawing, while C for two to five hours generates seminal pattern acceptable by TRT.

Keywords: Cooling, freezing, ovine, sêmen, TRT.

Introdução

A inseminação artificial (IA) em ovinos tem contribuído para o desenvolvimento genético dessa espécie (Palacín et al 2012), em paralelo ao desenvolvimento das técnicas de criopreservação do sêmen (Bittencourt et al 2013).

Em ovinos a limitação no uso da IA deve-se não somente aos resultados de fertilidade, normalmente irregulares e baixos, como também a dificuldade de melhorias nos protocolos de criopreservação (Palacín et al 2012).

Apesar da aceitável taxa de gestação após IA com sêmen ovino fresco, a curta sobrevivência dos

espermatozoides, associada ao limitado número de doses de sêmen obtido de um ovino num determinado período de tempo, restringe o uso de um determinado reprodutor (O'Hara et al 2010), levando ao desenvolvimento de estudos que visem prolongar a capacidade fertilizante desses gametas, como a criopreservação. A utilização do sêmen ovino congelado apresenta como principal vantagem, a possibilidade de grande distanciamento entre o momento da colheita e o da IA (Bittencourt et al 2013).

Além disso, a criopreservação proporciona a estocagem do sêmen de animais de alto valor por tempo indeterminado, maximizando o aproveitamento do macho como reprodutor, além de possibilitar seu uso mesmo após sua morte, reduz os custos com criação de reprodutores, tendo em vista que se pode adquirir sêmen congelado com qualidade comprovada (Castelo 2008).

Apesar dos expressivos investimentos, a solução ideal para o uso do sêmen ovino congelado ainda não foi obtida (Bittencourt et al 2013). Os baixos índices de fertilidade das fêmeas inseminadas com sêmen congelado podem ser melhorados com avanços e melhorias a serem implementados nos protocolos de preservação seminal (Cseh et al 2012).

É possível observar que os espermatozoides ovinos submetidos a procedimentos de resfriamento e congelação apresentam alterações funcionais capazes de comprometer a fertilidade após a IA, dificultando a plena difusão dessa técnica nesses animais (Bittencourt et al 2013). Associa-se a esse fator a reduzida longevidade do sêmen de carneiro após o resfriamento, uma vez que os espermatozoides ovinos são células muito sensíveis ao choque do resfriamento e a congelação (Palacín et al 2012).

No entanto, índices viáveis do sêmen ovino pós descongelação podem ser obtidos levando-se em consideração as características seminais dessa espécie, atentando-se para uma variabilidade de fatores, como a taxa de resfriamento e os protocolos de congelação e descongelação (Bittencourt et al 2013).

O grau de severidade do choque térmico causado pelo resfriamento depende da quantidade de colesterol na membrana da célula espermática. Espermatozoides mais susceptíveis ao choque térmico, como em ovinos, possui maior taxa de ácidos graxos insaturados. No entanto, o choque térmico pode ser prevenido com o controle da taxa e tempo de resfriamento do sêmen (Madeira et al, 2015).

Diante do exposto, objetiva-se com esse estudo avaliar em um pool de sêmen ovino, os efeitos do tempo de resfriamento pré-congelação sobre a motilidade e o vigor espermático após descongelação e TTR.

Métodos

Esse estudo foi desenvolvido no Laboratório de Criação e Reprodução Animal, da Universidade Estadual de Maringá, no Município de Umuarama-PR, localizado a 23° 79' 72"S, 53° 25' 28" W e 380 metros de altitude, com clima subtropical úmido, média anual de 20,7°C de temperatura e 1512mm de pluviosidade.

Para tanto, quatro carneiros da Raça Santa Inês foram submetidos a coletas de sêmen, em nove repetições. Após análise e confirmação das características seminais desejáveis de cada ejaculado (CBRA 2013), realizou-se um pool dos ejaculados dos quatro animais, que foi diluído em meio Tris-gema modificado (3,63g de Tris, 1,99 g de ácido cítrico monohidratado, 0,5g de glicose, 5 mL de glicerol e qsp 100 mL de água ultrapura), em pH 7,2.

Após a diluição, cada pool seminal foi dividido em alíquotas, acondicionadas em palhetas de sêmen (0,5mL) contendo 30 milhões de espermatozoides.

As alíquotas de sêmen foram resfriadas a 5°C em vapor de nitrogênio líquido. O tempo de resfriamento variou entre os tratamentos, sendo os tratamentos com zero (sêmen fresco), uma, duas, três, quatro e cinco horas de resfriamento pré-congelação. Em cada grupo, avaliou-se a motilidade e o vigor das células espermáticas, quando então houve a congelação.

Imediatamente após o período de resfriamento de cada grupo as palhetas foram colocadas a uma temperatura de -120°C, sendo mantidas a 4cm da superfície do nitrogênio líquido, por 10 minutos, e posteriormente submergidas no nitrogênio líquido a -196°C, onde permaneceram até a descongelação.

Para a descongelação, as palhetas foram inseridas em água a 36°C, por 30 segundos, retiradas, secadas e, uma amostra do sêmen colocado em lâmina e lamínula para avaliação da motilidade e do vigor, antes e após o Teste de Termo Resistência (TTR).

Os dados obtidos foram submetidos a Análise de Variância, sendo as médias testadas pelo Teste de Tukey, utilizando-se o pacote estatístico SAS, considerando 5% de significância.

Resultados e Discussão

Observou-se que houve diminuição da motilidade e do vigor do pool seminal após uma a cinco horas de resfriamento antes da congelação ($p < 0,05$ – Tabela 1), sendo que o tempo de resfriamento não alterou esses parâmetros ($p > 0,05$ – Tabela 1).

A temperatura do sêmen no momento da ejaculação é de aproximadamente 37,5°C, e a exposição do mesmo a temperaturas superiores aumenta o ritmo metabólico e esgota suas reservas energéticas, ocorrendo decréscimo da viabilidade média do espermatozóide (Aisen 2008). Por outro lado, a diminuição da temperatura contribui para a redução do metabolismo espermático (Barros &

Tonioli 2011). Quando os espermatozoides são armazenados a 5°C, as necessidades metabólicas decrescem 90% quando comparadas à temperatura de 37°C. Em consequência, a produção de catabólitos é menor e o desgaste da célula não ocorre de forma tão rápida (Dias et al 2015). Esses

parâmetros justificaram o resfriamento pré congelação do pool seminal utilizado nesse estudo. Além dos diluidores atuarem como agentes que estabilizam membranas celulares pela proteção pelo choque térmico (Carvalho et al 2008).

Tabela 01. Motilidade e vigor (média \pm desvio padrão) de um pool seminal de carneiros Santa Inês após diferentes tempos de resfriamento de Umuarama, Paraná.

Tratamento	Tempo de resfriamento pré congelação (horas)	Parâmetros Avaliados	
		Motilidade (%)	Vigor
Controle	0	78,9 \pm 8,75 ^a	4,0 \pm 0,47 ^a
1	1	47,8 \pm 10,3 ^b	3,0 \pm 0,0 ^b
2	2	45,6 \pm 8,3 ^b	2,67 \pm 0,47 ^b
3	3	45,6 \pm 14,2 ^b	2,78 \pm 0,42 ^b
4	4	53,3 \pm 9,4 ^b	3,11 \pm 0,31 ^b
5	5	45,6 \pm 13,4 ^b	2,78 \pm 0,63 ^b

^{a,b} Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna, diferem ($p < 0,05$)

O sêmen resfriado a 5 e 4°C mantém sua viabilidade máxima de 18-24 horas (Aisen 2008) e até 48 horas (Nunes et al 1997) após a colheita, respectivamente. Dessa forma, o resfriamento de até cinco horas, como proposto nesse estudo não interferiu na viabilidade seminal (CBRA 2013), avaliada pela motilidade e o vigor, embora tenha diminuído seus valores após uma hora de resfriamento quando comparado ao sêmen fresco (Tabela 01).

O plasma seminal da espécie ovina não possui capacidade antioxidante adequada, além do que a criopreservação diminui as defesas antioxidantes do sêmen, que levam à peroxidação lipídica das membranas dos espermatozoides, resultando numa perda de motilidade, viabilidade e fertilidade dos mesmos (Bucak et al 2007; Guerrero et al 2009). Nesse estudo, é coerente supor, que o resfriamento possa ter comprometido a capacidade antioxidante do sêmen, denotada pela diminuição da motilidade e vigor após uma hora de resfriamento, entretanto este processo não foi mensurado.

O pool espermático descongelado apresentou motilidade e vigor superior após quatro horas de resfriamento, quando comparado a uma hora de resfriamento antes da congelação ($p < 0,05$ – Tabela 2). No entanto, não se observou diferença nesses parâmetros ao ser submetido a uma, duas, três ou cinco horas de resfriamento antes da congelação ($p > 0,05$ – Tabela 2). Motilidade e vigor

semelhantes foram observados no pool seminal resfriado por duas a cinco horas antes da congelação ($p > 0,05$ – Tabela 2).

A criopreservação é capaz de alterar a capacidade fertilizante dos espermatozoides (Sánchez-Partida et al 1999), através de alterações ultra-estruturais, bioquímicas e funcionais que ocorrem nas células espermáticas durante o processo, o que conduz à queda na motilidade e perda da sua viabilidade dentro do trato genital (Leahy & Gadella 2011). Nesse estudo, observou-se que após a congelação-descongelação houve diminuição da motilidade e vigor espermático independente do tempo de resfriamento pré-congelação. No entanto, os danos específicos nas células espermáticas não foram avaliados. A motilidade espermática progressiva e retilínea é especialmente importante em ovinos, devido às particularidades anatômicas da cérvix da fêmea (Evans & Maxwell 1990).

Watson (2000) relatou que 40-60% dos espermatozoides de carneiro preservam sua motilidade após a criopreservação e que, apenas 20-30% se mantêm biologicamente não danificados. A motilidade seminal após congelação-descongelação observada nesse estudo, independentemente do tempo de resfriamento, encontra-se próxima daquela descrita por este autor.

Tabela 02. Motilidade e vigor de um pool seminal de carneiros Santa Inês após descongelação e diferentes tempos de resfriamento pré-congelação de Umuarama, Paraná

Tratamento	Tempo de resfriamento pré congelação (horas)	Parâmetros Avaliados	
		Motilidade (%)	Vigor
1	1	30.00 \pm 11.06 ^b	2.33 \pm 0.38 ^b
2	2	36.67 \pm 12.37 ^{ab}	2.67 \pm 0.43 ^{ab}
3	3	35.56 \pm 8.09 ^{ab}	2.78 \pm 0.37 ^{ab}
4	4	43.33 \pm 10.13 ^a	3.00 \pm 0.44 ^a
5	5	40.00 \pm 10.28 ^{ab}	2.67 \pm 0.42 ^{ab}

^{a,b} Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna, diferem ($p < 0,05$)

Tonieto (2008) classificou reprodutores em alta (80%), média (70%) e baixa (53%) motilidade espermática pós-descongelação. Considerando essa descrição, a motilidade do pool seminal avaliado após descongelação, nesse estudo, denotaria reprodutores de baixa motilidade espermática.

O sêmen descongelado, submetido ao TTR, apresentou motilidade e vigor semelhante ($p>0,05$), independentemente do tempo de resfriamento antes da congelação (Tabela 3).

O TTR é um teste de exaustão para a capacidade de sobrevivência dos espermatozoides

a uma temperatura similar à do trato reprodutivo da fêmea (37-38°C). A avaliação do sêmen à temperatura corporal após o processo de criopreservação é muito importante, uma vez que a viabilidade espermática deve ser mantida após este processo (Lima et al 2010), sendo considerado viável o sêmen com motilidade igual ou superior a 15% (CBRA 2013). Nesse contexto, o pool seminal estudado, após resfriado e congelado-descongelado mostrou-se viável após o TTR, segundo o CBRA (2013), para tempo de resfriamento pré congelação de duas a cinco horas.

Tabela 03. Motilidade e vigor de um pool seminal de carneiros Santa Inês após Teste de Termorresistência Rápido (TTR), submetido a diferentes tempos de resfriamento pré-congelação e descongelação, Umuarama, Paraná

Tratamento	Tempo de resfriamento pré congelação (horas)	Parâmetros Avaliados	
		Motilidade (%)	Vigor
0	0	-	-
1	1	14,4 ± 11,7 ^a	1,78 ± 1,03 ^a
2	2	16,7 ± 9,43 ^a	2,22 ± 0,92 ^a
3	3	23,3 ± 9,43 ^a	2,33 ± 0,47 ^a
4	4	26,7 ± 8,16 ^a	2,78 ± 0,42 ^a
5	5	27,8 ± 7,86 ^a	2,56 ± 0,50 ^a

^aMédias seguidas por letras diferentes na mesma coluna, diferem ($p<0,05$)

Conclusão

Conclui-se que, nas condições desse estudo, o tempo de resfriamento de quatro horas pré-congelação fornece melhor índice de motilidade e vigor pós descongelação, e o resfriamento, por duas a cinco horas, gera padrão seminal aceitável pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal ao se considerar o TTR.

Referências

AISEN, E.G. Reprodução ovina e caprina. 1.ed. São Paulo: MedVet, v.1. 203p. 2008.

BARROS, T.B.; TONIOLLI, R. Uso potencial da água de coco na tecnologia de sêmen. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.35(4), p.400-407, 2011.

BITTENCOURT, R.F.; OBA, E.; RIBEIRO FILHO, A.L.; CHALHOUB, M.; AZEVEDO, H.C.; BICUDO, S.D. Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: diluidores e crioprotetores. Ciência Animal Brasileira, v.14(4), p.522-536, 2013.

BITTENCOURT, R.F.; OBA, E.; RIBEIRO-FILHO, A.L.; CHALHOUB, M.; AZEVEDO, H.C.; BICUDO, S.D. Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: diluidores e crioprotetores. Ciência Animal Brasileira, v.14(4), p.522-536, 2013.

BUCAK, M.N.; ATEŞŞAHIN, A.; VARIŞLI, O.; YÜCE, A.; TEKIN, N.; AKÇAY, A. The influence of trealose, taurine cysteamine and hyaluronidase on ram semen parameters after freeze-thawing process. Theriogenology, v.67, p.1060-1067, 2007.

CARVALHO, F.P.; SILVA, J.F.S.; SOUZA, G.V.; QUIRINO, C.R.; CARVALHO, C. S.P. Diferentes diluentes sobre a motilidade e integridade de membrana plasmática após o congelamento e descongelamento de sêmen ovino. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, v.9(3), p.612-620, 2008.

CASTELO, T.S. Considerations on goat sêmen cryopreservation. Acta Veterinaria Brasilica, v.2(3), p.67-75, 2008.

CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal 2013 Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte, Brasil. 104 p.

CSHE, S.; FAIGL, V.; AMIRIDIS, G.S. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. Animal Reproduction Science, v.130, p.187-192, 2012.

DIAS, J.C.O.; SANTOS, M.C.R.; PENITENTE FILHO, J.M.; OLIVEIRA, G.D.; MENDES, V.R.A.; MANCIO, A.B. Características do sêmen caprino descongelado após a adição de ringer lactato, citrato de sódio e solução tris. Ciência Animal Brasileira, v.16(2), 2015. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/24240/18498>

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Inseminación Artificial de Ovejas y Cabras. 4. Ed. Zaragoza: Editorial ACRIBIA. P.143-165. 1990.

GUERRERO, V.H.; HUANCA, W.L.; RAYMUNDO, F.T.; HUERTA, S.O.; RAMOS, D. Uso de dilutores hipertônicos en la criopreservación de semen ovino hypertonic extenders in the cryopreservation of ovine sêmen. *Revista Investigaciones Veterinarias el Perú*, v.20(1), p.41-46, 2009.

LEAHY, T.; GADELLA, B.M. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction*, v,142, p.759–778, 2011.

LIMA, L.F.; MOURA, P.; PASSOS, P.I.B.; LEAL, D.R.; RUMPF, R.; NEVES, J.P. Influência de Sistemas de Refrigeração sobre a qualidade do sêmen ovino criopreservado em palhetas. *Ciência Animal Brasileira*, v.11(14), p.835-844, 2010.

MADEIRA, E.M.; BIANCHI, I.; VIEIRA, M.B.; SCHNEIDER, A.; SEVERO, N.C.; PFEIFER, L.F.M.; CORRÊA, M.N. Avaliação de diferentes crioprotetores intra e extracelulares na criopreservação de sêmen de touros. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.65(2), p.415-420, 2013.

NUNES, J.F.; CIRÍACO, A.L.T.; SUASSUNA, U. *Produção e reprodução de caprinos e ovinos*, 2ª ed., Fortaleza: Gráfica LCR, 199p. 1997.

O'HARA, L.; HANRAHAN, J.P.; RICHARDSON, L.; DONOVAN, A.; FAIR, S.; EVANS, A.C.O.; LONERGAN, P. Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology*, v.73, p.541-549, 2010.

PALACÍN, I.; YÁNIZ, J.L.; FANTOVA, E.; BLASCO, M.E.; QUINTÍN-CASORRÁN, F.J.; SEVILLA-MUR, E.; SANTOLARIA, P. Factors affecting fertility after cervical insemination with cooled sêmen in meatsheep. *Animal Reproduction Science*, v.132, p.139-144, 2012.

SÁNCHEZ-PARTIDA, L.G.; WINDSOR, D.P.; EPPLESTON, J.; SETCHELL, B.P.; MAXWELL, W.M.C. Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewe safter cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen thawed ram semen. *Journal of Andrology*, v.20(2), p.280-288, 1999.

TONIETO, R.A. *Uso de diferentes crioprotetores em diluentes para sêmen ovino congelado*. 2008. 53p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v.60, p.481-492, 2000.