

Resposta do sêmen de jumentos em diferentes fases do processo de criopreservação ao teste hiposmótico

CANISSO, I.F.¹; SOUZA, F.A.²; KER, P.G.¹; *RODRIGUES, A.L.³; SILVA, E.C.³;
CARVALHO, G.R.¹; CARDOSO, R.L.⁴

Introdução

A integridade funcional da membrana plasmática da célula espermática é de relevância para que haja o desencadeamento dos mecanismos fisiológicos envolvidos na fecundação (capacitação, reação acrossômica, fusão do espermatozóide com ovócito) (MAFFILI et al., 2003; SIQUEIRA et al, 2007), e para a manutenção e sobrevivência espermática no genital feminino (SQUIRES et al, 1999). Na tentativa de avaliar a funcionalidade de membrana plasmática de células espermáticas JEYENDRAN et al, (1984) propuseram o uso do teste de estresse hiposmótico (HOST) para avaliação da integridade funcional da membrana.

O HOST tem sido usado com sucesso na avaliação do sêmen de garanhão (FÜRST et al., 2005; MELO et al, 2005), bode (FONSECA et al, 2005) touros (ROTA et al, 2000) e jumentos (TRIMECHE et al, 1996). É considerado um método simples e acessível que pode ser utilizado em adição as avaliações rotineiras do sêmen, sendo baseado na ocorrência da passagem e transporte, semi-seletivo, de substâncias através da membrana, onde o mesmo ocorre com a passagem de água até que haja equilíbrio no gradiente de pressão osmótico (DAVIES-MOREL, 1999; MELO e HENRY, 1999).

Se uma célula espermática é colocada em uma solução hiposmótica menor que 290 mosm, ocorrerá a passagem de fluido do meio externo para o meio intracelular até que sejam igualadas as osmolaridades, o que resulta em ingurgitamento da cabeça e, principalmente, na região das fibras na cauda resultando em dobramento da mesma em espermatozóides com membrana intacta. Assim, este dobramento pode ser facilmente visualizado ao microscópio, onde quanto maior o numero de espermatozóides reagidos, melhor e mais funcionalmente estarão às membranas (DAVIES-MOREL, 1999; SIQUEIRA et al, 2007).

Os estudos com HOST em diversas espécies de animais domésticos têm apresentado resultados contraditórios em testes de correlação com fertilidade. SIQUEIRA et al. (2007) encontraram correlação média baixa ($r^2=0,23$) para sêmen de touros congelado/descongelado; enquanto REVELL & MRODE (1994) encontraram correlação de 0,79 entre HOST e a taxa de gestação em bovinos; NIE et al, (2002) encontraram correlação de 0,33 entre o HOST e os resultados de fertilidade de campo para sêmen de garanhão.

Na literatura poucos trabalhos com HOST tiveram seu foco em sêmen de jumentos (TRIMECHE et al., 1998; SERRES et al., 2002; ALVAREZ et al., 2006), utilizando mais o cavalo o qual demonstrou que o referido teste pode ser empregado como método auxiliar para avaliação seminal.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a variação da resposta ao teste hiposmótico em diferentes momentos do processo de criopreservação do sêmen de jumentos.

Material e Métodos

O experimento foi realizado em um haras comercial de produção de muares e asininos em Guaraciaba, Zona da Mata do Estado de Minas Gerais.

¹ Setor de Equiideocultura, Departamento de Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – Minas Gerais

² Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – Minas Gerais

³ Departamento de Veterinária – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – Minas Gerais.

⁴ Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul.

Utilizaram-se cinco jumentos (J1, J3, J4, J5 e J6) para a coleta de sêmen. Após feitas às avaliações e separação da fração gelatinosa, o sêmen foi diluído, na proporção de igual volume, de uma parte de sêmen para uma parte do meio diluidor de mínima contaminação (KENNEY et al., 1975).

O sêmen foi distribuído em tubos falcon graduados com capacidade de 15 mL, centrifugado por 15 minutos a 600g na centrífuga FANEN Baby II[®]. Após a centrifugação o sobrenadante foi removido com auxílio de uma palheta francesa de 0.5 mL, acoplada a uma seringa de 20 mL. Após a retirada do sobrenadante, o pellet formado foi cuidadosamente ressuspensionado em dois diluidores de congelamento de sêmen: 1) Diluidor de MARTIM et al. (1979) e 2) Diluidor de NAGASE & NIWA, (1964), modificado com adição de orvus-es-paste (OEP) (lauril sulfato de sódio) na proporção de 0,08 mL, para cada 20 mL de gema de ovo. Teve-se o cuidado de utilizar tubos que haviam sido pares na centrifugação, para a divisão igualitária entre os dois diluentes.

O sêmen foi ressuspensionado gentilmente com auxílio de uma pipeta automática com capacidade de 1000 µL. O volume de diluidor acrescentado foi o suficiente para atingir uma concentração final de 200×10^6 espermatozóides/mL, determinado por avaliação da concentração espermática momentos após a ressuspensão.

Após a adequação da concentração espermática o sêmen foi envasado manualmente em palhetas do tipo francesas (Minitub[®] do Brasil Ltda.) de 0,55 mL de capacidade, e lacradas com álcool polivinílico, previamente identificadas para cada um dos diluidores e cada um dos cinco jumentos (J1, J3, J4, J5, J6).

Em seguida, as palhetas foram depositadas em um dispositivo especial para resfriamento de sêmen eqüino descrito por FÜRST et al.(2005). O sêmen foi mantido dentro da geladeira neste dispositivo por 35 minutos, então o tubo de ensaio foi sacado do recipiente e em seguida permaneceu por mais 25 minutos, considerado este como tempo de estabilização, e então foi submetido ao congelamento.

Imediatamente antes do congelamento, uma palheta de cada diluidor foi retirada para realização do teste hiposmótico. Antes da realização destas avaliações as palhetas foram mantidas por pelo menos 5 minutos em banho-maria a 37 °C.

Para o teste HOST, utilizou-se uma gota de 10µL de sêmen em 1 mL solução de sacarose 100 mosml, incubados por 60 minutos em banho-maria a 37°C e fixado com 0,5 mL de solução de formol salino de HANCOCK (1957) para posterior avaliação, baseado nas metodologias de MELO e HENRY (1999) e FÜRST et al. (2005).

Na interpretação dos resultados utilizou-se o diagrama utilizado para sêmen caprino extraído de FONSECA et al. (2005). Previamente, procedeu-se homogeneização dos tubos fixados e uma gota da solução fixada foi colocada entre lâmina e lamínula, para a contagem de 100 células de cada ejaculado e de cada fase de processamento do sêmen. Para isso utilizou-se microscopia convencional em aumento de 400x. O cálculo da reação de HOST foi feito por intermédio da seguinte fórmula: $HOST = (\% \text{ Caudas dobradas pós teste}) - (\% \text{ Caudas dobradas antes do Teste})$.

O congelamento foi feito pela técnica manual em caixa isotérmica de isopor com capacidade para 45 litros com dimensões de 50 x 80 x 50 cm (altura, comprimento e largura), com nível mínimo de nitrogênio líquido de 4 cm e grade flutuante, com bases de isopor, a 3 cm do nível de nitrogênio. A caixa térmica de isopor foi mantida em congelador doméstico (300 Litros) para se evitar variações no congelamento de acordo com a temperatura ambiente. O descongelamento foi realizado a 37°C por 30 segundos. Para avaliação dos dados se fez uso do programa de Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG, versão 9.1, UFV, 2007).

Resultados e Discussão

Os resultados registrados para o teste de estresse hiposmótico (HOST) foi de $51,16 \pm 6,89\%$; $45,16 \pm 5,95\%$; $44,69 \pm 5,1\%$; $44,62 \pm 5,11\%$; $42,56 \pm 5,04\%$ para sêmen fresco, sêmen resfriado/estabilizado (Nagase-modificado e Martim; na ordem) e sêmen congelado/descongelado (Nagase-modificado e Martim; na ordem), respectivamente (Tab. 01). Não foram registradas diferenças ao HOST entre sêmen fresco e resfriado/estabilizado para os dois meios ($P > 0,05$), e nem entre os dois diluidores para o estágio do sêmen resfriado/estabilizado ($P > 0,05$). O sêmen resfriado/estabilizado no diluidor de Martim, não foi diferente do sêmen congelado/descongelado no diluidor de Nagase modificado ($P > 0,05$), assim como não foi diferente a resposta ao HOST entre os meios diluidores para o sêmen congelado/descongelado ($P > 0,05$).

Tab. 01 - Resultados para o teste de estresse hiposmótico para sêmen fresco, sêmen resfriado/estabilizado e sêmen congelado/descongelado

Fase de processamento	HOST (%)*
Semen Fresco	$51,16 \pm 6,89A$
Sêmen Resfriado Nagase	$45,16 \pm 5,95A$
Sêmen Resfriado Martim	$44,69 \pm 5,14AB$
Sêmen Congelado Nagase	$42,62 \pm 5,11BC$
Sêmen Congelado Martim	$42,56 \pm 5,04C$

* $P > 0,05$ com ANOVA e teste de TUKEY com probabilidade de erro de 5%. **Diferentes letras na mesma coluna indicam diferenças estatísticas pelo teste de Kruskal-Wallis ($P > 0,05$).

A variação da resposta percentual de células espermática reagidas ao HOST do sêmen fresco até sêmen congelado/descongelado foi muito baixa em torno de 11%, esta resposta foi provavelmente por consequência das diferentes sub-populações espermática presentes no ejaculado. O grau de resposta ao HOST se mantiveram constantes, provavelmente está seja a sub-população espermática com melhor taxa de sobrevivência ao congelamento/ descongelamento. De acordo com (CURRY, 2000) estão presentes no ejaculado diferentes sub-populações com características distintas de sobrevivência ao congelamento. MOORE et al, (2005) registrou a presença de 4 sub-populações em ejaculados de jumentos da raça Catalã, no sêmen fresco e resfriado, semelhante ao sêmen de garanhões. A importância do HOST foi demonstrada por VIDAMENT et al. (1998) e MELO e HENRY (1999), esses pesquisadores registraram alta correlação entre espermatozoides reagidos ao HOST com motilidade espermática para garanhões. No presente estudo, a correlação com HOST e motilidade progressiva para o sêmen congelado/descongelado foi média e positiva ($r = 0,53$ e $r = 0,51$ Martim e Nagase-modificado), não sendo registrada correlação ($r = 0,038$) entre o vigor espermático e fase do processamento do sêmen.

Para as demais características motilidade total e progressiva e o HOST registraram-se correlações negativas de médias a alta e conforme variou o processamento do sêmen fresco, resfriado/estabilizado e congelado/descongelado (r : $-0,87$; $-0,87$, $-0,55$, e $-0,43$ respectivamente). Ou seja, como era esperado à medida que se evolui na fase de processamento do sêmen de fresco/resfriado-estabilizado/congelado-descongelado, piores foram às respostas aos parâmetros como: diminuição da motilidade (total e progressiva) e menor percentual de células reativas ao HOST, indicando lesões a membrana espermática.

O parâmetro HOST apresentou baixa correlação ($r = -0,43$) com a fase de processamento do sêmen, provavelmente ocasionado pela menor variação observada no HOST, em média a variação das células reagidas variou em 8,6% do sêmen fresco até o sêmen congelado/descongelado, evidenciando que a população espermática que reagiu no sêmen fresco se manteve constante, viável até o descongelamento.

Em conclusão a resposta ao teste hiposmótico com a presente solução e metodologia, se manteve constante durante as diferentes fases de processamento do sêmen sugerindo que a população de células que reagiu no sêmen fresco sobrevivera ao congelamento.

Referencias

- ALVAREZ, A.L.; SERRES, C.; TORRES, P.; CRESPO, F.; MATEOS, E.; GÓMEZ-CUÉTARA, C. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryopreservation of donkey spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. v.95;p.89-91; 2006.
- ÁLVAREZ, A.L.; SERRES, C.; CRESPO; MATEOS, E.; GÓMEZ-CUÉTARA. CURRY, M.R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction*.v.5; p.46-52, 2000.
- DAVIES MOREL, MCG. *Equine Artificial Insemination*. Wallingford, Oxon: CAB International.1999, 406p.
- FONSECA, J.F.; TORRES, C.A.A.; MAFFILI, V.V.; BORGES, A.M.; SANTOS, A.D.F.; RODRIGUES, M.T.; OLIVEIRA, R.F.M. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. *Animal Reproduction*. V.2., n. 2., p.139-144, 2005.
- FÜRST, R.; CARVALHO, G.R.; FÜRST, M.C.O.; Efeito do resfriamento do sêmen sobre sua congelabilidade. *Arq. Bras. Vet. Zootec.*, v.57, n.5,p.599-607,2005.
- JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VER, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M. et al, Development of an assay to evaluate the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.70, p.219-228, 1984.
- KENNEY RM, BERGMAN RV, COOPER WL, MORSE GW. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. *Proceedings in Annual Convention, American Association Equine Practitioners*. 1975; 21:327-335.
- MAFFILI, V.V.; TORRES, C.A.A.; FONSECA, J.F.; PROSPERI, C.P.; SANTOS, A.D.F.; BORGES, A.M. Uso de diferentes tempos de incubação no teste hiposmótico em sêmen caprino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*,v.27, n.4, p.631-635,2003.
- MARTIM, JC, KLUG E, GUNZEL AR. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of Reproduction and Fertility*. Suppl.27. p 47-51, 1979.
- 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. Méd. Vet. Zootec.*, v.57,n.6,p.757-763,2005.
- MELO, M.I.V; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.51, p.71-78, 1999.
- MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 63, p. 2372-2381, 2005.
- NAGASE H, NIWA T. Deep freezing bull semen in concentrated pellet form. I Factors affecting survival of spermatozoa. In: *Proceedings 5th International Congress Animal Reproduction and Artificial Insemination*.v.4, p.410-415. 1964.
- NIE, G.J.; WENZEL, J.G.W. JOHNSON, K.E.; Comparison of pregnancy outcome in mares among methods used to evaluate and select spermatozoa for insemination. *Animal Reproduction Science*,.v.69, p.211-222, 2002.
- REVELL, S.G.; MRODE, R.A. Na osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*. v.69,p.77-86, 1994.
- ROTA, A.; MAGELLI, C.; PANZANI, D.; CAMILLO, F. Effect of extender, centrifugation and removal of seminal plasma on cooled-preserved Amiana donkey spermatozoa. *Theriogenology*, v.69, p.176-185, 2008.
- SERRES, C.; RODRIGUEZ, A.; ALVAREZ, A.L.; SANTIAGO, I. Effect of centrifugation and temperature on the motility and plasma membrane integrity of Zamorano-Leonés donkey semen. *Theriogenology*.v.58,p. 329-332, 2002.

SIQUEIRA, J.B.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P.; HENRY, M.; TORRES, C.A.A.; SILVA, M.V.G.B.; SILVEIRA, T.S. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática in vitro. Rev. Bras. Zootec.,v.36,n.2, 2007.

SQUIRES EL, PICKETT BW, GRAHAM JK, VANDERWALL DK, MCCUE PM, BRUMMER JE. Cooled and frozen stallion semen, Fort Collins: Animal Reproduction Biotechnology Laboratory, Colorado State University, Bulletin (09) 1999.

TRIMECHE, A.; RENARD, P.; TAINURIER, D. A procedure for Poitou jackass sperm cryopreservation. Theriogenology, v.50, p.793-806, 1998.

TRIMECHE, A.; RENARD, P.; LELANNOU, D.; BARRIÈRE, P.; TAINURIER, D. Improvement of motility of post-thaw Poitou jackass sperm using glutamine. Theriogenology, v.45, n.5,p.1015-1027, 1996.

VIDAMENT, M.; COGNARD, E.; YVON, J-M.; SATTER, M.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Evaluation of stallion semen before and after freezing. Reproduction Domestic Animals.v.33, p.271-277,1998.