

PARÂMETROS CINÉTICOS DO SÊMEN OVINO CONGELADO EM DILUIDORES TRIS E ACP-102 AVALIADOS EM TESTE DE TERMO-RESISTÊNCIA: RESULTADOS PRELIMINARES.

CAVALCANTE, J. M. M.¹; MENEZES, E. S. B.^{1*}; BRASIL, O. O.¹; SOUZA, D. F. R.¹; NETO, E. T. A.¹; SILVA JÚNIOR, J.B.¹; C.S.B. SALMITO-VANDERLEY¹; SALGUEIRO, C. C. M.¹; NUNES, J. F.¹

Resumo

O teste de termo-resistência é útil na avaliação seminal por simular a capacidade do sêmen em sobreviver no trato reprodutivo da fêmea. O objetivo do presente estudo foi avaliar os parâmetros cinéticos do sêmen ovino diluído em TRIS ou ACP-102 durante teste de termo-resistencia. Sêmen de quatro carneiros da raça Santa inês foi coletado e diluído em TRIS ou ACP-102 e criopreservado. O sêmen foi avaliado para os parâmetros VCL, VAP, STR, LIN, ALH e BCF logo após descongelamento, 1h e 2h de incubação a 37°C usando sistema de análise seminal auxiliado por computador (CASA). Houve declínio nos parâmetros cinéticos seminais durante incubação. Nenhuma diferença foi verificada entre os diluidores TRIS e ACP-102 após descongelamento, mas sim após 2h de incubação. Estudos complementares são necessários para a obtenção de melhores taxas de recuperação de espermatozóides durante criopreservação utilizando o diluidor ACP-102.

Abstract

Thermal stress test is useful on the seminal evaluation by simulating the semen capacity to survive in the female reproductive tract. The objective of the present study was to evaluate kinetics parameters of ovine semen diluted in TRIS or PCW-102 extender into thermal stress test. Semen from four Santa Inês rams were collected and diluted in TRIS or PCW-102 extender and cryopreserved. The semen was evaluated for the parameters VCL, VAP, STR, LIN, ALH and BCF after thawing, 1h and 2h of incubation at 37°C using computer assisted sperm analysis (CASA). There was a decline on the kinetics parameters during incubation. None difference was observed between TRIS and ACP-102 after thawing, but after 2h of incubation. Complementary studies are necessary to obtain best sperm recuperation rates during cryopreservation using ACP-102 extender.

Palavras-chave ACP-102, TRIS, teste de termo-resistência, sêmen ovino, criopreservação

Introdução

Espermatozóides necessitam de algumas horas após a inseminação artificial para alcançar o sítio de fecundação, de modo que sua capacidade de fertilização está ligada à sua habilidade em sobreviver no trato genital da fêmea (Chemineau *et al.*, 1991). A manutenção da motilidade e viabilidade do

¹ Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino. Universidade Estadual do Ceará Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, CEP: 60.740-000, Fortaleza-CE

e-mail para correspondência: jmmcavalcante@bol.com.br

espermatozóide por intervalos prolongados após o descongelamento é avaliado pelo teste de termo-resistência, ao estimar a capacidade do espermatozóide em manter sua fertilidade durante trânsito no trato reprodutivo feminino (Bag *et al.*, 2004). O uso de sistemas de análise computadorizada de sêmen (CASA) permite uma avaliação objetiva, rápida e precisa de amostras de sêmen podendo ser utilizado em sua avaliação em testes de termo-resistência.

Diluidores à base do tampão TRIS tem sido tradicionalmente utilizados em centrais de inseminação e de pesquisa. Entretanto, o desenvolvimento de novos diluidores pode abrir perspectivas na melhoria da qualidade do sêmen criopreservado. O produto ACP-102, à base de água de coco em pó, permite não só seu uso como diluidor para sêmen, bem como permite novas oportunidades para o desenvolvimento de toda uma cadeia produtiva com base num produto regional, típico do Nordeste brasileiro.

Objetivo

Este trabalho teve como objetivo avaliar os parâmetros cinéticos do sêmen ovino congelado em diluidores TRIS e ACP-102 em teste de termo-resistência.

Materiais e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino da Universidade Estadual do Ceará, no município de Fortaleza, Ceará, com latitude 03°43' Sul e longitude 38°30' Oeste, com temperatura média anual de 27°C, durante os meses de Maio a Julho de 2008. Foram utilizados quatro carneiros da raça Santa Inês, mantidos em baias individuais, alimentados com feno de tifton (*Cynodon* sp.) e concentrado comercial com 18% PB, além de sal mineral e água à vontade. As coletas de sêmen foram feitas com uso de vagina artificial duas vezes por semana, totalizando sete coletas por animal. Após cada coleta, os ejaculados foram mantidos em banho-maria a 32°C para avaliação do volume, concentração, motilidade massal, percentual de espermatozóides móveis e vigor (Chemineau *et al.*, 1991). Posteriormente, os ejaculados foram divididos em duas alíquotas que foram diluídas em meios TRIS (Tris-frutose-gema de ovo a 20%), ou ACP-102 (com gema de ovo a 15%), sendo submetidos a resfriamento até 4°C por 120 minutos. Em seguida o sêmen foi submetido à glicerolização em três etapas com seus respectivos meios adicionados ao glicerol, de modo a obter concentração final de espermatozóides de 400×10^6 spz/mL. Os sêmen foi envasado em palhetas de 0,25mL e criopreservado em vapores de nitrogênio líquido (-100°C), por dez minutos, sendo então mergulhados em nitrogênio líquido e alocados em botijões criogênicos.

As palhetas foram descongeladas no mínimo de 15 dias após criopreservação, sendo imersas em banho-maria a 37°C por 30 segundos. O sêmen foi então transferido para microtubos de 1,5mL também incubados a 37°C. Uma alíquota de sêmen foi rediluída em solução citrato-glicose (Evens & Maxwell, 1992), de modo a obter uma concentração $30-50 \times 10^6$ spz/mL, para avaliação em sistema CASA (Sperm Class Analyser[®], Microptic S.L. versão 3.2.0). O teste de termo-resistência seguiu o procedimento preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), sendo as avaliações realizadas logo após o descongelamento (T0), 1h (T1) e 2h de incubação (T2).

Foram avaliados os parâmetros velocidade curvilínea (VCL - $\mu\text{m/s}$), velocidade média do percurso (VAP - $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN - %), retilinearidade (STR - %), deslocamento lateral de cabeça (ALH - μm) e frequência de batimento cruzado (BCF - Hz). Os resultados, expressos em média \pm desvio padrão, foram submetidos a análise de variância a 5%, seguido de teste de Tukey para determinar a significância entre duas médias.

Resultados

A figura 1(A-F) mostra os resultados obtidos. Foi observado que tanto o sêmen diluído em TRIS como em ACP-102 apresentaram valores semelhantes logo após o descongelamento para os parâmetros analisados. Estes valores sofreram influência com o tempo de incubação para ambos os diluidores (exceto para o parâmetro ALH do diluidor TRIS). Esta influência se manifestou pela queda dos valores médios em relação a T0 para VCL, VAP, STR e LIN e aumento para ALH e BCF. Isto pode ser explicado por danos sub-letais sofridos pelos espermatozoides durante processo de criopreservação, perda da atividade mitocondrial ou a efeitos decorrentes da liberação de radicais livres pela atividade metabólica dos espermatozoides ativos e da liberação de enzimas tóxicas após lise de células mortas (Bag *et al.*, 2004). Entretanto, tais resultados estão em desacordo com Bag *et al.* (2004) e Joshi *et al.* (2005), que não verificaram mudanças significativas para os mesmos parâmetros cinéticos estudados mesmo após 4h de incubação à 37°C. Vale ressaltar, entretanto, que os valores obtidos neste trabalho em ambos diluidores foram superiores aos encontrados por estes autores logo após o descongelamento.

Apesar de apresentarem valores semelhantes em T0, diferença significativa foi observada entre os diluidores para os parâmetros VCL, VAP, ALH e BCF após incubação de 2h, devido possivelmente ao fato do diluidor ACP-102 ter apresentado maior número de espermatozoides estáticos ao descongelamento em relação ao TRIS (percentual de espermatozoides móveis de 62,8% para TRIS e 40,3% para ACP-102), e por isso apresentando os efeitos deletérios por sobre os espermatozoides viáveis citados anteriormente.

Conclusões

O diluidor ACP-102 apresentou desempenho semelhante ao diluidor TRIS para os parâmetros de velocidade estudados ao descongelamento. Entretanto, as diferenças apresentadas entre ambos diluidores após período de incubação de duas horas sugere a necessidade de estudos complementares para obtenção de melhores taxas de recuperação de espermatozoides após criopreservação.

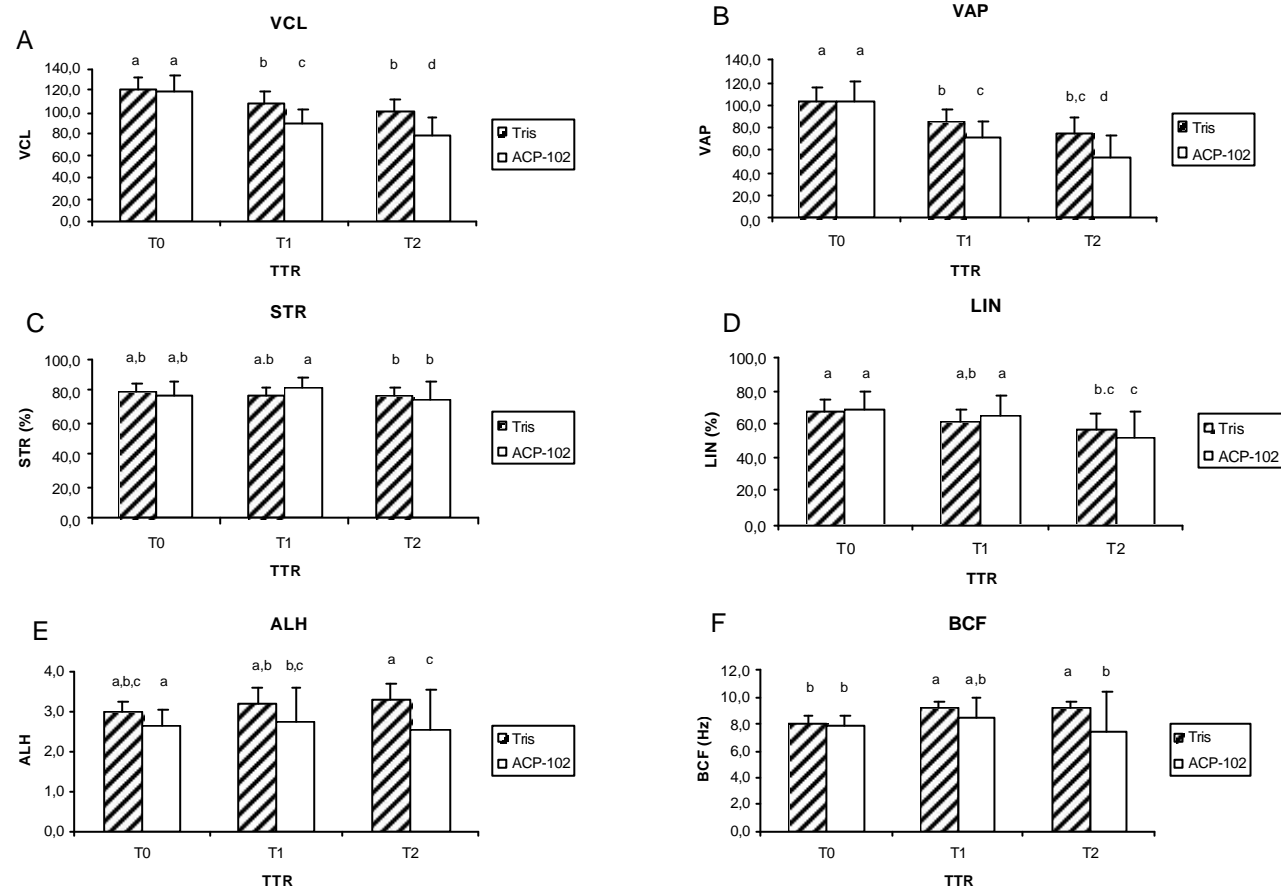


Figura 1 (A-F): Parâmetros cinéticos (VCL, VAP, STR, LIN, ALH e BCF), do sêmen ovino criopreservado em TRIS ou ACP-102 durante teste de termo-resistência, logo após o descongelamento (T0), uma hora (T1) e duas horas (T2) de incubação a 37°C.

Bibliografía

BAG, S., JOSHI, A., NAQVI, S.M.K., MITTAL, J.P. Effect of post-thaw incubation on sperm kinematics and acrosomal integrity of ram spermatozoa cryoperserved in medium-sized French straws. *Theriogenology* 62: 415-424, 2004.

CHEMINEAU, P., CAGNIE, Y., GUERIN, Y., *et al.* Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goats. FAO Reproduction and Health Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 222p. 1991.

EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Editora Acribia, S.A. Zaragoza, 1990, 192p.

JOSHI, A., BAG, S., NAQVI, S.M.K., SHARMA, R.C., MITTAL, J.P. Effect of post-thawing incubation on sperm motility and acrosomal integrity of cryopreserved Garole ram semen. *Small Ruminant Research*, 56:231-238, 2005.