

Tampão Biológico na Criopreservação do Sêmen Hircino

Rui Machado; Aurino A. Simplício

Introdução

A expansão da inseminação artificial na espécie caprina é dependente do incremento na eficiência da congelação do sêmen do bode. Em geral, o descarte de ejaculados atinge de 66,7% a 33,7% (Machado & Simplício 1992), onerando o custo final do sêmen congelado. A variação na congelabilidade do sêmen hircino é devida à presença de lecitinas e lisolecitinas, no plasma seminal do bode (Atreja & Anand 1985). Estas enzimas interagem com a plasmalema do espermatozóide e com os fosfolípidos dos meios diluidores, danificando a estrutura da membrana e alterando o meio onde os gametas estão emiscuidos. Deste modo, a remoção do plasma seminal, conhecida como lavagem, associada ao uso de diluidores pobres em fosfolípidos favorece recuperação espermática pós-congelação mais elevada e permite alcançar-se fertilidade mais alta após a inseminação artificial (Corteel 1977). Dentre os tampões biológicos, soluções à base de água extraída do coco (*Cocos nucifera*) vêm sendo usada na diluição de sêmen bovino (Chieffi & Masotti 1959, Norman et al. 1962) e caprino (Venkataswami 1961) para uso "à fresco ou resfriado". Aparentemente, a baixa concentração de fosfolípidos da água de coco permitiria o seu uso para a congelação do sêmen do bode, desde que ajustado o nível do crioprotetor para a congelação profunda sob vapores de nitrogênio líquido. O presente ensaio objetivou testar essa hipótese.

Material e Métodos

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia do Sêmen da EMBRAPA-CNPC e contou com 28 ejaculados coletados, por meio de vagina artificial, de três bodes de raças leiteiras. Após a coleta, os ejaculados eram avaliados quanto ao volume (ml), à concentração ($\times 10^6/\text{mm}^3$), à motilidade individual progressiva - MIP (%), e ao vigor (escala de 0 a 5) de acordo com Fonseca et al. (1992). De cada ejaculado, formaram-se duas alíquotas e o sêmen foi lavado ou com solução de Krebs Ringer Fosfato - KRF, ou com solução à base de água de coco - SAC (Tabela 1). A lavagem foi feita por centrifugação a 900 rpm, durante 15 minutos, onde a solução de lavagem foi adicionada na proporção (v:v) de 9:1 em relação ao sêmen. Depois da retirada do sobrenadante, foi procedida uma segunda lavagem, de forma idêntica à primeira. Após a retirada do sobrenadante o sêmen era dividido em cinco frações para a diluição na SAC sob diferentes níveis de crioproteção ($G_3=3\%$, $G_4=4\%$, $G_5=5\%$, $G_6=6\%$ e $G_7=7\%$ de glicerol). O volume total de diluente acrescido ao sêmen foi calculado com base no volume do ejaculado, na concentração espermática inicial e na MIP, de modo que ao envase as doses inseminantes de 0,5ml continham 200 milhões de espermatozoides (Fonseca et al. 1992). A quantidade total do diluidor adicionado foi dividida em duas partes de igual volume. Uma parte sem glicerol e a outra contendo glicerol, nas concentrações necessárias para obterem-se, como concentrações finais, aquelas supra-citadas (6% para G_3 ; 8% para G_4 e etc). Procedida a diluição inicial, a amostra era submetida ao resfriamento, em câmara fria, até atingir $+4^\circ\text{C}$. Neste momento, ocorria a adição da metade restante do diluidor, contendo glicerol, a qual foi feita em três etapas, intervaladas por dez minutos e possuindo igual volume. Após a adição da última porção, o sêmen foi envasado em palhetas francesas médias (0,5ml), contendo 200×10^6 espermatozoides por dose. A palheta era lacrada em álcool polivinílico sólido, colocada em rampa horizontal de congelação, distando cinco centímetros da coluna líquida do nitrogênio (N_2) líquido. A exposição aos vapores de N_2 prolongou-se por oito minutos. Neste momento as palhetas foram submersas no N_2 e as doses estocadas em botijão criobiológico à -196°C .

TABELA 1 - Soluções utilizadas.

Componente	KRF ¹	Componente	SAC ¹
Cloreto de Sódio à 0,89%	100,0	água de coco	50,0
Cloreto de Potássio à 1,15%	4,0	água bidestilada	25,0
Cloreto de Cálcio à 1,22%	3,0	Citrato de Sódio à 2,94%	25,0
Fosfato monobásico de Potássio à 2,11%	0,4		
Sulfato de Magnésio ($\times 7\text{H}_2\text{O}$) à 3,82%	1,0		
Tampão fosfato pH=7,40	12,0		
Glicose anidra à 5,34%	4,5		

¹ Em partes (volume) da solução.

As avaliações do sêmen à descongelação realizaram-se entre 57 e 74 dias pós-processamento. Os parâmetros de avaliação e as técnicas empregadas estão descritas em Fonseca et al. (1992). A descongelação foi realizada em banho-maria à $+37^\circ\text{C}$ por 30 segundos. A análise de variância foi o procedimento estatístico utilizado. Quando necessário, algumas variáveis foram submetidas à transformação matemática, objetivando normalizar a população dos dados (Steel & Torrie 1980).

Resultados e Discussão

A Tabela 2 mostra o efeito da lavagem com KRF e com SAC sobre a recuperação espermática pós-congelamento.

TABELA 2 - Efeito da Solução de lavagem sobre a recuperação espermática após descongelamento do sêmen caprino congelado em solução à base de água de coco.

	Solução de lavagem	
	KRF	SAC
MIP ¹ (%)	17,4 ± 3,70	9,5 ± 4,09
Vigor ² (escala 0 até 5)	1,27 ± 0,16	1,03 ± 0,18

¹ Valor transformado para arcsen;

² Valores transformados para a raiz quadrada da soma entre o vigor a constante 0,5.

Ambas soluções de lavagem foram ineficientes em obter valores médios desejáveis de recuperação espermática. Para Fonseca et al. (1992) a avaliação à descongelamento deve garantir 30% e 2,0 como valores mínimos para MIP e vigor, respectivamente. Este padrão é adotado pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento para fins periciais. Deste modo, em ambas situações, o processo tecnológico não forneceu doses viáveis para uso e comercialização. Salienta-se que Corteel (1977) e Machado & Simplicio (1992) usando KRF para a lavagem e uma solução de leite desnatado para a diluição obtiveram, respectivamente 51,7% e 33,3% de ejaculados aprovados para uso. Assim, aparentemente o uso do diluidor à base de água de coco limitou a sobrevivência e a capacidade metabólica e cinética dos espermatozoides. Não obstante, a SAC pode ser utilizada para a lavagem de ejaculados caprinos, desde que utilize-se outra solução como diluente. Ilustra esta assertiva, o fato de que a MIP e o vigor, imediatamente à lavagem, foram de 82,3% e 3,15, respectivamente. Em adição, a análise da morfologia espermática pós-lavagem, mostrada na Tabela 3, revelou que a magnitude de danos perpetrados pela SAC não diferiu daquela da KRF, estando ambas dentro de limites compatíveis com a fertilidade do sêmen caprino. Também ficou patente que, o grau de estresse osmótico não diferiu (P>0,05) entre as soluções empregadas para a lavagem.

TABELA 3 - Efeito da solução de lavagem sobre a morfologia espermática.

Defeitos (%) ¹	Pré-lavagem	Solução de lavagem	
		KRF	SAC ^b
maiores ²	3,33 ± 1,86	9,80 ± 5,45	10,2 ± 4,01 ^{ns}
menores ²	5,00 ± 2,16	8,70 ± 7,36	9,50 ± 5,01 ^{ns}
acrossomiais ³	0,97 ± 0,94	2,30 ± 1,24	1,40 ± 1,08 ^{**}
terciários ^{3,4}	2,62 ± 2,33	7,10 ± 5,71	7,40 ± 2,53 ^{ns}

¹ Valores transformados para arcsen;

² Classificação de Bloom, descrita em Fonseca et al. (1992);

³ Classificação de Mies Filho (1987), descrita em Fonseca et al. (1992)

⁴ Referentes a danos causados por choque térmico ou osmótico;

⁵ ns= não significativo e ** = significativo com P<0,01.

A ação das diferentes concentrações de glicerol mostrou-se similar para os tratamentos G₃ e G₄, bem como para G₆ e G₇. Assim, para fins de análise, os tratamentos experimentais foram agrupados em G_b (G₃+G₄), G_m (G₅) e G_a (G₆+G₇). A tabela 4 mostra o efeito dos diferentes níveis de crioproteção sobre a congelabilidade do sêmen de caprinos.

Não houve diferença estatisticamente significativa (P>0,05) entre os níveis testados. Entretanto, concentrações mais baixas de glicerol permitiram recuperação espermática mais alta. Deste modo, é possível conjecturar que, as modificações osmodinâmicas impostas por altas concentrações de glicerol associadas à inadequada proteção provida pela SAC quando do resfriamento, levaram a um estresse ainda maior sobre os espermatozoides.

TABELA 4 - Efeito dos níveis de crioproteção sobre a recuperação espermática após descongelação do sêmen caprino congelado em diluidor à base de água de coco.

	Níveis de crioproteção		
	G _b (baixo) - 3%+4%	G _m (médio)-5%	G _a (alto)- 6%+7%
MIP1 (%)	19,7 ± 3,51	9,77 ± 6,29	10,9 ± 4,06
Vigor2 (0-5)	1,38 ± 0,15	0,92 ± 0,27	1,14 ± 0,17

¹ Valores transformados para arcsen;

² Valores transformados para a raiz quadrada da soma entre o vigor a constante 0,5.

Conclusões

A solução à base de água de coco pode ser empregada para a lavagem do ejaculado caprino. Entretanto seu uso como diluidor deve ser preterido.

Os danos metabólicos causados ao espermatozóide durante a fase de resfriamento são irreversíveis e não são vicariados por concentrações mais elevadas do crioprotetor para a congelação profunda.

Referências Bibliográficas

- ATREJA, S.K.; ANAND, S.R. Phospholipase and lysophospholipase activities of goat spermatozoa in transit from the caput to the cauda epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.74, p.687-691, 1985.
- CHIEFFI, A.; MASOTTI, N. l'utilizazione dell'acqua de cocco (Cocos nucifera) come mestruo diluitore. *Zootecnia Veterinária*, v.14, p.95-103, 1959.
- CORTEEL, J.M. Production, storage and insemination of goat semen. In: SYMPOSIUM OF MANAGEMENT OF REPRODUCTION IN SHEEP AND GOATS, 1977. Madison. *Proceedings*. Madison: University of Wisconsin, 1977. p.41-57.
- FONSECA, V.O.; VALE FILHO, V.R.; MIES FILHO, A.; ABREU, J.J. **Procedimentos Para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1992. 79p.
- MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A.A.; Effects of two washing solutions on sperm survival of bucks. In: SANHI, A. & LOKESHWAR, R.R. **Recent Advances in Goat Production**. New Delhi: Organizing Committee of The 5th International Conference on Goats, 1992. p.1089-1094.
- NORMAN, C.; JOHNSON, C.E.; PORTERFIELD, J.D.; GOLDBERG, E.; DUNBAR, R.S.; MIN, H.S. Survival and fertility of bovine sperm kept at variable temperatures in coconut milk extender. *Journal of Agricultural Science*, v.59, p.33-39, 1962.
- STEEL, R.G.D. ; TORRIE, J.H. **Principles and procedures in statistics. A biometrical approach**. New York: McGraw-Hill, 1980. 134p.
- VENKATASWAMI, V. A preliminary report on duck's yolk and coconut water as semen diluents. *Indian Veterinary Journal*, v.38, p.84-89, 1961.