PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Motilidade espermática de sêmen bovino incubado em banho-maria e garrafa térmica

Carlos Fernando Neves Pereira¹, Angélica Soares Teixeira Prates², Weudes Rodrigues Andrade¹, Carolina Pilar Alves e Dias¹, Eveline Amorim Murta⁴, Jose Eduardo Jardim Murta³

¹Graduandos em Zootecnia – UNIMONTES – Campus Janaúba, MG.

²Graduanda em Pedagogia – UNIMONTES – Campus Janaúba, MG.

³Professor Doutor da UNIMONTES – Campus Janaúba, MG.

⁴Graduanda em Medicina Veterinária – PUC-PR

Resumo

Avaliaram-se duas doses de sêmen bovino, de origem nacional e importada, incubado por dois métodos, com o objetivo de quantificar a motilidade dos espermatozoides. Após descongelamento, incubou-se o sêmen em banho-maria e na garrafa térmica à temperatura de 37°C durante 60 minutos, sendo as avaliações de motilidade espermática realizadas a cada 20 minutos. Os resultados de motilidade espermática do sêmen incubado em banho maria foram, respectivamente, de 50, 30, 20 e 20% e 40, 30, 10 e 10% para sêmen nacional e importado após 0, 20, 40 e 60 minutos. O sêmen incubado na garrafa térmica mostrou resultados de motilidade espermática de 40, 20, 10 e 10% e 40, 10, 10 e 10% para sêmen nacional e importado nos respectivos tempos de 0, 20, 40 e 60 minutos após descongelamento. Não houve diferença

estatística (teste do Qui-quadrado) significativa ($p > 0,05$) entre o sêmen incubado na garrafa térmica ou banho maria, nem entre origem do sêmen (nacionalidade ou importado). Conclui-se que ao passar o tempo a motilidade espermática diminui, mesmo sendo a temperatura da água constante, porém mantendo motilidade espermática após 60 minutos do descongelamento.

Palavras-chaves: banho maria, bovino, criopreservação, descongelamento, sêmen

Motility of bovine semen incubated in a water bath or thermos

Abstract

We evaluated two doses of bovine semen, in domestic and imported, incubated by two methods, with the aim of quantifying the motility of sperm. After thawing, the semen was incubated in a water bath and the flask at a temperature of 37 ° C for 60 minutes, and the evaluations of sperm motility performed every 20 minutes. The results of motility of sperm were incubated in a water bath, respectively 50, 30, 20 and 20%, 40, 30, 10, and 10% for domestic and imported semen after 0, 20, 40 and 60 minutes. The semen incubated in thermos results showed sperm motility 40, 20, 10 and 10% and 40, 10, 10 and 10% for domestic and imported semen in their times of 0, 20, 40 and 60 minutes after thawing. There was no statistical difference (chi-square) significant ($p > 0.05$) between semen incubated in thermos or water bath, or between the origin of the semen (nationality or imported). We conclude that while spending time sperm motility decreases, even though the water temperature constant, while maintaining sperm motility after 60 minutes of thawing.

Keywords: water bath, bovine, cryopreservation, thawed, semen

Introdução

A criopreservação do sêmen bovino teve grandes avanços na década de 40, após a descoberta da função crioprotetora do glicerol (Polge, 1985). Entretanto, mesmo com as melhores técnicas atuais de preservação, obtém-se, em média, 50% de viabilidade da população espermática (Watson, 1995). Por ser uma célula complexa, o espermatozoide torna-se infértil quando um de seus fatores bioquímicos ou morfológicos é afetado. A avaliação de somente um desses aspectos não garante a condição de normalidade do outro, portanto, a combinação de vários fatores em uma análise multifatorial é mais apropriada para diagnóstico da funcionalidade e integridade do espermatozoide (Melo & Henry, 1999).

Nos tempos atuais, com a tamanha evolução das biotecnologias utilizadas na pecuária, a avaliação andrológica deve ser indicada não só para touros com deficiências na reprodução, mas também aos mais aptos, sob o ponto de vista andrológico e zootécnico, pois dessa forma, dependendo das condições de manejo, o produtor poderá utilizar um maior número de vacas por touros (VALE FILHO, 2006; apud OLIVEIRA *et al*, 2008) ou ainda reduzir o número de touros em serviço, reduzindo também os custos e acelerando o ganho genético.

O uso da inseminação artificial proporciona inúmeras vantagens para o produtor, principalmente em relação ao melhoramento genético, sendo essa uma das primeiras ferramentas de melhoramento genético. Em bovinos, a utilização da inseminação artificial para acelerar o progresso genético e prevenir a transmissão de doenças fez desta técnica a principal responsável pelo incremento da produtividade na pecuária (BETTERIDGE, 1986).

No Brasil, esforça-se para que os touros apresentem alto desempenho reprodutivo e alta eficiência de fecundação, resultantes da inseminação artificial, com sêmen de elevada motilidade, alto vigor e baixo índice de espermatozoides com alterações morfológicas, (VALE FILHO, 1989; 1997).

A necessidade de aperfeiçoar e preservar o material genético dos machos, faz com que os pesquisadores encontrem biotecnologias para a reprodução que

permita uma disseminação mais rápida do material genético dos machos (GONÇALVES et al, 2008).

Muitos estudos comprovam que nenhum outro método se mostra tão eficiente para o trabalho de campo quanto o descongelamento feito em água à temperatura entre 35 e 37°C. Quando o sêmen é descongelado em temperaturas inferiores a esta (no bolso, na mão, água a temperatura ambiente, “na vaca”, etc.) o tempo de descongelamento é maior permitindo nova organização de cristais de gelo, o que provoca danos em várias partes dos espermatozoide, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (HENRY; NEVES, 1998), Ruas (2010).

Quanto à conservação da temperatura entre 35 e 37° C, essa pode ser feita de duas maneiras deixando as amostras em banho-maria, ou usando uma garrafa térmica com o objetivo de conservar a qualidade dos espermatozoides por um período de tempo maior, buscando assim uma maior eficiência na inseminação, esse ultimo método, por ser mais simples, de fácil manejo, pode facilitar o trabalho do inseminador, principalmente em projetos com pequenos produtores, onde existe um único bujão para atender a vários produtores.

Observando a importância do método de descongelamento para manutenção da qualidade dos espermatozoides, e buscando uma maior eficiência no manejo da inseminação, objetivou-se com este trabalho avaliar a qualidade do sêmen pela motilidade espermática em dois métodos de descongelamento (banho-maria e garrafa térmica) e incubação à 37° C por 60 minutos.

Material e Métodos

A avaliação do sêmen ocorreu no laboratório de microscopia da Universidade Estadual de Montes Claros, campus Janaúba, Minas Gerais. Utilizaram-se quatro doses de sêmen, duas de origem nacional, da raça Gir e duas de sêmen importado, da raça Holandesa.

O sêmen foi descongelado pelo método tradicional, em água morna entre 35°C a 37°C por 30 segundos, em seguida o sêmen foi incubado em banho-maria com temperatura de 37°C e em uma garrafa térmica com água à 37°C. As doses descongeladas foram acondicionadas em eppendorf, permanecendo as amostra do sêmen nacional e importado incubados por 60 minutos. Com auxílio de pipeta, amostras do sêmen foram depositadas em lamina de vidro para avaliação da motilidade espermática em microscópio ótico em aumento de 20 vezes.

Procedeu-se avaliação da motilidade espermática, por mesmo profissional, a 0, 20, 40 e 60 minutos após o descongelamento do sêmen. Mediu-se também a temperatura da água da garrafa térmica e do banho maria ao decorrer do tempo com auxílio de termômetro de mercúrio.

Na análise estatística utilizaram-se o teste do Qui quadrado ao nível de 5 % de significância entre os métodos de incubação e origem do sêmen.

Resultados

Os resultados da avaliação (Tab. 1) demonstraram diminuição na motilidade ao decorrer do tempo, tanto no sêmen de origem nacional como no importado, bem como incubado em banho maria e na garrafa térmica (Tab. 2).

Tabela 1. Motilidade espermática de sêmen bovino de origem nacional ou importado, incubado em banho-maria.

Sêmen incubado em banho maria		
Tempo após descongelamento	Origem nacional	Origem importado
00 minutos	50%	40%
20 minutos	30%	30%
40 minutos	20%	10%
60 minutos	20%	10%
p>0,05		

Tabela 2. Motilidade espermática de sêmen bovino de origem nacional ou importado, incubado em garrafa térmica.

Sêmen incubado em garrafa térmica		
Tempo após descongelamento	Origem nacional	Origem importado
00 minutos	40%	40%
20 minutos	20%	10%
40 minutos	10%	10%
60 minutos	10%	10%

p>0,05

Não houve diferença significativa entre a motilidade dos espermatozoides nos métodos de incubação para nacionalidade do sêmen, sendo que ambos apresentaram índices de motilidade similar no momento do descongelamento (50 a 40% de motilidade), sendo considerado satisfatório, conforme recomendação do Colégio Brasileiro de Reprodução (1998).

A motilidade espermática ao descongelamento do sêmen de origem nacional e importada foi de 40% e corrobora Leite (2008), que afirma ser o descongelamento do sêmen uma operação delicada, não podendo ser efetuada em condições aleatórias, visto que o sucesso final de um procedimento de congelamento também é limitado pelo processo de descongelamento do sêmen.

Ao analisarmos a permanência do sêmen em temperatura constante (banho-maria e garrafa térmica), 37°C, (a garrafa térmica manteve a temperatura da água em 37°C por uma hora), observamos que com o passar do tempo a motilidade espermática foi diminuído gradativamente, chegando a reduzir pela metade em apenas 40 minutos. Vinte minutos após o descongelamento o sêmen mantido em banho-maria tinha cerca de 30% de motilidade. Considerando que a motilidade ideal no momento do descongelamento é de no mínimo 40%, e que a garrafa térmica pode manter a temperatura constante por até uma hora, esta pode ser usada para transportá-lo, pois o sêmen pode ser mantido nesta condição por até 90 minutos após o

descongelamento. Antes de utilizar a garrafa térmica, é preciso lavá-la com água quente, para evitar queda de temperatura, explica Ruas (2010).

Caso o botijão não esteja próximo ao local onde será realizada a inseminação, pode-se descongelar o sêmen e transporta-lo em uma garrafa térmica. Isso também pode maximizar o uso do material de inseminação pois um único botijão de sêmen pode atender uma maior quantidade de produtores.

Discursão

Dimitropoulos (1967) denominou de T.T.R.L. (teste de termoresistência lento) a prova que consiste na incubação de uma amostra de sêmen a 38°C durante 5 horas, após o que se verifica a porcentagem de motilidade progressiva, apresentando correlação positiva e altamente significativa com a fertilidade real, medida pelo índice de não retorno ao cio aos 60 – 90 dias. JONDET & RABADEUX (1974) relataram que utilizaram o T.T.R.L. há vários anos e eliminaram sistematicamente todo sêmen descongelado que não apresentam pelo menos 20% de espermatozoides ativos após a prova.

O método de avaliação direta do percentual de motilidade é utilizado pela maioria das centrais como parâmetros básicos para interpretar a qualidade da amostra do sêmen. A avaliação direta da motilidade ao microscópio é uma técnica subjetiva e depende da capacitação do avaliador, além da baixa repetibilidade dos resultados entre diferentes avaliadores, o que leva a interpretações equivocadas (Pace *et al.*, 1981). Para a IATF, Bó *et al.* (2005) recomendam o uso de doses que tenham acima de 30% de motilidade ao descongelamento. Contudo, consideram que não há dados na literatura que determinem os padrões mínimos de sêmen para o uso na IATF. Os primeiros trabalhos que estabeleceram os padrões de sêmen congelado geralmente aceitavam acima de 10 milhões de espermatozoides com motilidade progressiva por dose como mínimo para boa fertilidade (Sullivan *et al.*, 1968).

A motilidade (porcentagem de espermatozoides móveis) apresenta correlação com a fertilidade, e deve ser avaliada imediatamente após a coleta

PEREIRA, C.F.N. et al. Motilidade espermática de sêmen bovino incubado em banho-maria e garrafa térmica. **PUBVET**, Londrina, V. 8, N. 19, Ed. 268, Art. 1786, Outubro, 2014.

do esperma. O sêmen não deve sofrer choques térmicos e ação dos ventos, que podem comprometer a sua qualidade. O ideal é manter o sêmen, desde a coleta até o as avaliações, numa temperatura semelhante à corporal (37,5°C).

Um minuto e dez segundos é o tempo estimado para se inseminar uma vaca, considerando apenas a preparação do sêmen e sua aplicação. Quase metade deste período, 30 segundo, refere-se ao descongelamento do sêmen. Parece pouco, quando se pensa em uma única matriz. Já para quem está acostumado a lidar com dezenas ou centenas de fêmeas no manejo reprodutivo, eliminar esse meio minuto pode significar muito.

Conclusões

Conclui-se que independente do método de descongelamento, os sêmens avaliados mostraram bons índices de motilidade espermáticas (40% e 50%), no momento do descongelamento em ambas as nacionalidades, sendo que a motilidade diminui com o passar do tempo diminuindo a 10% após uma hora após o descongelamento independente do método de incubação.

Referências bibliográficas

BETTERIDGE, K.J. Increasing productivity in farm animals. In: Austin, C.R.; Short, R.V. Reproduction in mammals: manipulating reproduction. Cambridge: University Press, p. 1-47, 1986. (Book 5)

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte, CBRA, 28p. 1998

VALE FILHO, V.R. Padrões de sêmen bovino, para o Brasil: análise e sugestões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 8., Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA. p.94-118,1989.

VALE FILHO, V.R. Andrologia no touro: avaliação genital, exame do sêmen e classificação por pontos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.21, p.7-13, 1997.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIRÊDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2.ed. São Paulo: Varela, 395p., 2008

LEITE, T. G. Tempo de equilíbrio na criopreservação do sêmen: Efeitos sobre características de motilidade e de integridade das membranas espermáticas de touros Gir leiteiro. 122 p. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) -Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.