

FR 11. QUALIDADE DO SÊMEN BOVINO CONGELADO SUBMETIDO A REPETIDAS EXPOSIÇÕES AO AMBIENTE

M. M. Horn¹, A. S. Costa² e J. C. F. Moraes³

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. ²Universidade da Campanha, Bagé, RS, Brasil. ³Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária, Centro de Pesquisas de Pecuária dos Campos Sulbrasilenses, Bagé, RS, Brasil.

Abstract

Evaluation of bovine semen frozen in french straws after 10 expositions to environment

This study was developed to evaluate the cumulative effects and possible injuries that could happen when the straws of 0.5 mL, are exposed to environmental temperature for ten seconds up to ten times. Ejaculates of five bulls were used for freezing. The sperm motility and vigour were analysed after thawing and after thermoresistance test (30 minutes at 46 °C). The acrosomal integrity was evaluated under phase contrast microscopy immediate after thawing. The results indicate that sperm motility and vigor post thawing was significantly affected after five expositions, but the acrosome was affected after the third exposition, and the injuries were more clearly observable after the thermal resistance test.

Palavras chaves: Teste de termo-resistência, acrossoma, qualidade sêmen, manejo sêmen congelado.

Key words: Semen quality, management of frozen semen, semen freezing.

Introdução

Ocorrem situações em que palhetas de sêmen congelado são repetidamente expostas a temperatura ambiente, a vento e sol. A anatomia da palheta francesa, apresenta-se com uma grande superfície de área e pequeno volume (0,5 ml e 0,25 mL), permitindo rápidas mudanças na temperatura interna, podendo estas serem causadas pela passagem de palhetas de sêmen congelado de um botijão para outro, manipulação do sêmen do botijão, que podem levar a uma descongelação parcial (Senger, 1980). O mau manejo do sêmen ocasiona queda na fertilidade das inseminações (Berndtson *et al.*, 1976). Pace & Sullivan (1978) reportaram que a motilidade dos espermatozoides e a percentagem de acrossomas intactos declinou significativamente quando o sêmen envasado em palhetas foi levantado e baixado no botijão de nitrogênio líquido, um total de 480 vezes durante um período de 6 meses. Rhodes *et al.*, (1985) avaliaram o efeito de exposições do sêmen a temperatura ambiente em palhetas continentais, removidas do nitrogênio líquido, por períodos de 30, 60 e 120 segundos demonstrando diferenças significativas quando expostas por 60 e 120 segundos. Reduzindo-se a temperatura abaixo de 20 °C os espermatozoides começam apresentar mudanças biofísicas, principalmente na membrana plasmática (Angola, 1994). Muitas evidências levam a crer que o sêmen congelado deve permanecer sempre a 130 °C negativos ou menos, para evitar o fenômeno da recristalização causador de danos a estrutura celular. Estes danos são cumulativos, e a incubação deste sêmen durante 2 a 4 horas pós descongelação pode tornar evidente esta redução de viabilidade, (Barth, 1993). O presente estudo, avaliou as alterações causadas ao sêmen congelado de bovinos, quando expostos a temperatura ambiente de 1 até 10 vezes, por 10 segundos.

Material e métodos

O experimento foi conduzido no laboratório de tecnologia de sêmen da Central Riograndense de Inseminação Artificial, Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado do Rio Grande do Sul. Foram utilizados 5 reprodutores doadores de sêmen desta central. O sêmen foi coletado através de vagina artificial e foram utilizados para a congelação ejaculados que apresentaram mais de 60 % de motilidade espermática e vigor igual ou superior a 3. A morfologia espermática não ultrapassou 20 % de alterações patológicas. Os ejaculados dos touros foram diluídos em citrato-gema (2.94 % citrato de sódio, 7 % de glicerol, 20 % de gema de ovo). Atingindo o período de equilíbrio (4 a 5 horas), procedeu-se a congelação vertical em vapor de nitrogênio por 20 minutos segundo os princípios estabelecidos por Jondet (1964). Foram utilizadas 20 palhetas de cada partida de sêmen congelado, sendo cada partida proveniente de um touro distinto.

As exposições a temperatura ambiente foram realizadas em dez ocasiões em dias alternados. As exposições de todas as palhetas foram feitas individualmente, durante 10 segundos em uma temperatura média de 25 °C, ao ar livre, porém sem exposição ao sol ou vento. As palhetas eram repostas no nitrogênio líquido por 30 minutos,

após cada exposição, antes de iniciarem-se os testes. O sêmen foi descongelado a 37 °C por 25 segundos e diluído em citrato de sódio a 2.94 %, para avaliação da motilidade e vigor espermático. O teste de termo-resistência rápido (TTR), foi procedido com incubação das doses de sêmen em banho-maria a 46 °C por 30 minutos. A avaliação do acrossoma, foi efetivada com algumas gotas de sêmen descongelado, diluído em formol citrato a 2.94 % e observado sob contraste de fase em câmara úmida, com aumento de 1000 x contando-se 100 células em cada amostra. As variáveis medidas foram transformadas em “ranks” e submetidas a análise de variância considerando os efeitos das exposições e de partidas/touros.

Resultados e discussão

Foram constatadas diferenças significativas entre as médias obtidas para todas as partidas/touros testadas. Fato este esperado em função da variabilidade individual. Este ensaio deixou de considerar as possíveis diferenças de partidas dentro de touros, porque foi um primeiro estudo, visando contribuir, na prática para o manejo do sêmen congelado na Central. Redução nos indicadores de qualidade (motilidade após a descongelação, após o TTR, o vigor após o TTR e danos acrossomáticos), foram evidenciados como significativos ao longo das 10 exposições. Na tabela 1, estão apresentadas as médias constatadas para as amostras de sêmen expostas de 10 a 100 segundos ao ambiente.

Tabela 1. Médias das variáveis medidas ao longo das exposições de 10 segundos ao ambiente

Exposição	Motilidade	Motilidade TTR	Vigor TTR	Acrossoma
0	37.0 ± 2.1	38.0 ± 1.9	3.8 ± 0.2	15.6 ± 2.9
1	36.0 ± 2.1	33.0 ± 1.9	3.2 ± 0.2*	20.6 ± 2.9
2	34.0 ± 2.1	33.0 ± 1.9	3.4 ± 0.2	27.8 ± 2.9*
3	37.0 ± 2.1	32.0 ± 1.9*	3.0 ± 0.2*	30.2 ± 2.9*
4	35.0 ± 2.1	28.0 ± 1.9*	3.0 ± 0.2*	27.6 ± 2.9*
5	30.0 ± 2.1*	26.0 ± 1.9*	3.0 ± 0.2*	31.2 ± 2.9*
6	33.0 ± 2.1	26.0 ± 1.9*	3.0 ± 0.2*	27.0 ± 2.9*
7	26.4 ± 2.1*	23.0 ± 1.9*	2.6 ± 0.2*	29.6 ± 2.9*
8	24.0 ± 2.1*	19.0 ± 1.9*	2.8 ± 0.2*	31.8 ± 2.9*
9	23.0 ± 2.1*	15.0 ± 1.9*	2.4 ± 0.2*	31.2 ± 2.9*
10	30.0 ± 2.1*	18.0 ± 1.9*	2.4 ± 0.2*	28.6 ± 2.9*

* Diferença significativa ($P < .05$) com relação as palhetas não expostas ao ambiente.

As palhetas descongeladas apresentaram diferença significativa na motilidade espermática, somente a partir da 5ª exposição à temperatura ambiente. O acrossoma apresentou diferença significativa a partir da segunda exposição a temperatura ambiente, evidenciado pela observação da perda do contorno da porção apical do acrosoma em mais 20%. A motilidade no teste de termo-resistência foi diferente a partir da terceira exposição, porém estes resultados na prática, não inviabilizariam o uso destas palhetas, pois mesmo com uma diferença estatisticamente significativa, os valores não ultrapassaram o limite mínimo de 15% de espermatozoides móveis na amostra, necessários para aprovação para o uso comercial, de acordo com os padrões estabelecidos pelo MAARA, portaria SDR Nº 25/1996.

Foi observado que alguns valores de motilidade espermática descenderam e após algumas exposições tornaram a subir, o que indicou uma variação dos resultados entre palhetas de uma mesma partida, revelando que este tipo de estudo deve ser delineado com muito cuidado incluindo toda os possíveis efeitos no modelo.

Os resultados estão em conformidade com o descrito por Barth (1993), que os danos derivados de repetidas exposições a temperatura ambiente, causam uma redução na viabilidade do sêmen na pós-descongelação. No presente trabalho o sêmen que sofreu incubação apresentou diferenças já a partir da terceira exposição. Baseado nestes dados se poderá inferir que o teste de termo-resistência foi mais rigoroso na avaliação das amostras de sêmen congelado. Os resultados deste pequeno ensaio demonstram a necessidade de um manejo correto na manipulação do sêmen congelado, desde a Central processadora até o consumidor final. Foi comprovada a redução significativa da qualidade do sêmen, se este fato será traduzido em menor eficácia das inseminações artificiais, não foram possíveis inferências, no entanto sabe-se que existe esta dependência.

Literatura citada

- Angola, P. A. 1994. Aspectos fisiológicos acerca del congelamiento de semen. *Veterinaria México*, 25: 207-209.
- Barth, A. D. Factors affecting fertility with artificial insemination. *Veterinary Clinics of North America*, 9:275-287, 1993.
- Berndtson, W. E., B. W. Pickett, C. D. Rugg. 1976. Procedures for field handling of bovine semen in plastic straws. In: *Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod*, 6, Nat Assoc Anim Breeders, Columbia, Proceedings. p. 51-60.
- Senger, P. L. 1980. Handling frozen bovine semen - Factors which influence viability and fertility. *Theriogenology*, 13:51.
- Jondet, R. 1964. Congelation rapide du sperm du taureau conditionné em paillettes. In: *International Congress On Animal Reproduction And Artificial Insemination*, 5, Trento, 1964. Proceedings. 4:463-468.
- Pace, M. M. and J. J. Sullivan. 1978. A biological comparison of the 0,5 ml ampula and 0,5 ml french straw system for packaging bovine spermatozoa. In: *Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod.*, 7, 1978. Proceedings. p. 22-32,
- Rhodes, F., C. S. Galina, A. Duchateau and C. Soto. 1985. An Investigation into the Properties of Bovine Semen in the Mexican Tropics. *World Review of Animal Production*, 21:15-19.