

INFLUÊNCIA DA TÉCNICA DE SWIM-UP SOBRE A QUALIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN DE REPRODUTORES CAPRINOS

Amanda Aragão Ávila¹, Maria Layris Melo de Oliveira², Solange Damasceno Sousa³,
Pedro Alberto Freitas da Silva⁴, Alice Andrioli⁵, Fágner Cavalcante Patrocínio dos
Santos⁶

¹Discente do Curso de Pós-graduação em Zootecnia – Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA. E-mail; amandazootec@yahoo.com.br

²Discente do Curso de graduação em Biologia – Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA.

³Discente do Curso de graduação em Zootecnia – Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA.

⁴Discente do Curso de Medicina veterinária – INTA.

⁵Orientadora. Profa. Dra. Curso de Pós- graduação em Zootecnia - Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA. E- Mail: alice@cnpq.embrapa.br

⁶Discente do Curso de Pós-graduação em Zootecnia – Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA

Resumo: Algumas técnicas de lavagem de sêmen que envolvem etapas de centrifugação extra, têm sido criticadas devido ao aumento da possibilidade de danos que podem ocorrer aos espermatozoides. Nesse contexto, a presente proposta objetivou o estudo da técnica de *Swim-up*, para aplicação em sêmen de reprodutores caprinos, para determinar sua influência sobre o vigor e motilidade individual progressiva dos espermatozoides. Para tanto, foram avaliados 30 amostras espermáticas oriundas de cinco reprodutores caprinos. Os resultados foram obtidos pela avaliação do MIP e vigor espermático em microscópio óptico antes e depois do procedimento de *Swim-up* revelou que houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) desses parâmetros. Conclui-se com estes resultados que a técnica de *Swim-up* possibilita a recuperação de espermatozoides para o uso em inseminação intrauterina e fertilização *in vitro*.

Palavras chave: caprino, lavagem espermática, sêmen.

Introdução

Com o passar dos anos várias técnicas de “lavagem de sêmen” para humanos e animais, tem sido desenvolvidas, com o intuito de controlar a disseminação de microorganismos (Ferraz, 2009), além de melhorar a qualidade das amostras por meio da seleção dos espermatozoides móveis e morfológicamente normais de células imaturas e defeituosas. Estes procedimentos consistem basicamente, na separação de

espermatozóides que são retirados do plasma seminal e ressuspensos em meio de cultura (Marti et al., 2006).

Técnicas de filtração, procedimentos de centrifugação em gradiente de densidade, migração dos espermatozóides para um meio de cultura (*Swim-up*), dentre outras técnicas de reprodução assistida, são comumente utilizadas em programas que utilizam fertilização *in vitro* (Cisale et al., 2001 e Martí et al., 2006). Para a avaliação do sêmen, o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), preconiza a análise de alguns parâmetros espermáticos como motilidade, vigor, concentração e morfologia para que os espermatozóides presentes no ejaculado tenham viabilidade de fertilização.

De acordo com Jameel (2008), a técnica de *Swim-up* é a mais antiga, mais simples, e de baixo custo, sendo comumente utilizada em casos de normozoospermia e subfertilidade feminina. A eficiência desse procedimento baseia-se na motilidade dos espermatozóides presentes no ejaculado (Wainer et al., 2004 e Jameel, 2008), mas também sobre a força adicional de uma centrifugação suave para isolar espermatozóides de maior motilidade de outras amostras de células (Tucker e Jasen, 2002).

Algumas técnicas de lavagem de sêmen que envolvem etapas de centrifugação extra, têm sido criticadas devido ao aumento da possibilidade de danos que podem ocorrer aos espermatozóides (Drobnis et al., 1991; Tucker e Jasen, 2002). No entanto, alguns autores relatam ser possível a obtenção, acima de 90%, de espermatozóides móveis e morfologicamente normais, por meio da técnica de *Swim-up*. Nesse contexto, a presente proposta abrangerá o estudo da técnica de *Swim-up*, para aplicação em sêmen de reprodutores caprinos, para determinar sua influência sobre o vigor e motilidade individual progressiva dos espermatozóides.

Material e Métodos

O presente experimento ocorreu nos meses de junho de 2012 a julho de 2012, nas dependências da Embrapa Caprinos e Ovinos, situada em Sobral, Ceará (latitude 3°45'0,5" sul, longitude 40° 20'45,8" oeste, 11 metros de altitude).

Foram utilizados cinco reprodutores caprinos da raça Moxotó, Canindé e Anglo Nubiano, os quais foram alojados em baias e mantidos em um sistema semi-intensivo de criação com acesso a área de pastejo. O sistema de alimentação consistia no recebimento de ração balanceada de feno de *Leucaena Leucocephala* e capim Elefante

picado (*Pennisetum Purpureum schun*), sal mineral a 3% à vontade, concentrado 300 g/animal/dia, uma vez ao dia e água *ad libitum*.

Semanalmente os machos eram submetidos a avaliações seminais totalizando 30 amostras. Para as coletas de sêmen utilizava-se o método da vagina artificial (Mies Filho, 1987; CBRA, 1998), tendo como manequim uma fêmea, ovariectomizada, em estro induzido pela aplicação de 1,0mg de benzonato de estradiol.

Após coleta de sêmen esses eram imediatamente encaminhados para o laboratório de biotecnologia de sêmen, onde permaneciam em banho maria a 37°C. Em seguida, eram realizadas avaliações da motilidade individual progressiva (MIP) e vigor espermático.

Esses parâmetros foram observados através de uma gota de sêmen colocada entre lâmina e lamínula, com leitura feita em microscópio óptico com aumento de 400x. A classificação do MIP foi de acordo com o movimento dos espermatozóides que progridem de forma mais ou menos retilínea no campo do microscópio, sendo que os espermatozóides que giram sobre si mesmo podem estar indicando que sofreram um choque térmico ou que o meio não é isotônico com o sêmen, recebendo nota de 0 a 100%. Já o vigor foi avaliado conforme a velocidade que os espermatozóides se deslocam no campo do microscópio, sendo estes classificados numa escala de 0 a 5 pontos onde os valores mais elevados indicam sêmen de melhor qualidade (CBRA, 1998; Ax et al., 2004).

Para a técnica de *Swim-up* foi utilizada uma pequena amostra de sêmen fresco (100µl), o qual foi depositado ao fundo de um tubo falcon®, seguido pela deposição, por cima do sêmen, de um meio de cultura Talp sp, sendo essas frações não homogêneas. Após o procedimento descrito, os tubos foram inclinados a um ângulo de 45° em estufa 5% de CO² com temperatura de 37°C, durante uma hora, para que haja a migração dos espermatozóides para o meio de cultura.

Após a técnica de *Swim-up*, foi retirado 600µl do sobrenadante contendo os espermatozóides, onde foram encaminhados para centrifuga com temperatura de 37°C por 10 minutos a 2.000xg. Após esse procedimento o sobrenadante foi descartado e o pellete espermático foi ressuspendido em 200µl de Talp sp e encaminhado para nova avaliação do MIP e vigor espermático.

Para a comparação dos resultados obtidos antes e depois do *Swim-up*, foi usado o teste de Wilcoxon para dados não paramétricos, com nível de significância adotado de 5%, onde o $T_{\text{calculado}} < T_{\text{crítico}}$ indica que houve diferença significativa.

Resultados e discussão

A análise da ordenação das diferenças das respostas obtidas antes e depois da técnica de *Swim-up* sobre o MIP e vigor espermático no sêmen caprino (Tabela 1), revelou que houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) após aplicação do procedimento de lavagem para ambas as variáveis estudadas, sendo o valor do $T_{\text{calculado}}$ de 6,5 para MIP e $T_{\text{calculado}}$ de 42 para o vigor inferiores ao valor do $T_{\text{crítico}}$ de 136. Segundo Drobnis et al (1991), os procedimentos de seleção espermática podem afetar os espermatozoides durante o desenvolvimento do processo, reduzindo o vigor ou motilidade espermática. Desta forma a provavelmente a diminuição observada para esses parâmetros estaria relacionada com o procedimento de centrifugação ao qual as amostras foram submetidas. Além do que segundo Correa e Zavos (1996), o estresse relacionado ao tempo necessário para recuperação dos espermatozoides também pode contribuir para a elevada taxa de mortalidade e perda de capacitação dos espermatozoides.

Apesar da diminuição significativa os resultados de MIP e vigor pós swim-up, dos espermatozoides, esses são satisfatórios e compatíveis para utilização em inseminação intra-uterina e fertilização in vitro, uma vez que o percentual de células móveis está relacionado com o percentual de células vivas ou viáveis, além do que a técnica permite a recuperação dos melhores espermatozoides.

Segundo Arruda et al (2011), a motilidade e vigor espermático são estimados de forma subjetiva e utilizados rotineiramente em laboratórios. No entanto, continuam tendo grande valor, principalmente para diferenciar sêmen de baixa e alta qualidade, além de ter relevância na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozoides (Verstegen et al., 2002, Matos et al., 2008), entretanto, não é o melhor indicador de fertilidade (Januskauskas e Zilinskas, 2002).

Tabela 1. Valores individuais das avaliações da Motilidade individual progressiva (MIP) e vigor espermático dos reprodutores caprinos, antes e depois do *Swim-up*.

Amostras	Motilidade		Vigor	
	Antes	Depois	Antes	Depois
1	90%	75%	4	4

Tema: Potencial para a Inovação e Sustentabilidade do Semiárido

2	90%	35%	5	3,5
3	90%	90%	5	4
4	90%	75%	4	4
5	90%	40%	4	3
6	80%	90%	3	4
7	90%	70%	4	4
8	90%	65%	4	4
9	90%	80%	5	4
10	90%	55%	5	4
11	90%	70%	4	4
12	90%	80%	4	4
13	70%	20%	3	2
14	80%	30%	4	2,5
15	90%	35%	4	2
16	90%	45%	4	3,5
17	90%	50%	4	4
18	90%	85%	4	4
19	80%	40%	4	2,5
20	80%	45%	4	3,5
21	90%	65%	4	3
22	90%	50%	4	3
23	90%	45%	4	3
24	90%	55%	4	3,5
25	90%	75%	4	4
26	90%	70%	5	4,4
27	80%	70%	4	5
28	90%	55%	4	3
29	90%	85%	4	4
30	90%	90%	5	4,5

Conclusão

A técnica de *Swim-up* possibilita a recuperação de espermatozóides para o uso em inseminação intrauterina e fertilização *in vitro*. No entanto, futuras pesquisas devem ser realizadas para avaliar a capacidade fertilizante dos espermatozóides recuperados, após o método de *Swim-up*.

Referências Bibliográficas

- AX, R.L.; DALLY, B.A.; DIDION, R.W. et al. Avaliação do sêmen. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. (Ed.). **Reprodução Animal**. 7.ed. Kiawah Island: Manole, 2004. p.369-379.
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; OLIVEIRA, L.Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; AFONSO, F.J.; LEMES, K.M.;

JAIMES, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.145-151, 2011.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Colégio Brasileiro de Reprodução animal, 2ª edição, Belo Horizonte: CBRA, 49p., 1998.

CISALE, H.; FISCHMAN, M.; BLASI, C. et al. Enrichment of high-quality spermatozoa in bovine semen: relative effectiveness of three filtration matrixes. **Andrologia**. v.3, p.143–150, 2001.

CORREA, J.R.; ZAVOS, P.M. Preparation and recovery of frozen-thawed bovine spermatozoa via various sperm selection techniques employed in assisted reproductive technologies. **Theriogenology**, v.46, p.1225-1232, 1996.

DROBNIS, E.; ZHONG, C.; OVERSTREET, J. Separation of cryopreserved human sperm using Sephadex columns, washing, or Percoll gradients. **Journal of Andrology**, v. 12, n.3, p.201–208, 1991.

FERRAZ, R.E.O. **Deteção do vírus da Artrite Encefalite Caprina em sêmen tratado de reprodutores soropositivos**. 2009. 72f. (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 2009.

JAMEEL, T. Sperm swim-up: a simple and effective technique of semen processing for intrauterine insemination. **Journal of the Pakistan Medical Association**, v.58, n.2, p. 71-74, 2008.

JANUSKAUSKAS, A.; ZILINSKAS, H. Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. **Veterinary and Zootech**, v.17, n.39, p.1-8, 2002.

MARTÍ, E.; PÉREZ-PÉ, R.; MUIÑO-BLANCO, T. et al. Comparative Study of Four Different Sperm Washing Methods Using Apoptotic Markers in Ram Spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.27, n.6, p.746-753, 2006.

MATOS DL, ARAÚJO AA, ROBERTO IG, TONIOLLI R. Análise computarizada de espermatozóides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.225-232, 2008.

MIES FILHO, A. **Inseminação Artificial**. 6.ed. Rio Grande do Sul. 1987. 736p.

TUCKER, K.E.; JANSEN, C.A.M. [2002]. **Sperm separation techniques: comparison and evaluation of gradient products**. Disponível em:<

<http://www.ivf.nl/Articles/pdf/SpermSeparationTechniques.pdf>>. Acessado em: 18 Ago. 2011.

VERSTEGEN J, IGUER-OUADA M, OCLIN K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.

WAINER, R.; ALBERT, M.; DORION, A. et al. Influence of the number of motile spermatozoa inseminated and of their morphology on the success of intrauterine insemination. **Human Reproduction**. v.19, n.9, p.2060-2065, 2004.