



Efeitos da homeopatia combinado com diluente a base de leite de cabra na criopreservação de sêmen de ovinos

Effects of homeopathy combined with diluent made of goat milk in the cryopreservation of ovine semen

Artur Maggioni e Silva¹, Antonio Carlos Duenhas Monreal^{2*}

¹Faculdade de Ciências Veterinárias e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

²Programa de Mestrado em Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

<http://www.seer.ufms.br/index.php/pecibes/index>

*Autor correspondente:
Antônio Carlos Duenhas
Monreal, Universidade Federal
de Mato Grosso do Sul –
UFMS. E-mail:
antonio.monreal@ufms.br

Resumo

A criopreservação é uma importante ferramenta da biotecnologia que deve ser utilizada para a conservação do sêmen e banco de germoplasma. O presente estudo teve como objetivo avaliar os parâmetros de motilidade e vigor na criopreservação de sêmen de ovinos utilizando diluidor padrão Glicina Gema Leite (leite de cabra) como controle, e sua combinação com o complexo homeopático (Cistus canadensis + Arnica montana + Dulcamara) na 12^a centesimal hahnemaniana. Para o estudo foram utilizados cinco carneiros pertencentes ao grupo genético denominado de “Ovino Pantaneiro”. O sêmen foi descongelado após 30 dias de congelamento. Os resultados obtidos foram insatisfatórios permitindo inferir que o complexo homeopático na 12^a Centesimal Hahnemaniana em diluidor padrão a base de leite de cabra não melhorou a criopreservação do sêmen ovino. Mais estudos são necessários para investigar o componente do diluidor utilizado e sua relação com a homeopatia e suas dinâmizações.

Palavras-chave:
criopreservação; sêmen;
homeopatia; fertilidade.

Abstract

Cryopreservation is an important biotech tool that should be used for the conservation of semen and germplasm bank. This study aimed to evaluate the parameters motility and vigor in ram semen cryopreservation using standard thinner Glycine Milk Yolk (goat milk) as a control, and its combination with homeopathic complex (Cistus canadensis + Arnica montana + Dulcamara) in 12^a Hahnemann centesimal. Five rams belonging to the genetic group called "Pantanal Sheep" were used. Semen was thawed after 30 days of freezing. The results obtained were unsatisfactory allowing infer that homeopathic complex in standard thinner in 12^a Hahnemann centesimal goat's milk did not improve the cryopreservation of ram semen. More studies are needed to investigate the component used thinner and his relationship with homeopathy and its dynamizations.

Key-words: cryopreservation;
semen; homeopathy; fertility.

1. Introdução

A criopreservação de sêmen consiste em preservar as características seminais visando manter o máximo de viabilidade espermática e possibilitar melhor aproveitamento do ejaculado (Silva e Guerra, 2011). Entretanto, a criopreservação impõe aos espermatozoides condições desfavoráveis à sua viabilidade, promovendo decréscimo na capacidade de fertilização, integridade funcional da membrana e influenciando diretamente em sua sobrevivência após o processo de congelação (Moura, 2009).

Segundo Bittencourt et al. (2013) o choque térmico e o rompimento da membrana plasmática dos espermatozoides são as principais causas de inviabilidade espermática. Em estudo recente o uso de substâncias crioprotetoras com o objetivo de proporcionar melhores índices no processo de congelação e descongelação, a utilização da gema de ovo como crioprotetor mostrou-se satisfatório para o processo de criopreservação atuando com ação protetora, visto que os lipídeos e a lectina presente na gema, preservam a integridade estrutural e fornecem proteção osmótica a membrana espermática (Monreal et al., 2014).

O uso da biotecnologia associada às técnicas de tratamentos convencionais possibilitam um avanço no melhoramento genético, fazendo com que o potencial de fertilidade dos animais e a viabilidade do sêmen congelado sejam melhorados aumentando os índices reprodutivos (Roncoletta et al., 1999). Diante do exposto, Borges et al. (2011) analisaram os componentes da membrana espermática, diferenciando seus componentes estruturais e analisando o estresse oxidativo ocasionado pelo processo de criopreservação, a partir daí Tonieto et al. (2010) compararam o uso de crioprotetores tradicionais à base de gema de ovo e glicerol associados a diluidores como trealose (100mM) e Low Density Lipoproteins (LDL) (8%) sendo uma alternativa para criopreservação do sêmen de carneiros, permitindo uma melhora da característica seminal.

Devido às alterações físicas e osmóticas pertinentes à criopreservação e da membrana plasmática, e sendo esta importante para a fertilidade dos espermatozoides, após o processo de descongelação, o uso do sêmen descongelado para técnica de inseminação artificial em índices de fertilidade satisfatórios, devem ser submetidos à diluidor e s com c apa c idade de criopreservação adequada visando um número de espermatozoides viável para o processo de fecundação (Câmara e Guerra, 2011).

Como alternativa para o tratamento de sêmen criopreservado, Lima et al. (2012) demonstraram que o uso de medicamento homeopático pode ser empregado por via oral, na ração ou no diluidor, tendo resultado significativo no tratamento de distúrbios reprodutivos em animais de produção. Soto et al. (2010) avaliaram o uso de *Avena sativa* em forma de glóbulos diluídos a cada 100 mL de sêmen de reprodutores suínos, detectando maior motilidade e vigor espermático no grupo tratado quando comparado ao controle. Segundo os estudos de Vijnovsky (2010) em humanos, os medicamentos *Cistus canadensis* e *Dulcamara*, são destinados a indivíduos que sofrem com o frio e mudanças bruscas de temperatura, e o medicamento *Arnica montana*, descrito como promotor da melhora de fadiga, traumas físicos e cansaço, tendo seus sintomas agravados em temperaturas amenas.

Sendo indicado após desgaste excessivo ou esforço muscular o medicamento *Arnica montana* apresenta curto período de ação, sendo benéfico em organismos que estão em constante movimento, o mesmo ocorre para o medicamento *Dulcamara*, além de atuar sobre o sistema linfático e fibromuscular (Lathoud, 2010). O presente estudo teve como objetivo avaliar o uso complexo homeopático (*Cistus canadensis* + *Arnica montana* + *Dulcamara*) na 12CH (centesimal hahnemaniana) em diluidor padrão à base de leite de cabra para congelar sêmen ovino, avaliando os parâmetros motilidade e vigor ante e após a congelação.

2. Material e Métodos

2.1. Local experimental, alimentação e animais.

O experimento foi realizado no período de agosto a julho de 2015 no Centro Tecnológico para Ovinocultura (CTO) da Universidade Anhanguera – Uniderp (latitude 20° 33'53,09”S, longitude 54° 32'29,32” O) em Campo Grande, estado de Mato Grosso do Sul, Brasil.

No presente trabalho foram utilizados cinco carneiros pertencentes ao grupo genético denominado de “Ovino Pantaneiro” com idade média de três anos. Os animais foram submetidos a exame clínico geral e comprovação de hígidez e realizado por um mesmo médico veterinário, visando o adequado manejo sanitário e reprodutivo, sendo os mesmos mantidos em galpões próprios, sob luminosidade natural recebendo silagem de milho na quantidade de 5% do peso vivo como alimento principal duas vezes ao dia (início da manhã e final da tarde), suplementação proteica (18% PB), na quantidade de 400g/dia/animal, sal mineral específico e água ad libidum. O referido projeto foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais CEUA/UFMS com o número de protocolo nº271/2010.

2.2. Grupos experimentais.

O trabalho foi composto por dois grupos experimentais. Sendo G1 o Glicina Gema Leite (GGL) com leite de cabra para controle, e o G2 sua combinação com o complexo homeopático (*Cistus canadensis* + *Arnica montana* + *Dulcamara*) na 12CH.

O diluidor GGL foi processado no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Pequenos Ruminantes (BIOCAPRI) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS (latitude 20° 30'38,59”S, longitude 54° 37'18,04”W) como proposto por Gonzalez (1996). Os medicamentos homeopáticos foram manipulados em farmácia homeopática (Homeovita), partindo da 11CH dos medicamentos e posteriormente dinamizados em solução fisiológica até a 12CH. Posteriormente foi realizada a elaboração do grupo experimental, de modo que para composição do meio GGL + complexo homeopático foi adicionado 20 mL do respectivo produto homeopático em 80 mL dos 100 mL de água destilada necessária à formação da solução. Após a diluição do medicamento no diluidor os meios foram congelados para sua utilização posterior conforme necessidade pelo cronograma de execução.

2.3. Colheita, análise e congelação do sêmen.

Com o intuito de adaptar os animais à vagina artificial para a colheita de sêmen destinada à congelação, os carneiros foram treinados e condicionados à mesma. Semanalmente, os ejaculados foram coletados, com frequência de duas colheitas/carneiros/semana, durante o período de setembro a novembro de 2014. A vagina artificial foi aquecida em temperatura média de 45°C e revestida internamente com uma mucosa de borracha. Um funil de silicone foi encaixado na vagina e na sua extremidade mais fina acoplado um tubo de falcon de plástico graduado (15 mL). Esse mesmo tubo foi revestido externamente com papel alumínio, para manter a temperatura do ejaculado no momento da colheita pelo meio ambiente e também pela incidência de raios solares. Em seguida, após a colheita do sêmen o tubo foi encaminhado ao laboratório, para que fossem efetuadas as análises laboratoriais.

Os ejaculados foram mantidos em banho-maria a 30°C e em seguida submetidos às avaliações macroscópicas de volume, aspecto e cor, e microscópicas de motilidade, vigor e concentração, segundo Evans e Maxwell (1990).

Foi efetuada após as avaliações de motilidade e vigor, a determinação da concentração espermática, para que o rendimento do número de doses fosse calculado, para que cada dose inseminante devesse possuir uma concentração de 100×10^6 espermatozoides por palhetas francesas de 0,25 mL.

Para efetuar o cálculo, alguns dados foram fundamentais, como: concentração encontrada, motilidade, volume do ejaculado, concentração desejada por dose de sêmen (100×10^6) e volume da palheta (0,25 mL). Chegando ao seguinte cálculo:

Número de doses = [] do ejaculado x motilidade x volume ejaculado / 100×10^6

Volume total = número de doses x 0,25 mL

Volume de diluidor a ser adicionado = volume total – volume ejaculado.

Após o cálculo do volume final, o sêmen in natura foi diluído no meio, Glicina Gema Leite (GGL - leite de cabra) e sua combinação com o complexo homeopático (*Cistus canadensis* + *Arnica montana* + *Dulcamara*) na 12CH, para cada ejaculado distribuído pela metade do volume adquirido.

Em seguida, foi realizado envase mecânico em palhetas francesas de 0,25 mL, as quais foram lacradas com álcool polivinílico. Durante as etapas de diluição e envase do sêmen, as amostras e os meios diluentes foram mantidos em banho-maria a 30°C.

Após o envase, as palhetas foram submetidas ao resfriamento em câmara fria sob temperatura de 5°C, onde permaneceram por 3 horas. Imediatamente após o resfriamento, foi iniciada a curva de estabilização em vapor de nitrogênio líquido mediante o acondicionamento das amostras em caixa de isopor convencional de 35L a uma distância fixa de cinco cm acima do nível do nitrogênio por 20 minutos. Decorrido o período de estabilização, ocorreu a congelação das amostras por imersão direta no nitrogênio líquido. Em seguida as palhetas foram raqueadas e armazenadas em botijão de nitrogênio a -196°C até a sua descongelação e análise.

2.4. Descongelação do sêmen

Após 30 dias, as palhetas foram descongeladas em

banho-maria a 36°C por 30 segundos sendo o sêmen acondicionado em eppendorfs de 1,5 mL previamente aquecidos e mantidos em banho-maria a 36°C. Após a descongelação, o sêmen foi reavaliado por meio das técnicas utilizadas anteriormente à congelação.

Para avaliar a integridade da membrana dos espermatozoides, foi utilizada a técnica de eosin-nigrosina. A integridade da membrana é de fundamental importância, de forma a impedir ou não a penetração do mesmo no compartimento nuclear dos espermatozoides (Garner et al., 1986).

O presente trabalho foi analisado estatisticamente por meio do teste T-Student comparando os dois diferentes meios de criopreservação relacionando as variações de motilidade antes e depois da congelação encontradas no decorrer do experimento. Para realizar a comparação dos dados colhidos em relação ao vigor dos espermatozoides, foi utilizado o teste Wilcoxon, no tempo em que a comparação entre os meios utilizados para a crioproteção, em relação ao vigor, foi realizada utilizando o teste de Mann-Whitney. Os demais resultados das variáveis avaliadas neste estudo foram apresentados na forma de estatística descritiva ou na forma de tabelas e gráficos. A análise estatística foi realizada utilizando-se o “Software” SigmaStat, versão 2.0, considerando um nível de significância de 5%.

3. Resultados

Na tabela 1 estão expostos os dados da avaliação do sêmen antes e após a sua congelação. É possível verificar que os resultados prévios à congelação (vigor e motilidade), o sêmen está em suas propriedades satisfatórias para manipulação conforme Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA (2013). Não houve resultado satisfatório para o sêmen no grupo controle e homeopático, pois os resultados foram baixos para motilidade e vigor na descongelação.

4. Discussão

O presente trabalho avaliou os aspectos de motilidade e vigor antes e após a descongelação do sêmen e os resultados obtidos demonstraram que o sêmen estava viável no período da refrigeração, com motilidade superior a 30% e vigor superior a três, consideradas características seminais desejadas para a congelação de sêmen (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA, 2013), acredita-se que o sêmen refrigerado já tenha sofrido efeito deletério pela baixa motilidade na pré-congelação.

O sêmen descongelado apresentou resultado insatisfatório para ambos os grupos experimentais (GGL + Complexo homeopático) visto que as amostras estavam mortas (Tabela 1), muito provavelmente ocasionado pelo leite de cabra. Câmara e Guerra (2011) e Gillan et al. (2004) relataram que as alterações no momento da refrigeração danificam os canais proteicos e a permeabilidade da membrana dos espermatozoides, aumentando as perdas de várias enzimas no processo de congelação, diminuindo assim os índices de vigor e motilidade, o que no esfregaço para eosina-nigrosina se confirmou essa afirmação.

Segundo Monreal et al. (2012) uma queda na

Tabela 1. Motilidade e vigor dos espermatozoides antes e após o descongelamento, Campo Grande, MS, 2015. (GGL = Glicina Gema Leite, CH = Centesimal Hahnemanniana)

Animal (número)	Motilidade (%)				Vigor (0-5)			
	Congelação		Descongelação		Congelação		Descongelação	
	GGL	GGL+12CH	GGL	GGL + 12CH	GGL	GGL+12CH	GGL	GGL+12CH
1	90	80	0	0	4	4	0	0
2	70	80	0	0	3	3	0	0
3	80	80	0	0	3	3	0	0
4	90	75	0	0	4	3	0	0
5	80	80	0	0	3	4	0	0

motilidade é sempre esperada durante o processo de manipulação do sêmen, visto que durante o processo de congelação-descongelação, os espermatozoides são submetidos à condições adversas como desidratação, mudanças da fase de transição dos fosfolípidios da membrana, efeito solução e a formação de gelo intracelular.

Dado aos resultados insatisfatórios do sêmen descongelado na presente experimentação investigou-se as prováveis causas, observamos que algumas variáveis deveriam ser alteradas, tal como a temperatura do banhomaria, alterada de 36°C para 30°C para o envase e descongelação do sêmen, pois os espermatozoides estavam morrendo rapidamente no momento da imersão das palhetas. De acordo com Moura et al. (1995), a porcentagem de células móveis é maior quando adicionadas a 30°C devido a direta influência da temperatura no diluidor aos parâmetros de motilidade e vigor, entretanto, ambos os parâmetros apresentaram redução ao longo do período de descongelação, independente do diluente utilizado, havendo efeito deletério menor após descongelação do sêmen. Procedemos a redução da temperatura, mas os resultados permaneceram os mesmos.

O tempo utilizado para a refrigeração do sêmen de 30°C a 0°C foi alterado, anteriormente utilizado 3 horas, passou para 1 hora permanecendo a 4°C. Vários autores relatam diferentes períodos de refrigeração, portanto não há uma padronização quanto ao tempo ideal necessário para garantir o mínimo de dano a membrana espermática, muitos utilizam uma hora (Paulenz et al., 2002) e duas horas (Bag et al., 2002), no entanto acreditamos que a metabolização do sêmen refrigerado em três horas é pertinente.

Com o intuito de averiguar a integridade da membrana junto às substâncias presentes no diluidor, foi alterado a composição do GGL, a quantidade de gema de ovo presente no diluidor foi alterada para 5%, visto que a gema de ovo é considerada composição crioprotetora, preservando a integridade da membrana, atuando como protetor osmótico (Gil et al., 2003). Segundo Monreal et al. (2014), a utilização de gema de ovo em 20% e 10% de glicerol em leite de vaca apresentaram resultados significativos aos parâmetros de motilidade e vigor no processo de criopreservação, o que neste experimento não foi satisfatório com leite de cabra.

De acordo com Roncoletta et al. (1999), a congelabilidade do sêmen é influenciada pelo indivíduo em si, alguns animais não apresentam características de

congelação de sêmen, entretanto todos os ejaculados dos cinco animais foram insatisfatórios após a descongelação, mostrando que isso provavelmente não tenha ocorrido. Em virtude dos diferentes fatores que envolvem o processo de congelação, os danos causados por este a célula espermática, não podem ser resolvidos isoladamente (Frazão-Sobrinho et al., 2014). Gomes et al. (2009) relatam que o equilíbrio entre o tempo de resfriamento, a temperatura e o diluidor a ser utilizado no processo de congelação em que o sêmen é submetido, corresponde ao aumento dos índices de motilidade e vigor após o processo de descongelação. Portanto podemos sugerir que o leite de cabra tenha prejudicado o material biológico.

O uso do complexo homeopático na 12CH em diluidor padrão para a congelação de sêmen ovino não melhorou a criopreservação do sêmen com GGL à base de leite de cabra. Mais estudos são necessários para investigar o componente do diluidor utilizado e sua relação com a homeopatia e suas dinamizações.

Agradecimento

Agradecemos ao CNPq pelo apoio financeiro à pesquisa.

Declaração: Os autores declaram estar cientes e terem atendido integralmente às normas preconizadas para as pesquisas experimentais de acordo com a Declaração Universal do Direito dos Animais. Os autores declaram ainda ausência de conflito de interesse.

5. Referências

- Bag S, Joshi A, Naqvi SM, Rawat PS, Mittal JP. Effect of freezing temperature, at which strwas were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 72, 175-183, 2002.
- Bittencourt RF, Oba E, Filho ALR, Chalhoub M, Azevedo HC, Bicudo SD. Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: diluidores e crioprotetores. *Ciência Animal Brasileira*, 14, 522-536, 2013.
- Borges JC, Silva MR, Guimarães JD, Esper CR, Franceschini PH. Plasmatic membrane of bovine spermatozoa: effect of the species oxygen reactive, antioxidant and cryopreservation. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 35, 303-314

- 2011.
- Câmara DR, Guerra MMP. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 35, 33-40, 2011.
- Colégio brasileiro de reprodução animal - CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3ed. Belo Horizonte, Brasil: CBRA, 2013.
- Evans G, Maxwell WMC. *Inseminación Artificial de Ovejas y Cabras*. 4ed. Zaragoza, España: Acribia, S. A. 1990.
- Frazão Sobrinho JM, Castelo-Branco MA, Sousa Júnior A, Nascimento IMR, Mota LHCM, Carvalho YNT, Ferreira SB, Costa DNM, Moraes júnior FJ, Souza JAT. Characteristics of the semen of Dorper, Santa Ines and undefined breed sheep, pre-and post-freezing, in the rainy and dry period. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 66, 969-976, 2014.
- Garner DL, Pinkel D, Johnson LA, Pace MM. Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biology and Reproduction*, 34, 127-138, 1986.
- Gil J, Lundeheim N, Söderquist L, Rodriúez-Martínez H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*, 59, 1241-1255, 2003.
- Gillan L, Maxwell WM, Evans G. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. *Reproduction, fertility, and development*, 16, 447-454, 2004.
- Gomes PLNS, Lipinski LC, Pereira RJTA. Avaliação da necessidade do tempo de equilíbrio no congelamento de sêmen caprino. *Ciência Animal Brasileira*, Suplemento 1, 2009, Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria.
- Gonzalez CIM. Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino, 1996 [Tese de Doutorado]. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu/SP.
- Lathoud JA. *Estudos de matéria médica homeopática*. 3ed. São Paulo, Brasil: Organon, 2010.
- Lima LF, Alves AMCV, Rocha RMP, Celestino JJH, Bruno JB, Rodrigues APR, Figueiredo JR. Homeopathy as an alternative in the treatment of reproductive disorders. *Ciência Animal Brasileira*, 22, 25-43, 2012.
- Monreal ACD, Schmid RF, De Paula JGS, Urt MAG, Souza AS. Diluentes para sêmen de carneiros nativos de Mato Grosso do Sul. *Agrarian*, 5, 281-287, 2012.
- Monreal ACD, Lima NN, De Souza AS, Souza MIL, Caramalac SM, Caramalac SM, Urt MAG. Glycine Yolk Milk for crossbred rams semen cryopreservation. *Agrarian*, 7, 124-131, 2014.
- Moura A, Deschamps JC, Moraes JCF. Efeito da concentração e temperatura de adição de trealose em diluentes para a congelamento de sêmen ovino em palhetas. *Ciência Rural*, 25, 105-109, 1995.
- Moura PP. Caracterização bidimensional de proteínas do plasma seminal como subsídio para incremento da eficácia da inseminação artificial com sêmen congelado em ovinos, 2009 [Dissertação de Mestrado]. Universidade de Brasília. Brasília/DF.
- Paulenz H, Soderquist L, Pérez-Pé R, Berq KA. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*, 57, 823-836, 2002.
- Roncoletta M, Franceschini PH, Lima VFMH, Rodrigues LH, Oliveira MA, Silva C. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça gir. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 36, 2, 1999.
- Silva SV, Guerra MPP. Cryopreservation effects on sperm cells and alternatives for crioinjury reduction. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 35, 370-384, 2011.
- Soto FRM, Vuaden ER, Coelho CP, Bonamin LV, Azevedo SS, Benites NR, Visintin JA, Barros FRO, Goissis MD, Assumpção MEOD, Marques MG. Reproductive performance of sows inseminated with diluted semen treated with homeopathic medicine. *International Journal of High Dilution Research*, 9, 51-57, 2010.
- Tonieto RA, Goularte KL, Gastal GDA, Schiavon RS, Deschamps JC, Lucia Jr T. Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. *Small Ruminant Research*, 93, 206-209, 2010.
- Vijnovsky, B. *Tratado de matéria médica homeopática*. São Paulo, Brasil: Organon, 2010.

Editor Associado: Rodrigo Juliano Oliveira