

PLASMA SEMINAL SUÍNO COMO ADITIVO PARA DILUENTE DE CONGELAMENTO DE SEMEN OVINO

KAUÊ RODRIGUEZ MARTINS^{1,2}; STELA MARI MENEGHELLO GHELLER²;
GEORGIA DA CRUZ TAVARES²; ANDRES VIEIRA MACHADO²; PEDRO SICA
CRUZEIRO²; THOMAZ LUCIA JR. ^{2,3}

¹Universidade Federal de Pelotas – kauerodriguez@gmail.com

²ReproPEL - Universidade Federal de Pelotas – stelagheller@hotmail.com;
georgiadacruz.tavares@gmail.com; andresmachado@zootecnista.com.br;
pedrocruzeiro@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – Faculdade de Veterinária – tluciajr@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O ganho reprodutivo é muito mais expressivo quando se maximiza o aproveitamento de machos superiores mediante a criopreservação de seu sêmen, além de incrementar o uso da IA nos sistemas de exploração ovina (SALAMON & MAXWELL, 2000).

A criopreservação tem como princípio básico a redução da temperatura como forma de reduzir o metabolismo celular, permitindo que as células ou os tecidos sejam conservados por períodos indeterminados em nitrogênio líquido, com posterior retomada do desenvolvimento celular normal após o descongelamento (PEGG, 2007). Um dos efeitos mais significativos da criopreservação é a formação natural de cristais de gelo, a partir da água existente nos espaços intra e extracelulares. À medida que estes cristais vão se formando, eles assumem formas e tamanhos irregulares, podendo afetar as microestruturas de membranas e organelas, comprometendo a função celular (FAHY, 1987), sendo a membrana plasmática a primeira estrutura a ser afetada (BARRIOS et al., 2000).

Ainda que o congelamento do sêmen contribua significativamente para a IA, o sêmen ovino possui uma sensibilidade inerente ao processo de criopreservação, o que resulta em baixos níveis de prenhes em IA cervicais (SALAMON & MAXWELL, 2000). Um dos problemas existentes na criopreservação é o dano causado pela diluição excessiva (LEAHY & DE GRAAF, 2012), realizada anteriormente ao congelamento, que resulta muitas vezes em redução na motilidade, na atividade metabólica e no potencial de fertilização (LEAHY e DE GRAAF, 2012).

Uma alternativa para evitar o efeito da diluição, aumentando a qualidade seminal pós-descongelamento do sêmen ovino seria a adição de plasma seminal (PS) (MAXWELL & JOHNSON, 1999). O PS beneficia a sobrevivência dos espermatozoides, aumentando sua resistência ao choque térmico e revertendo a criocapacitação (CROSS, 1993). Porém, existe certa relutância em utilizar o PS, o qual é considerado, de forma conservadora, somente como um veículo para os espermatozoides, ou até mesmo deletério para o armazenamento (RODRIGUEZ-MARTINEZ & BARTH, 2007). O objetivo deste estudo foi testar a adição de 20% de PS ovino e suíno ao diluente do sêmen ovino criopreservado sobre os parâmetros seminais de motilidade, integridade de acrossoma, funcionalidade de mitocôndria pós-descongelamento.

2. METODOLOGIA

Ejaculados de quatro carneiros da raça crioula lanada com 72 meses de idade foram coletados pelo método da vagina artificial durante os meses de julho e setembro totalizando nove coletas. Três machos suínos híbridos foram coletados pelo método da mão enluvada (BEARDEN & FUQUAY, 1997), concomitantemente com as amostras dos machos ovinos. As amostras foram processadas através de centrifugação a 12000 rpm por 10 min para a separação de células do plasma seminal. Foram formados pools com as amostras de cada espécie e congelados a -20°C até o início da criopreservação. Seis coletas dos quatro machos ovinos foram realizadas e diluídas em Tris-gema de ovo-glicerol, para congelamento, compondo três tratamentos: controle (sem PS); inclusão de 20% de PS ovino; e inclusão de 20% PS suíno.

Após a determinação da concentração espermática em câmara de Neubauer, procedeu-se a diluição final do sêmen em volume suficiente para obter uma concentração de 50×10^6 células por palheta de 0,25 mL. Após o envase, as palhetas de todos os tratamentos foram mantidas em caixa condicionadora, para resfriamento a $0,3-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 5°C . Após estabilização por 90 min a 5°C , as palhetas foram resfriadas a -79°C em vapor de nitrogênio por 10 min, antes de serem submersas em nitrogênio líquido, onde permaneceram armazenadas até o momento do descongelamento.

Em cada rotina de congelamento, uma palheta de cada tratamento foi descongelada em banho-maria a 37°C durante 30 seg (MAXWELL et al., 1999). Após a homogeneização do conteúdo da palheta em um microtubo cônico (1,5 ml), foram realizadas as avaliações, com diluição em 1,5 mL de solução de 2,94% de citrato de sódio, em condições isotérmicas, para realização de um teste de termo resistência a 37°C durante 5 h (BAG et al., 2004). Após o descongelamento, as amostras foram submetidas a um teste de termo resistência durante cinco horas. Avaliações de qualidade espermática (motilidade, integridade de acrossoma e função mitocondrial) foram realizadas após o descongelamento segundo KAWAMOTO, (1999) e EVENSON, (2002).

Os dados foram analisados com o programa Statistix®, 2008. Os dados foram avaliados pelo teste de Shapiro-Wilk. Porém, como nenhuma das respostas de interesse apresentou distribuição normal e os dados foram submetidos à transformação arco-seno. As comparações entre médias foram realizadas pelo teste de Tuckey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até então, não haviam relatos de experimentos utilizando o PS suíno como aditivo para diluente de sêmen ovino. A adição do PS ovino e suíno foi associada com aumento na integridade de acrossoma pós-descongelamento do sêmen ovino criopreservado ($P < 0,05$), porém sem diferença quanto a função mitocondrial. Apesar da composição o PS suíno incluir mais de 90% de espermadesinas (ROMERO et al., 1997), que apresentam efeitos na capacitação, somente obteve-se resultado positivo quanto a integridade de acrossoma, provavelmente devido a presença de proteínas homólogas, identificada no PS ovino no estudo de BARRIOS et al., (2005) e CARDOZO et al., (2008) e confirmada a presença no PS suíno no estudo de DRUART et al., (2013). Apesar da homologia de 22% de proteínas do PS encontradas por Druart et al., (2013), não parece suficiente para se assemelhar ao efeito do PS ovino. A adição do PS ao sêmen pode ser uma alternativa para evitar os danos causados pelo resfriamento e efeitos da diluição, assim aumentando parâmetros de capacitação, motilidade e reversão do choque térmico. Porém, ainda não se conhecem todas

as propriedades apresentadas pelas proteínas do PS, nem sua interação com espermatozoides de outras espécies. Portanto, ainda é necessário identificar e purificar proteínas que beneficiem o congelamento para serem posteriormente adicionadas a diluentes e crioprotetores ou durante o momento de incubação.

Tabela 1: Qualidade do sêmen ovino pós-descongelamento em função da inclusão de plasma seminal (PS) de diferentes espécies na hora 0

Variável (%)	Tratamento		
	Controle	PS ovino	PS suíno
Motilidade	30,0 ± 2,0 ^{ab}	30,4 ± 2,0 ^a	24,6 ± 2,0 ^b
Integridade do acrossoma	46,7 ± 3,5 ^b	56,7 ± 3,5 ^a	59,5 ± 3,5 ^a
Função mitocondrial	70,0 ± 1,7 ^a	61,8 ± 1,7 ^b	63,6 ± 1,7 ^b

^{a,b} Médias ± EPM com expoentes distintos demonstram diferença significativa entre os tratamentos nas linhas (P<0,05).

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que, apesar da semelhança de 22% das proteínas entre os PS suíno e ovino, a adição de 20% de PS suíno ao diluente do sêmen criopreservado ovino afetou positivamente o parâmetro de integridade de acrossoma, porém os demais parâmetros seminais de fertilidade não foram afetados positivamente no pós-descongelamento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAG, S.; JOSHI, A.; MITTAL, J. F. Effect of post-thaw incubation on sperm kinematics and acrossomal integrity of ram spermatozoa cryopreserved in medium-sized French straws. **Theriogenology**, v. 62, p.415-24, 2004.
- BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGO, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIAN-PEREZ, J. A. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1531–7, 2000.
- BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J. W. Semen collection, in: H.J. Bearden, J.W. Fuquay (Ed.), Applied Animal Reproduction, 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall, p. 147-157, 1997.
- CARDOZO, J. A; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Identification of RSVP14 and RSVP20 components by two-dimensional electrophoresis and western-blotting. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p.15–21, 2008.
- CROSS, N. L. Multiple effects of seminal plasma on the acrossome reaction of human sperm. **Molecular Reproduction Development**, v. 35, p. 316-323, 1993.
- DE GRAAF S.P.; BEILBY, K.H.; UNDERWOOD, S.L.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Sperm sexing in sheep and cattle: The exception and the rule. **Theriogenology**, v. 71, p. 89-97, 2009.

EVENSON, D.P.; LARSON, K. L.; JOST, L. K. Sperm chromatin structure assay: Its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. **Journal of Andrology**, v.23, p.25-43, 2002.

DRUART, X.; RICKARD, J.P.; MACTIER, S.; KOHNKE, P.L.; KERSHAW-YOUNG, C.M.; BATHGATE, R.; GIBB, Z.; B. CROSSETT, B.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; HARICHAUX, G.; GRUPEN, C.G.; DE GRAAF, S.P. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma, **Journal of Proteomics**, v. 91, p. 13-22, 2013.

FAHY, G.M. Cryoprotectant toxicity neutralizers reduce freezing damage. **Cryo Letters**, v. 4, p. 309-314, 1983.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, p. 481–487, 1997.

GILLAN, L.; MAXWELL, W.M.C; EVANS, G. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.447-454, 2004.

KAWAMOTO, A.; KAZUTOMO, O.; KISHIKAWA, H.; ZHU, L.; AZUMA, C.; MURATA, Y. Two-color fluorescent staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrosomal status. **Fertility and Sterility**, 71, 497-501, 1999.

LEAHY, T.; DE GRAAF, S.P. seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 207–213, 2012.

MAXWELL, W. M. C.; JHONSON, L. A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal Plasma. **Theriogenology**, v.52, p.1353-1362, 1999.

PEGG, D. E. 2007. Cryopreservation and freeze-drying protocols methods. In: **Molecular Biology**. 2nd Ed. Totowa: Humana Press Inc., 348 p.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; BARTH, A.D. In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v.6, p.39-54, 2007.

ROMERO, A.; ROMAO, M. J; VARELA, P.F.; KOLLN, I., DIAS JM, CARVALHO, A. L.; SANZ, L.; TÖPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J. J. The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. **Nature Structural Biology**, v.4, p.783–788, 1997.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p .77-111, 2000.

Statistix®. Statistix 9 analytical software. Tallahassee, Florida, USA. 2008.