

EFEITO DA ADIÇÃO DE GOMA XANTANA AO DILUENTE DE RESFRIAMENTO DE SÊMEN EQUINO SOBRE A FUNCIONALIDADE MITOCONDRIAL

STELA MARI MENEGHELLO GHELLER¹; FERNANDA CARLINI CUNHA DOS SANTOS¹; GEÓRGIA DA CRUZ TAVARES¹; VITÓRIA GASPERIN GUAZZELLI COSTA¹; CARINE DAHL CORCINI¹; ANTONIO SERGIO VARELA JUNIOR²

¹ ReproPEL - Universidade Federal de Pelotas/ UFPEL- stelagheller@hotmail.com
carlini@portoweb.com.br; georgiadacruz.tavares@gmail.com; vitoria.guazzelli@hotmail.com;
corcnicd@gmail.com

²Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Rio Grande/ FURG-
varelajras@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

As biotecnologias da reprodução são importantes ferramentas para melhoramento genético. Considerando as principais vantagens da inseminação artificial, esta é a biotecnologia com maior impacto na criação de equinos, proporcionando um reprodutor produzir centenas de descendentes ao longo de sua vida reprodutiva (CANISSO et.al. 2008).

A maneira mais comumente utilizada para armazenamento e transporte das doses inseminantes nesta espécie é mediante o resfriamento a temperatura de 5°C, resultando em diminuição no metabolismo celular e prolongando o período de viabilidade espermática (LOOMIS, 2006).

Os diluentes seminais têm como principais funções aumentar o volume do total do ejaculado, fornecer nutrientes para a produção de energia, proteger os espermatozoides contra choque térmico, reduzir a flutuação de pH, manter o balanço osmótico e inibir o desenvolvimento bacteriano (JOHNSON et al., 2000). Neste contexto, a busca por diluentes que forneçam a célula espermática condições favoráveis para seu uso após acondicionamento é incessante, com intuito de atuar na redução dos danos resultantes da refrigeração.

Dentre estas alternativas o biopolímero xantana, produzido pela *Xanthomonas campestris* e comumente utilizada na indústria alimentícia, apresenta como principal propriedade a manutenção da viscosidade na presença de sais e estabilidade em uma ampla faixa de temperatura (GASTAL et al., 2012). A hipótese deste trabalho é que a xantana atue na célula espermática prevenindo flutuações do ph, pois evita sedimentação celular, com isso auxiliando na manutenção da integridade e funcionalidade de membranas celulares.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da goma xantana ao diluente para resfriamento de sêmen equino sobre os parâmetros de funcionalidade mitocondrial e motilidade espermática.

2. METODOLOGIA

Foram coletados 20 ejaculados de 5 garanhões da raça Crioula e Quarto de Milha (4 repetições por animal). As coletas foram realizadas após 2 dias de repouso sexual, com auxílio de vagina artificial (modelo Hannover, Minitub®) e uma égua em estro contido por peias.

Cada ejaculado foi adicionado de diluente Kenney (1975) até a concentração

final de 50×10^6 espermatozoides por mL. Em seguida, este material foi submetido a cinco tratamentos: controle, somente diluente Kenney (T1) e Kenney + goma xantana nas concentrações 0,01% (T2), 0,12% (T3) e 0,25% (T4).

As amostras seminais foram mantidas resfriadas a 5°C em geladeira comercial (Minitub®). As avaliações espermáticas incluíram motilidade e integridade de mitocôndria, sendo realizadas as 0, 24, 48 e 72hs durante o resfriamento a 5°C.

A motilidade foi determinada pelo percentual de células móveis em movimento progressivo, identificadas no campo do microscópio, em aumento de 200x (BEARDEN & FUQUAY, 1997) com escala de motilidade 0 – 100% (CBRA, 2013). A funcionalidade mitocondrial foi avaliada com o uso de uma sonda específica, Rodamina 123 (Rh123), juntamente com iodeto de propídio, sendo considerada célula com mitocôndria funcional as que emitiam coloração verde e células afuncionais aquelas com mitocôndria vermelha (GARNER et al., 1997). Antes das análises, as amostras foram aquecidas em banho maria por 5 min por 37°C.

As análises estatísticas foram conduzidas através do *software* Statistix 8.0® (2003), incluindo análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A motilidade espermática decresceu significativamente em todos os tratamentos conforme o aumento do período de resfriamento (Tabela 1).

Tabela 1. Percentual de motilidade (média \pm erro padrão da média) de sêmen equino refrigerado por 72 horas a 5°C em diluente acrescido de xantana.

	T1	T2	T3	T4
Horas	Controle	0,01%	0,12%	0,25%
0	85 \pm 1 ^{Aa}	85 \pm 1 ^{Aa}	85 \pm 1 ^{Aa}	85 \pm 1 ^{Aa}
24	60.5 \pm 1.6 ^{ABb}	63.6 \pm 2.5 ^{Aa}	51.5 \pm 2 ^{BCb}	44.7 \pm 2.6 ^{Cb}
48	43.6 \pm 2.6 ^{Abc}	41 \pm 2.1 ^{Ab}	33.6 \pm 2.4 ^{ABbc}	25.2 \pm 2.2 ^{Bbc}
72	26.8 \pm 3.1 ^{Ac}	23.1 \pm 2.9 ^{ABb}	18.2 \pm 2.5 ^{ABc}	23.3 \pm 2.4 ^{Bc}

^{a,b,c} Letras distintas indicam diferença significativa nas colunas

^{A,B} Letras distintas indicam diferença significativa nas linhas

Na análise de funcionalidade de mitocôndria não foi observado diferença significativa entre os tratamentos em nenhum momento avaliado (Tabela 2).

Tabela 2. Percentual de funcionalidade de mitocôndria (média \pm erro padrão da média) de sêmen equino refrigerado por 72 horas a 5°C em diluente acrescido de xantana.

	T1	T2	T3	T4
Horas	Controle	0,01%	0,12%	0,25%
0	76.6 \pm 1.5 ^{Aa}	76.6 \pm 1.5 ^{Aa}	76.6 \pm 1.5 ^{Aa}	76.6 \pm 1.5 ^{Aa}
24	74.6 \pm 2.5 ^{Aa}	70.9 \pm 3.9 ^{Aab}	69.7 \pm 3.2 ^{Aab}	70.3 \pm 3.2 ^{Aab}
48	63 \pm 3.6 ^{Aab}	63.1 \pm 2.4 ^{Abc}	64.7 \pm 3.4 ^{Aab}	60 \pm 2.5 ^{Abc}
72	50.4 \pm 3.1 ^{Ab}	50.8 \pm 4.1 ^{Ac}	51.8 \pm 4.9 ^{Ab}	43.6 \pm 5 ^{Ac}

^{a,b,c} Letras distintas indicam diferença significativa nas colunas

^{A,B} Letras distintas indicam diferença significativa nas linhas

Frente aos resultados, a adição de xantana ao diluente seminal não apresentou efeito benéfico em relação a manutenção dos parâmetros funcionalidade mitocondrial e motilidade espermática

A motilidade descreceu nos tratamentos adicionados de xantana quando comparado ao controle, sendo esse um parâmetro relevante para a deslocamento dos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea para alcançar o ovócito (POPWELL & FLOWERS, 2004). Esta diminuição de motilidade está atribuída a ação de viscosidade que a xantana produz nas soluções, que não se altera com a temperatura entre 4 e 93°C (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000). Deste modo, quando incubado a 37°C, as propriedades da goma foram mantidas contribuindo para a imobilização das células e conseqüentemente para a diminuição da motilidade.

A integridade e a funcionalidade mitocondrial têm relação direta com a motilidade espermática (RODRIGUES-MARTINEZ, 2005), tendo em vista que a principal função é a produção do ATP celular - matriz energética para os batimentos flagelares responsáveis pelo deslocamento das células espermáticas no trato reprodutivo da fêmea para o local de fecundação. No presente experimento não foi observado diferença significativa entre os tratamentos com e sem xantana. Esses dados corroboram com os descritos por GASTAL, *et al.* 2012, em relação a adição deste polímero no congelamento de sêmen ovino.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho os resultados demonstraram que a adição da goma xantana não auxilio na manutenção dos parâmetros de funcionalidade mitocondrial e motilidade espermática.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Semen evaluation. In: **Applied Animal Reproduction**, 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall. p.159-170, 1997.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual Para Exame Andrológico de Sêmen Animal**. 2 Ed. Belo Horizonte: p. 25-27, 2013.

DARENIUS, A. Experience with chilled, transported equine semen. In: **Stallion Reproduction Symposium**. Society for Theriogenology – American Association of Equine Practitioners. p. 60-70, 1998.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; CASAS, J.A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: Production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, 18, 549-579, 2000.

GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; JOERG, H.W. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, Champaign, n. 57, p. 1401-1406, 1997.

GASTAL, Gustavo Desire Antunes. **Xantana como aditivo crioprotetor no congelamento de sêmen ovino**. 2012. 38f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

JOHNSON, L.A; WEITZE, K.F; FISER, P; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.143-172, 2000.

LOOMIS, P. R. Advanced methods for handling and preparation of stallion Semen. **Veterinary Clinics North American Equine Practice**, v. 22, n. 3, p. 663-676, 2006.

POPWELL, J.M.; FLOWERS, W.L. Variability in relationships between semen quality and estimates of in vivo and in vitro fertility in boars. **Animal Reproduction Science**. V.81, p.97–113. 2004.

RODRIGUEZ, M. H. Methods for semen evaluation and their relationship to fertility. **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 16, 2005, Goiânia, GO.