

AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE MEMBRANAS EM CÉLULAS ESPERMÁTICAS OVINAS CRIOPRESERVADAS COM ADIÇÃO DE PLASMA SEMINAL HOMÓLOGO E HETERÓLOGO

ANDRES VIEIRA MACHADO¹; MARIAH DA SILVEIRA SCHUCH²; KAUÊ RODRIGUEZ MARTINS²; GÉORGIA DA CRUZ TAVARES²; MONIKE QUIRINO DOS SANTOS²; THOMAZ LUCIA JR³

¹Universidade Federal de Pelotas – UFPel - andresmachado@zootecnista.com.br

²ReproPel – Faculdade de Veterinária – UFPel

³Universidade Federal de Pelotas - UFPel orientador - tluciajr@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O processamento do sêmen para utilização na inseminação artificial (IA) pode ser realizado de diferentes formas: in natura, diluído, diluído transportado, diluído resfriado transportado e congelado (criopreservado). Cada um dos tipos de tecnologia de processamento tem suas vantagens, limitações e indicações (CARVALHO, 1992), sendo o sêmen o que permite maior flexibilidade de uso. Um dos efeitos mais significativos da criopreservação é a formação natural de cristais de gelo, e 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).

A baixa fertilidade do sêmen ovino criopreservado é atribuída, em grande parte, às alterações sofridas na estrutura das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial durante o resfriamento, congelação e descongelação (PARKS & GRAHAM, 1992). Outro problema existente na criopreservação é o dano causado pela diluição excessiva, realizada anteriormente ao congelamento, que resulta muitas vezes em redução na motilidade, na atividade metabólica e no potencial de fertilização (LEHAY & 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). A interação de proteínas do plasma seminal com o espermatozoide pode influenciar na sua capacidade fertilizante e proteção da membrana espermática ao choque térmico (BARRIOS et al., 2000). Já foram usados como aditivos protetores dos espermatozoides ovinos descongelados, PS de equino (MARTINS et al., 2013), bovino (OLLERO et al., 2007) e canino (MATAVÉIA et al., 2010). Entretanto, até o momento não existem relatos do uso de PS suíno como aditivo protetor do espermatozoide ovino, apesar de haver certa homologia (em torno de 22%) entre as proteínas do PS das duas espécies (DRUART et al., 2013). O objetivo deste estudo é testar a adição de 20% de PS suíno ao diluente do sêmen ovino criopreservado a fim de avaliar a motilidade e integridade de membrana *in vitro* pós-descongelamento.

2. METODOLOGIA

Quatro carneiros da raça Crioula lanada com idade em torno de 72 meses foram usados como doadores de sêmen e PS ovino. Ejaculados foram colhidos no período de julho a setembro pelo método da vagina artificial, durante nove semanas.

Os ejaculados foram encaminhados para o laboratório em uma caixa térmica a 37°C, para a determinação da motilidade espermática. Somente foram processados os ejaculados com motilidade $\geq 70\%$ e vigor \geq a três (escala de 1-5). Os ejaculados foram submetidos a duas seções de centrifugação a 12.500 x g por 10 min, em centrífuga refrigerada (4°C). Após o processamento de cada amostra, estas foram congeladas a -20°C. Após acumular nove rotinas de coleta, totalizando 36 amostras, procedeu-se o descongelamento das alíquotas e a constituição de um pool, que foi fracionado e mantido congelado a -20°C até o momento do uso.

Imediatamente após as coletas (n = 6), foram obtidas amostras para determinação da concentração espermática, enquanto que o restante do ejaculado foi diluído na proporção 1:1 com Tris-gema-glicerol (Evans & Maxwell, 1987). Foram constituídos três tratamentos de congelamento de sêmen ovino: sem adição de PS (controle); com adição de 20% de PS ovino; e com adição de 20% de PS suíno. Antes do congelamento, foram avaliados: motilidade e vigor (microscopia óptica) e integridade da membrana (por microscopia de epifluorescência).

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°C/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 no Nitrogênio líquido, onde permaneceram armazenadas até o momento do descongelamento. Realizou-se a análise de motilidade e integridade de membrana no 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 dos testes de motilidade e integridade de membrana.

A avaliação da motilidade e do vigor espermático foi realizada sempre pelo mesmo técnico, em um microscópio equipado com mesa térmica a 37°C (HT 50, Minitub, GE). As amostras foram colocadas entre lâmina e lamínula e visualizadas sob um aumento de 200 X. A integridade da membrana espermática foi avaliada através das sondas fluorescentes Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídio (IP), seguindo protocolo de HARRISON & VICKERS, 1990.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tanto as análises de motilidade, quanto as de integridade de membrana não demonstraram diferença estatística entre o tratamento controle e os tratamentos com adição de 20% de PS ovino e PS suíno ($P < 0,05$), entretanto, houve diferença entre os tratamentos PS ovino e PS suíno, sendo o PS suíno inferior ao ovino ($P < 0,05$).

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 de membrana	37,5 ± 2,6 ^{ab}	40,9 ± 2,6 ^a	31,4 ± 2,6 ^b

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

Os dados obtidos com o PS ovino corroboram estudos anteriores, que demonstram a eficiência da adição do PS ovino com o intuito de recuperar, diminuir ou frear o efeito do congelamento em células criopreservadas (BARRIOS et al., 2000). Neste estudo a semelhança entre o comportamento dos tratamentos em relação ao controle, mostra que o sêmen se manteve dentro dos parâmetros preconizados para sêmen criopreservado, podendo ser utilizado na prática. A composição do PS suíno inclui mais de 90% de espermidinas (ROMERO et al., 1997), que apresentam efeitos na capacitação. Além disso, existem proteínas homólogas, identificadas no PS ovino no estudo de BARRIOS et al., (2005) e confirmadas as presenças no PS suíno no estudo de DRUART et al., (2013). Mesmo que exista homologia de 22% de proteínas do PS suíno (DRUART et al., 2013), não parece suficiente para se assemelhar ao efeito do PS ovino. Porém, ainda não se conhecem todas as propriedades apresentadas pelas proteínas do PS, nem sua interação com espermatozoides de outras espécies.

4. CONCLUSÃO

Pode-se concluir baseado nos parâmetros avaliados que a adição de plasma seminal homólogo e heterólogo não causaram efeitos negativos sobre as células espermáticas após o descongelamento, sendo o PS ovino o que causou efeitos aparentemente positivos, podendo ser incluídos ao diluente pré-congelamento de sêmen ovino.

5. REFERÊNCIAS

BARRIOS, B.; FERNANDEZ-JUAN, M.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIAN-PEREZ, J.Á.; Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. **Journal of Andrology**, 26, 539–549, 2005

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.

CARVALHO, G. R. Fertility of the diluted equine semen, Cold to 20°C and transported. 1992. 87 f. Thesis (Magister Scientiae) – Department of Animal Science Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 1992.

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.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C.; Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Sidney: Butterworths, 1987. 194 p.

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

LEHAY, T.; MARTI, J.I.; EVANS G, MAXWELL.; W.M.C; Seasonal variation in the protective effect of seminal plasma on frozen–thawed ram spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, 119, 147–153, 2010.

MARTINS, L.T.; SANTOS NETO, P.C.; GAUDÊNCIO NETO, S.; VIEIRA, F.K.; RIBEIRO, E.S.; MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A.D. Equine seminal plasma on preserving the viability of frozen-thawed ram sperm. **Animal Reproduction**, v. 10, p.697-703, 2013.

MATAVÉIA, .GA.; TERBLANCHE, S.J.; NOTHLING, J.O.; GERBER, D.; Effect of heterologous seminal plasma and semen extenders on motility of frozen–thawed ram spermatozoa. **Journal of the South African Veterinary Association**, 139–142, 2010.

MAXWELL, W.M.C, Jhonson LA, 1999: Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal Plasma. **Theriogenology**, 52, 1353-1362
MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 63, n. 9, p. 2372-2381, 2005.

OLLERO, M., GARCÍA LOPÉZ, N.; PÉREZ, R.; CEBRIAN, J.A.; Muiño-Blanco T.; Surface changes of RAM spermatozoa by adsorption of homologous and heterologous seminal plasma proteins revealed by partition in an aqueous two-phase system. **Reproduction, Fertility and Development**, 9, 381-390, 1997.

PARKS, J.E., GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.

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