

INCLUSÃO DE BIOPOLÍMERO COMO CRIOPROTETOR EXTERNO EM UM DILUENTE PARA SÊMEN OVINO CONGELADO

GUILHERME RIZZOTO¹; GUSTAVO DESIRE ANTUNES GASTAL²; ESTELA F. SILVA²; TAINÃ F. CARDOSO²; BRUNA MION¹; THOMAZ LUCIA Jr.^{1*}

¹ REPROPel, Faculdade de Veterinária, ² Centro de Desenvolvimento Tecnológico Universidade Federal de Pelotas, CEP 96010-900 - Pelotas/RS.

*E-mail: tomjr2004@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Durante o processo de congelamento e descongelamento do sêmen ovino ocorrem danos estruturais, bioquímicos e funcionais em grande parte das células espermáticas (SALAMON & MAXWELL, 1995). Com o intuito de minimizar tais problemas, diferentes aditivos crioprotetores têm sido testados para preservar a integridade e a funcionalidade espermática pós-descongelamento (SCHMEHL et al., 1986; SALAMON & MAXWELL, 1994; TONIETO et al., 2010; JAFAROGHLI et al., 2011).

Diferentemente de outros polímeros utilizados para a criopreservação de gametas, a goma xantana é um biopolímero produzido pela *Xanthomonas campestris* e apresenta como principais propriedades, a manutenção da viscosidade na presença de sais e a estabilidade em uma ampla faixa de temperatura (GARCÍA-OCHOA et al., 2000). Seu alto peso molecular pode contribuir na dinâmica de formação de cristais de gelo no meio diluente, favorecendo a preservação da viabilidade espermática pós-descongelamento.

Este trabalho objetivou determinar o efeito da adição da goma xantana ao meio diluidor na criopreservação de sêmen ovino.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados sete carneiros como doadores de sêmen. As coletas de sêmen foram realizadas duas vezes por semana, através de vagina artificial, totalizando 8 coletas por carneiro. Somente foram processados ejaculados que apresentassem, após a coleta, motilidade maior ou igual a 70%, vigor maior ou igual a 3 e concentração maior ou igual a $2,0 \times 10^9$ espermatozoides móveis/ml.

A constituição do diluente utilizado foi conforme descrito por Evans & Maxwell (1987) com base em tris-gema-glicerol (TGC). A goma xantana foi adicionada ao meio-base, para obtenção de concentrações finais de 0,15%, 0,20% e 0,25% do biopolímero no diluente.

Os tratamentos foram: Tris-gema-glicerol (TGC), controle sem adição de xantana; Tris-gema-glicerol com 0,15% de xantana (TGX15); Tris-gema-glicerol com 0,20% de xantana (TGX20); e Tris-gema-glicerol com 0,25% de goma xantana (TGX25). Para cada tratamento, foram congeladas 8 palhetas de 0,25 ml, com concentração final de $0,1 \times 10^9$ espermatozoides móveis/palheta.

Antes do início da curva de congelamento e após o descongelamento, foi analisada a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides e do acrossoma, conforme descrito por Harrison & Vickers (1990) e Kawamoto et al., (1999), respectivamente.

O congelamento foi realizado no equipamento automatizado TK 3000®. Após a curva de congelamento, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido a temperatura de -196°C para armazenamento. O descongelamento de duas palhetas de cada tratamento e de cada carneiro foi realizado em banho-maria a 36°C, durante 30 s, para avaliação dos parâmetros de qualidade seminal citados acima. Todas as análises estatísticas foram conduzidas com o programa Statistix® (2008).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi observada diferença ($P > 0,05$) em função dos tratamentos utilizados antes do processo de congelamento (Tabela 1) e após o descongelamento (Tabela 2), sobre a integridade da membrana e do acrossoma.

Tabela 1: Integridade da membrana e do acrossoma, antes do congelamento de sêmen ovino com diluente incluindo diferentes concentrações de xantana*.

Tratamento	Integridade da membrana (%)	Integridade do acrossoma (%)
TGC	67,2 ± 2,8	49,6 ± 3,5
TGCX15	64,9 ± 2,2	51,4 ± 3,5
TGCX20	57,5 ± 2,7	51,5 ± 3,2
TGCX25	60,7 ± 2,5	54,3 ± 3,3

*Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre os tratamentos

TGC: Tris-gema-glicerol, controle sem adição de xantana;

TGCX15: Tris-gema-glicerol com 0,15% de xantana;

TGCX20: Tris-gema-glicerol com 0,20% de xantana;

TGCX25: Tris-gema-glicerol com 0,25% de goma xantana.

Tabela 2: Integridade da membrana e do acrossoma, após o descongelamento de sêmen ovino com diluente incluindo diferentes concentrações de xantana (médias ± EPM)*.

Tratamento	Integridade da membrana (%)	Integridade do acrossoma (%)
TGC	28,4 ± 2,5 ^a	46,4 ± 3,3 ^a
TGCX15	31,8 ± 2,6 ^a	47,5 ± 3,4 ^a
TGCX20	31,1 ± 2,3 ^a	45,0 ± 3,6 ^a
TGCX25	30,3 ± 2,1 ^a	40,7 ± 2,6 ^a

*Letras diferentes sobrescritas indicam diferença estatística ($P < 0,05$) nas colunas.

TGC: Tris-gema-glicerol, controle sem adição de xantana;

TGCX15: Tris-gema-glicerol com 0,15% de xantana;

TGCX20: Tris-gema-glicerol com 0,20% de xantana;

TGCX25: Tris-gema-glicerol com 0,25% de goma xantana.

Este é o primeiro estudo a avaliar o efeito da xantana como componente de diluente seminal com o objetivo de auxiliar no processo de congelamento. A partir da avaliação de parâmetros de qualidade espermática *in vitro*, observou-se que a adição de xantana ao meio diluidor não contribuiu para diminuir os danos causados pelo processo de congelamento, porém não causou danos estruturais aos espermatozoides. Estes parâmetros podem aferir sobre aspectos fisiológicos e

estruturais dos espermatozoides (LARSSON & RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2000), sendo que alguns estudos descreveram correlações entre estes parâmetros e a predição da fertilidade do macho (CORREA et al., 1997; FOOTE, 2003). Entretanto, O'MEARA et al. (2008), trabalhando com aproximadamente mil ovelhas inseminadas com diferentes carneiros, observaram que nenhum parâmetro de qualidade espermática *in vitro*, avaliado por métodos subjetivos ou por sistemas computadorizados (CASA), conseguiu prever a fertilidade. Logo, não podemos concluir efetivamente sobre o efeito da goma xantana sobre a capacidade de fertilização das células espermáticas.

Por outro lado, Hu et al. (2009) observou que altas concentrações do polissacarídeo *Gynostemma Pentaphyllum* são associadas com queda na integridade da membrana e do acrossoma pós-descongelamento, mas concentrações mais baixas foram benéficas e apresentaram melhores médias para os parâmetros avaliados. Deste modo, não descartamos o potencial deste biopolímero como crioprotetor, sendo necessárias mais avaliações para determinar a sua capacidade de proteção das células espermáticas submetidas ao processo de congelamento.

4. CONCLUSÃO

A adição da goma xantana ao diluente para congelamento de sêmen ovino nas concentrações utilizadas não alterou a qualidade seminal pós-descongelamento sobre os parâmetros avaliados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CORREA, J.R.; PACE, M.M.; ZAVOS, P.M. Relationships among frozenthawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, 48, 721–31, 1997.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats**. Australia: Star Printery Pty Ltd, 194, 1987.

FOOTE, R.H. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. **Animal Reproduction Science**, 75, 119–39, 2003.

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

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 343-352, 1990.

HU, J.H.; LI, Q.W.; ZHANG, T.; JIANG, Z.L. Effect of *Gynostemma Pentaphyllum* Polysaccharide on boar spermatozoa quality following freezing-thawing. **Cryobiology**, 59, 244–249, 2009.

JAFAROGHLI, M.; KHALILI, B.; FARSHAD, A.; ZAMIRI, M.J. The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing of ram semen. **Small Ruminant Research**, 96, 58-63, 2011.

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

LARSSON, B.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? **Animal Reproduction Science**, 60-61, 327 – 336, 2000.

O'MEARA, C.M.; HANRAHAN, J.P.; PRATHALINGAM, N.S.; OWEN, J.S.; DONOVAN, A.; FAIR, S.; WARD, F.; WADE, M.; EVANS, A.C.O.; LONERGAN, P. Relationship between *in vitro* sperm functional tests and *in vivo* fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, 69, 513 – 522, 2008.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 37, p. 185-249, 1994.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v. 38, p. 1-36, 1995.

SCHMEHL, M. K.; VAZQUEZ, I. A.; GRAHAM, E. F. The effects of nonpenetrating cryoprotectants added to TEST-yolk-glycerol extender on the post-thaw motility of ram spermatozoa. **Cryobiology**, 23, 512-517, 1986.

STATISTIX® Statistix 9 analytical software. Tallahassee. FL, USA. 2008.

TONIETO, R.A.; GOULARTE, K.L.; GASTAL, G.D.A.; SCHIAVON, R.S.; DESCHAMPS, J.C.; LUCIA, T. JR. Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram sperm. **Small Ruminant Research**, 93, 206-209, 2010.