

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE CONGELAMENTO DE SÊMEN OVINO

MONIQUE MAZZAROLLO FRATA^{1,2}; CARLOS EDUARDO RANQUETAT FERREIRA²; KARINA GOULARTE²; RAFAEL GIANELLA MONDADORI²; ARNALDO DINIZ VIEIRA²; CARINE DAHL CORCINI^{2,3}

¹Universidade Federal de Pelotas – moniquefrata@hotmail.com

²Grupo de pesquisa ReproPel - Faculdade de Veterinária – UFPel

³Universidade Federal de Pelotas – corcinicd@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A utilização da criopreservação de sêmen juntamente com a inseminação artificial vem se destacando como importantes ferramentas para o melhoramento genético de várias espécies animais (SILVA et al., 2009). Porém, os procedimentos de criopreservação são conhecidos por danificar organelas dos espermatozoides como as membranas e induzir mudanças na capacitação e reação acrossômica na população sobrevivente (KUMAR et al., 2003).

O congelamento provoca danos por dois mecanismos distintos: o primeiro é o dano mecânico, onde a forma das células é distorcida pelos cristais de gelo. O segundo dano é causado pelos efeitos químicos e osmóticos de solutos concentrados na água não congelada residual entre os cristais de gelo. Isso ocorre porque água congela como uma substância pura, que exclui os solutos (WOWK, 2007). Além disso, as proteínas e lipídeos de membrana se encontram fluidos em estado fisiológico, mas sofrem alterações físicas com a contínua queda de temperatura durante o congelamento. Assim, esta passa do estado líquido onde as cadeias de ácidos graxos se encontravam aleatoriamente distribuídas, ao estado de gel após o congelamento e ordenam-se paralelamente produzindo uma estrutura rígida, que torna estas áreas fracas e suscetíveis a rupturas, fusões e permeáveis a íons (GONZALEZ, 2004).

Deste modo, a velocidade de congelamento tem grande importância devido ao fato de que uma curva de congelamento muito lenta pode causar desidratação severa na célula e colapso das membranas devido à exposição prolongada a condições hiperosmóticas. O ritmo de resfriamento deve ser suficientemente lento para que a célula espermática tenha chance de ser adequadamente desidratada evitando a formação de cristais intracelulares (AZEVEDO et al., 2005). Este fato determina a necessidade pela busca de processos que minimizem os danos provocados pelo congelamento. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar três diferentes métodos de congelamento de sêmen ovino: vapor de nitrogênio (convencional), TK e CL (automatizadas).

2. METODOLOGIA

Foram utilizados cinco carneiros adultos da raça crioula coletados semanalmente, totalizando seis coletas de cada macho pelo método da vagina artificial (FERRA; SERENO, 2006). Após a coleta, o sêmen foi diluído na concentração 1:1 em Tris-gema (SALAMON, 2000) e em seguida, foram feitas análises de motilidade, vigor e concentração, conforme recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Após a determinação da

concentração, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,25ml, com 50 milhões espermatozoides/dose e então submetidas aos tratamentos de resfriamento e congelamento: convencional em vapor de nitrogênio (VN), TK-3000® (TK) e CL-5500 Cryologic® (CL). Esta etapa foi realizada no laboratório sob temperatura ambiente controlada.

Em todos os tratamentos o resfriamento inicial foi a 20°C. No grupo VN foi traçada uma curva de resfriamento até 5°C de 0,3-0,5°C/min em caixa condicionadora (Koolmate, Minitube). Após 60min de estabilização à 5°C as palhetas foram expostas ao vapor de nitrogênio líquido (N₂) (4 cm acima do nível do líquido = -80°C) por 10 minutos antes de serem submersas no N₂ (-196°C). No grupo TK foi utilizada a curva P3.S1, que submete as amostras a um resfriamento de 0,25°C/min até 5°C. Após 60min de estabilização a 5°C, o case com as palhetas foi submerso no N₂ para congelamento a uma taxa de 20°C/min até atingir -120°C quando as palhetas foram transferidas para o N₂. No grupo CL foi utilizado o programa 07, que submete as amostras a um resfriamento de 0,3°C/min até 5°C. Após 02min a taxa de resfriamento passa para 3°C/min até -10°C, 5°C/min até -35°C e 4°C/min até -43°C, quando as palhetas foram imersas no N₂.

Avaliações de mitocôndria e apoptose foram realizadas através de citometria de fluxo no equipamento Attune® (Life Technologies). Foram avaliadas 10 mil células por tratamento com descrição da média das células viáveis. As sondas utilizadas foram YO-PRO-1 (Molecular Probes Y-3603) para apoptose e Rodamina 123 combinado com JC-1 (Molecular Probes T-3168) para atividade mitocondrial, conforme protocolo do fabricante (HOSSAIN, 2011).

Também foi realizado o Teste de termo-resistência lento (TTL): as palhetas de sêmen foram descongeladas a 37°C por 30 segundos e as amostras foram colocadas em *ependorfs*, sendo incubadas em banho-maria a 37°C por 4 horas. Foram feitas análises de motilidade a cada hora (CBRA, 1998).

Para análise estatística, foi realizada avaliação da normalidade dos dados, pelo teste de *Shapiro-Wilk*, sendo os dados não paramétricos. Os dados foram normalizados por Arco Seno e realizada a análise de variância com medidas repetidas, avaliando o efeito individual do macho e considerando o efeito da rotina no *software Statistix 10* (2013).

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi observada diferença ($p > 0,05$) entre os métodos de congelamento quanto às análises de mitocôndria e apoptose, realizadas no citômetro (Tabela 1). Corroborando com RODELLO, (2006) a viabilidade de espermatozoides ovinos quanto às técnicas de congelamento utilizadas (convencional e automatizada) não diferiram entre si.

Tabela 1- Avaliação da mitocôndria e apoptose de espermatozoides submetidos a diferentes métodos de congelamento.

Métodos de Congelamento	Mitocôndria	Apoptose	
	Média%	Média%	Desvio padrão
Vapor	31,41	23,71	± 3,80
TK	26,10	22,25	± 3,66
CL	22,83	16,75	± 3,57

No TTL não houve diferenças significativas, embora os métodos do vapor de nitrogênio e TK apresentaram tendência a melhor motilidade (Figura 1). FERREIRA et al. (2009), também não encontrou diferença entre a motilidade e o vigor médio do sêmen de caprinos no TTL no método convencional e automatizado.

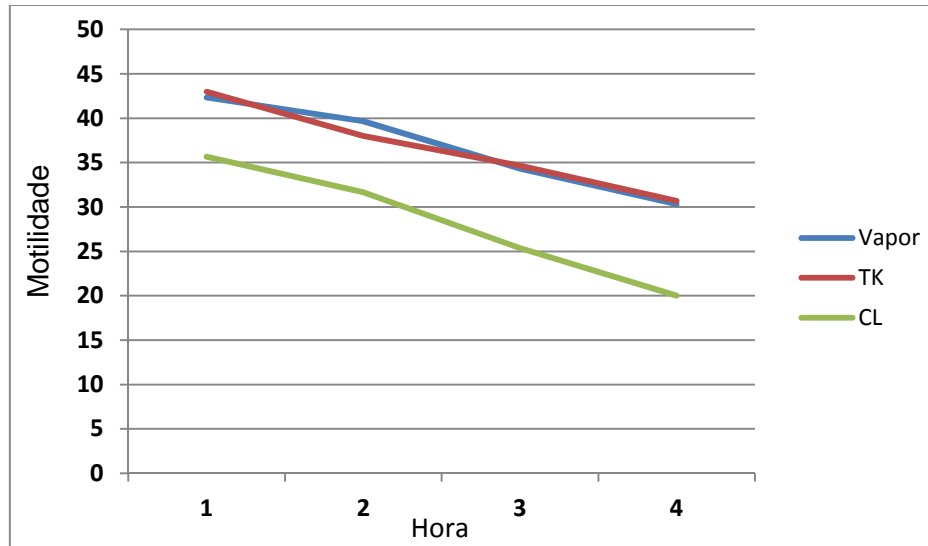


Figura 1 - Avaliação da motilidade espermática ao longo de 4h em TTL.

Ambos métodos de congelamento foram eficientes, mas de acordo com ABUD et al., (2014) no sistema automatizado, tem-se o controle rigoroso das curvas, sem a influência da temperatura ambiente. No sistema convencional pode-se ter a influência da temperatura externa. Porém como o experimento foi desenvolvido no laboratório, não houve variações extremas de temperatura. Portanto, a curva pode não ter sofrido variações severas, interferindo de forma positiva nos resultados e não sendo observadas diferenças (ABUD et al., 2014). O método convencional (VN) é simples, barato e eficaz, não necessitando de equipamentos sofisticados, mas sua curva não é totalmente controlada, podendo sofrer interferências externas de temperatura. Os métodos automatizados (TK e CL) são eficientes no controle das curvas, porém agregam maior custo devido a aquisição e manutenção dos equipamentos.

4. CONCLUSÕES

Não houve diferença entre os métodos avaliados, sendo VN, TK e CL eficientes no congelamento de sêmen ovino. Portanto, cabe ao técnico eleger o método que mais se adequa à sua rotina e condição financeira.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, H. C. et al. Cinética e integridade dos espermatozoides no sêmen ovino submetido a diferentes ritmos de refrigeração e congelamento em sistema automatizado. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL**, 16., Goiânia, 2005, Anais:Resumos.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. Ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. P 104.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. Ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. P 33.

FERRA, J. C.; SERENO, J. R. B. **Inseminação artificial em ovinos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006. P.12.

FERREIRA, M.S. Efeito do diluidor e do método de congelamento na viabilidade de sêmen caprino. Seropédica, RJ. **UFRRJ**, 2009.

GONZALEZ, R. A. F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozoide bovino**. 2004. Tese (doutorado em reprodução animal). Programa de Pós-graduação: reprodução animal, USP.

HOSSAIN, S. et al. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. **Asian Journal of Andrology**, v.13, p.406-419, 2011.

KRUMAR, S. et al. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. **Cryobiology**, v.46, p. 246–253, 2003.

RODELLO, L. **Validação de sistema automatizado de refrigeração e congelamento de sêmen ovino**, 2006 Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

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

SILVA, N. M. M. Avaliação do sêmen fresco e pós-congelado de ovinos da raça Morada Nova na região Semi Árida do Nordeste. In: **ENCONTRO DOS MÉDICOS VETERINÁRIOS DA BAHIA**, 68., 2009, Porto Seguro. Inovação e responsabilidade social: anais. Porto Seguro: SBMV, 2009.

STATISTIX®, STATISTIX 10 **Analitycal Software**, Tallahassee, FL, USA, 2013

WOWK, B. How cryoprotectants work. **Cryonics: the science of cryonics**. 2007. P.3-7.