

ATP NA CONSERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDE DE EPIDÍDIMO EM EQUINO

JULIANA RIBEIRO PEGORARO¹, FERNANDA RODRIGUES
MENDONÇA², CARINE DAHL CORCINI³

¹Universidade Federal de Pelotas – ribeiropegoraro@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas - nandarm.vet@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – corcinicd@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Existem diversas técnicas que permitem a recuperação de espermatozoides viáveis de equídeos. Dentre as biotecnologias disponíveis, iremos grifar a obtenção do sêmen através da cauda do epidídimo, que é uma técnica que permite a recuperação de células espermáticas de cavalos que vieram a óbito; que tiveram os testículos removidos cirurgicamente ou que possuem alguma alteração reprodutiva que impedem a coleta do ejaculado, sendo esta técnica de coleta, a última oportunidade para armazenar e preservar os espermatozoides do animal desejado, sendo uma técnica inestimável ao falarmos de animais de elevado valor genético ou que sejam de grande valor emocional para seus tutores (SANTOS, 2017).

A fertilidade e qualidade de sêmen equino, obtido a partir da cauda do epidídimo já foi comprovada (BARKER e GANDIER, 1957), no entanto é preciso atentar-se em manter a viabilidade seminal após a coleta para o armazenamento, usando mão de diluentes combinados com alguns componentes, como o leite, antioxidantes e gema de ovo, que ajudam a manter os parâmetros do sêmen equino em baixas temperaturas (SAMPER, 2011). Outro fator que contribui para viabilidade do espermatozoide está relacionado ao ATP, tendo em vista o seu suprimento adequado e o uso eficaz do seu estoque (ZAKRZEWSKA e UDALA, 2006), porque para manter a funcionalidade do espermatozoide, ele necessita de grande quantidade de energia, na forma de ATP (DIAS, 2017).

Este trabalho tem por objetivo avaliar a utilização de ATP na conservação de sêmen equino oriundo da cauda do epidídimo.

2. METODOLOGIA

Os epidídimos (n = 10) utilizados neste trabalho foram obtidos após orquiectomia de rotina na criação equina. Os animais tinham entre 2 e 3 anos em condições sanitárias adequadas. Os testículos foram lavados várias vezes com PBS para depois serem cuidadosamente separados dos epidídimos, após isso, então, os espermatozoides foram coletados através da técnica de lavagem retrógrada, com 1 mL de leite UHT integral para cada epidídimo. As amostras de sêmen foram divididas em grupos: A, B, C e D. O grupo A, considerado grupo controle somente com leite UHT, grupo B- leite UHT com 0,25mM de ATP; o grupo C- leite UHT com 2,5mM de ATP; e o grupo D leite UHT com 25mM de ATP, armazenados a 5° por 48 horas.

Uma alíquota da amostra foi aquecida a 37°C para análise de motilidade espermática. Para essa análise uma amostra de 3 microlitros era colocada na lâmina e lamínula e na objetiva de 20X era realizado a avaliação.

Os resultados foram comparados estatisticamente através do teste de Tukey HSD all-pairwise.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em equinos, quando os epidídimos são refrigerados a 5°C, os espermatozoides epididimários mantêm a motilidade total e a integridade semelhante aos espermatozoides colhidos logo após a castração por um período de 30 horas (Monteiro et al., 2013). Após coletar o sêmen, ocorre uma diminuição da motilidade espermática significativa, quando conservado por 24 horas ou mais em refrigeração, sendo de extrema importância o conhecimento dos diluentes utilizados que contribuem para preservar as propriedades do sêmen e assim manter sua fertilidade (CASTRO, 2014)

Um dos fatores primordiais para a manutenção das qualidades do sêmen, é a proteção da integridade da membrana plasmática, que envolve todo o espermatozoide, membrana essa que é composta por dupla camada lipídica, proteínas, carboidratos e que exerce função de barreira, por fazer permeabilidade seletiva (CASTRO, 2014). O leite UHT integral, que foi o diluente utilizado neste presente experimento, auxilia na manutenção da membrana plasmática do esperma, pois ele possui grande quantidade de lipoproteínas, que desempenham a função de estabilizar as proteínas da membrana do espermatozoide (OLIVEIRA et al, 2013).

Os movimentos da célula espermática são dependentes de ATP, e são importantíssimos para garantir sua fertilidade, pois estão intimamente relacionados com a capacidade do espermatozoide de se movimentar através do trato reprodutivo feminino até que encontre o óvulo da fêmea (Cabrita et al 2010). Após o congelamento e descongelamento, o espermatozoide é acometido por um desgaste energético, comprometendo principalmente sua motilidade, afetando as vias metabólicas relacionadas a produção de ATP (ARAMLI et al., 2013). A técnica de se adicionar ATP exógeno ao sêmen, faz com que minimize o seu desgaste energético e aumente sua viabilidade, conforme foi demonstrado nessas espécies (BLANCO et al., 2011). Vale ressaltar que a refrigeração não causa os danos que o processo de congelamento causa (GALAN et al, 2017)

As amostras de sêmen, foram processadas conforme descrito anteriormente e mantidas sob refrigeração durante 48 horas, sendo após divididas em grupos onde foram adicionadas diferentes quantidades de ATP: leite + 0,25mM ATP, leite + 2,5mM ATP, leite + 25mM ATP (tabela 1).

Tabela 1 - Análise da motilidade de espermatozoides

| Tratamento | Motilidade % |
|------------------------|--------------------------|
| Controle | 40,00 ± 1,5 ^a |
| Leite UHT + ATP 0,25mM | 26,47 ± 1,2 ^b |
| Leite UHT + ATP 2,5mM | 23,33 ± 2,5 ^b |
| Leite UHT+ ATP 25mM | 16,67 ± 4,3 ^b |

De acordo com o CBRA (2013) são considerados fora do padrão para sêmen congelado e refrigerado, os que apresentarem motilidade progressiva abaixo de 30%, considerando a coleta por vagina artificial. Na análise inicial,

o sêmen apresentava 70% de motilidade. Após as 48 horas de refrigeração, o grupo controle apresentou motilidade de 40% e os grupos que foram adicionados ATP, apresentaram motilidade inferior a 30%, demonstrando assim a ineficiência do tratamento utilizado, indo na contramão do que foi dito por BLANCO et. al. (2011), de que a adição de ATP exógeno ao sêmen, faz com que diminua seu desgaste energético. A diminuição do desgaste energético teoricamente implicaria em uma motilidade maior, pois segundo ARAMLI et. al. (2013), o enfraquecimento energético compromete principalmente a motilidade.

Em um estudo feito por DIAS (2017), onde se utilizou ATP na criopreservação de sêmen de suínos, foi possível perceber que o diluente com a maior concentração de ATP (25mM), foi o que apresentou menor motilidade, o mesmo foi encontrado no presente trabalho. Entende-se que o aumento de ATP, altera a relação ATP/ADP, interferindo no metabolismo energético (DIAS, 2017).

Os resultados apresentados na tabela 1, foram conferidos através do teste de Tukey, comprovando que de fato não existe diferença estatística entre os tratamentos, achado semelhante ao descrito por DIAS (2017) em seu estudo com suínos.

4. CONCLUSÕES

Os tratamentos de ATP acrescido com leite UHT integral, utilizada nas amostras de sêmen de epididimo, não obtiveram diferenças significativas em sua motilidade.

5. REFERÊNCIAS

- ARAMLI, M.S.; KALBASSI, M.R.; NAZARIB, R.M. Effects of short-term storage on the motility, oxidative stress, and ATP content of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, v.143, p. 112-117, 2013.
- BARKER, C.A.; GANDIER, S.C.C. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, v.21, n.2, p.47-51, 1957.
- BLANCO, J.M.; LONG, J.A.; GEE, G.; WILDT, D.E.; DONOGHUE, A.M. Comparative cryopreservation of avian spermatozoa: Benefits of non-permeating osmoprotectants and ATP on turkey and crane sperm cryosurvival. **Animal Reproduction Science**, v. 123, p. 242–248, 2011.
- BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. **Acta Scientia e Veterinariae**, n. 33, p. 17-32, 2005.
- Cabrita E, Sarasquete C, Martínez-Páramo S, Robles V, Beirão J, Pérez-Cerezales S, Herráez MP. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. **J Appl Ichthyol** 2010; 26 623–635.

CASTRO, F.S. **Comparação entre diferentes tipos de leites como diluentes para sêmen equino refrigerado.** 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias na área de Reprodução Animal) - Curso de Pós-Graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 3ª Ed. Belo horizonte, 2013. 46p.

DIAS, L.P. **Adenosina Trifosfato (ATP) na criopreservação de sêmen suíno.** 2017. Dissertação (Mestre em Ciências - área de concentração: Sanidade Animal) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

GALAN, T.G.B; WEISS, R.R; KOZICKI, L.E; BICUDO, S.D. Espermatozoides epididimários: refrigeração e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.41, n. 3, p. 659-664, 2017.

Monteiro G.A; Guasti P.N; Rocha A.S; Martin I; Sancler-Silva Y.F.R; Dell'Aqua C.P.F; Dell'Aqua Jr J.A; Papa F.O. Effect of Storage Time and Temperature of Equine Epididymis on the Viability, Motion Parameters, and Freezability of Epididymal Sperm. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, n.3, p.169-173, 2013.

MOURA, A.L.N. **Congelamento de espermatozoides epididimários em cães.** 2017. Monografia (requisito parcial à obtenção do grau de Médico Veterinário) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade de Uberlândia.

OLIVEIRA, G.C; OLIVEIRA, B.M.M; CELEGHINI, E.C.C; FERNANDES, C.B; MATTOS, C.B. Cryopreservation of equine semen: a review. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** , Belo Horizonte, v.37, n.1, p.23-28, jan/mar. 2013.

SANTOS, F.C.C. **Sêmen da cauda do epidídimo de garanhões submetido à centrifugação com coloide.** 2017. Tese (Doutorado em Medicina Animal: Equinos) - Programa de Pós- Graduação em Medicina Animal : Equinos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ZAKRZEWSKA, H; UDALA, J. In vitro influence of sodium fluoride on adenosine triphosphate (ATP) content in ram semen.**Annales Academiae Medicae Stetinensis**, Polish, v.52, p. 11-109, 2006.