

XANTANA COMO ADITIVO CRIOPROTETOR NO CONGELAMENTO DE SÊMEN OVINO - Resultados Parciais

GASTAL, Gustavo Desire Antunes¹; CORCINI, Carine Dahl¹; VIEIRA, Arnaldo Diniz¹; LUCIA, Thomaz Jr.¹

¹Laboratório de Reprodução Animal, Faculdade de Veterinária- UFPel
Campus Universitário s/n – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900
Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS. gastalvet@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Durante o processo de congelamento e descongelamento de espermatozoides ovinos ocorrem danos estruturais, bioquímicos e funcionais em grande parte das células (SALAMON & MAXWELL, 1995). Estes danos são determinados em parte por efeito tóxico e osmótico gerados pela ação dos crioprotetores e dos cristais de gelo. Adicionalmente, agentes oxidantes produzidos pelo metabolismo celular provocam danos as membranas e ao material genético das células. Desta forma, para que seja possível criopreservar espermatozoides ovinos com eficiência é necessário minimizar tais problemas. Neste sentido, diferentes aditivos crioprotetores têm sido empregados com objetivo de preservar a integridade e funcionalidade espermática pós-descongelamento (SALAMON & MAXWELL, 1994). Dentre os aditivos testados observou-se que, açúcares como a sacarose, rafinose (JAFAROGHLI *et al.*, 2011) e trealose (TONIETO *et al.*, 2010) atuam como protetores da membrana espermática. Outros agentes como a gelatina (VANNI *et al.*, 2008), goma-arábica (SCHMEHL *et al.*, 1986) também demonstraram efeito benéfico na preservação do sêmen ovino, entretanto, não tiveram seu uso difundido apesar dos potenciais benefícios gerados pelo espessamento dos diluentes. Atentos a este princípio, verificamos que a goma xantana normalmente empregada no congelamento de alimentos pode atuar como aditivo crioprotetor espermático quando associado á diluentes para criopreservação de sêmen. A goma xantana é um biopolímero produzido pela *Xanthomonas campestris* e apresenta como principais propriedades a manutenção da viscosidade na presença de sais e 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, favorecendo a preservação da viabilidade dos espermatozoides no pós-descongelamento. Como não existem informações acerca do uso da goma xantana como aditivo crioprotetor para sêmen ovino, este trabalho objetivou determinar qual a concentração do biopolímero que é a mais adequada para uso como aditivo crioprotetor de espermatozoides ovinos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Como doadores de sêmen foram utilizados sete machos ovinos, clinicamente saudáveis e sexualmente maduros. Os animais permaneceram alojados em instalações do Biotério Central da UFPel, sendo submetidos a duas coletas semanais durante quatro semanas. As coletas foram realizadas pelo método da vagina artificial sendo, imediatamente após a coleta, o sêmen foi adicionado de meio diluente (1:1, v/v) Tris-gema-glicerol (TGG) (EVANS & MAXWELL, 1987), para proteção durante o transporte ao laboratório. No laboratório, foram procedidas as determinações de concentração espermática em

câmara hematimétrica de Neubauer e de motilidade espermática total, utilizando-se no experimento apenas ejaculados com concentração $\geq 2,0 \times 10^9$ espermatozoides viáveis/ml, motilidade $\geq 70\%$ (0 a 100) e vigor ≥ 3 (escala de 0 a 5). A concentração de cada ejaculado foi ajustada em $1,2 \times 10^9$ espermatozoides viáveis/ml do diluente, sendo em seguida diluído com o meio do respectivo tratamento: TGG sem xantana (Controle); TGG com 0,15% de xantana (TGC15); TGG com 0,20% de xantana (TGC20) e TGG com 0,25% de xantana (TGC25). Em cada tratamento a diluição foi suficiente para proporcionar uma dose de 100×10^6 espermatozoides viáveis por palheta de 0,25ml (IMV® Technologies, L'Aigle, France). A partir de cada ejaculado foram envasadas oito palhetas de cada tratamento, sendo todas submetidas, simultaneamente ao protocolo de resfriamento e congelamento em equipamento automático de congelamento (TK 3000®, Uberaba, MG, Brasil). Após congeladas, as palhetas foram armazenadas em botijões criogênicos até o momento das avaliações de viabilidade.

Para determinar o grau de proteção conferido pelos tratamentos, foram comparados (pré e pós-congelamento) os parâmetros de motilidade e vigor (BEARDEN & FUQUAY, 1997); morfologia (HANCOCK & HOVELL, 1959) através de microscópio ótico de contraste de fase e integridade de membrana plasmática (HARRISON & VICKERS, 1990); integridade de acrossoma (KAWAMOTO *et al.*, 1999) e funcionalidade mitocondrial (GRASA *et al.*, 2004) através de microscópio de fluorescência.

Os resultados obtidos foram analisados através do software STATISTIX®9 (2008). Estatísticas descritivas e distribuições de frequências foram realizadas para os parâmetros de qualidade espermática e a variação destas respostas em função dos tratamentos foi avaliada através de análise de variância. As variáveis que não apresentaram normalidade, de acordo com o teste de Shapiro-Wilk, foram submetidas à transformação para as escalas de arco-seno e logaritmo, ainda que os resultados sejam apresentados na escala original, para fins de interpretação. As comparações de médias foram realizadas através do teste de Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Este é o primeiro estudo que buscou determinar a viabilidade da goma xantana como aditivo crioprotetor em diluente para congelamento de sêmen ovino. Dentre os resultados observados, as médias de integridade de membrana, integridade de acrossoma e atividade mitocondrial não variaram ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Este resultado caracteriza a ausência de qualquer efeito tóxico determinado pela goma xantana.

Os resultados de motilidade espermática após o descongelamento no tratamento controle sem xantana foi superior ($P < 0,05$) somente ao tratamento com 0,25% de xantana (Tabela 1). Devido a capacidade de a xantana manter sua viscosidade dentro de uma faixa de 10 a 90°C (LUVIELMO & SCAMPARINI, 2009), durante a incubação a 37°C, a maior viscosidade do meio atuou reduzindo a velocidade de deslocamento espermático. Tal comportamento já era esperado, objetivando-se com isto preservar as reservas energéticas dos espermatozoides por períodos mais longos, o que não era possível com a gelatina, que se liquefaz dentro desta faixa de temperatura.

Em um experimento desenvolvido por HU *et al.* (2009), eles utilizaram um polissacarídeo (*Gynostemma Pentaphyllum*) extraído de uma planta com propriedades antioxidantes conhecidas e utilizadas na medicina nos países

asiáticos. Nesse sentido o estudo deste polissacarídeo levou os pesquisadores a concluir que, este tipo de polissacarídeo pode ser adicionado ao diluente de sêmen suíno, exercendo capacidade crioprotetora das células espermáticas e melhorando alguns indicadores de qualidade espermática (motilidade, integridade de membrana, integridade de acrossoma e parâmetros de atividade mitocondrial), eles também observaram menor produção de radicais livres até a concentração de 0,5mg/ml do polissacarídeo. Acredita-se que, a xantana possa exercer um efeito protetor as células até a concentração de 0,20%, conforme resultados obtidos por este experimento. Outro fato relevante é que, estes polissacarídeos podem estabelecer pontes de hidrogênio com os grupos fosfatos dos fosfolípidos de membrana (ANCHORDOGUY *et al.*, 1987; RODGERS & GLASER, 1993), reduzindo o fluxo de membrana durante o resfriamento e protegendo contra a perda das propriedades desta. Esta ação em diversos níveis de proteção da membrana plasmática pode fazer da xantana um candidato como protetor de membrana.

Tabela 1: Comparações de médias e erro padrão de parâmetros seminais quanto às diferentes concentrações de xantana após o descongelamento.

Xantana (%)	Motilidade	Membrana	Acrossoma	Mitocôndria
0,00	31.4 ± 2.6 ^A	25.6 ± 2.3	43.8 ± 4.5	26.7 ± 3.8
0,15	25.7 ± 2.6 ^{AB}	28.9 ± 2.3	46.3 ± 4.5	26.4 ± 3.8
0,20	21.9 ± 2.6 ^{AB}	28.1 ± 2.3	44.8 ± 4.5	23.6 ± 3.8
0,25	20.3 ± 2.6 ^B	28.0 ± 2.3	39.1 ± 4.5	22.1 ± 3.8

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

4. CONCLUSÕES

O uso da goma xantana como aditivo crioprotetor não aumentou a viabilidade espermática nas três concentrações testadas. Avaliações continuam sendo realizadas para afirmar o uso da xantana na criopreservação de sêmen ovino.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANCHORDOGUY, T.J.; RUDOLPH A.S.; CARPENTER J.F.; CROWE J.H. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. **Cryobiology**; v.24: p.324 – 331, 1987.
- BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. **Semen evaluation**. In: BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Applied Animal Reproduction. 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. 159-170.
- EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. 1987. **Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats**. Australia: Star Printery Pty Ltd, 1987, 194 p.
- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; CASAS, J.A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: Production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, 18, 549-579, 2000.
- GRASA, P.; PÉREZ-PÉ, R.; BÁGUENA, O.; FORCADA, F.; ABECIA, A.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Ram Sperm Selection by a Dextran/Swim-Up Procedure Increases Fertilization Rates Following Intrauterine Insemination in Superovulated Ewes. **Journal of Andrology**, 25, 982-990, 2004.
- HANCOCK, J.L.; HOVELL, G.J.R. The collection of boar semen. **Veterinary Record**, 71, 664-665, 1959.

- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, 88, 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. AND ZAMIRI, M.J. The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. **Small Ruminant Research**. V. 96, 1, p. 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**, 71, 497-501, 1999.
- LUVIELMO, M.M.; SCAMPARINI, A.R.P. Goma xantana: produção, recuperação, propriedades e aplicação. Estudos tecnológicos - v. 5, nº. 1: p. 50-67, 2009.
- RODGERS, W; GLASER M. Distribution of proteins and lipids in the erythrocyte membrane. **Biochemistry**; v.32: p.12591-12598, 1993.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, 37, 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**, 38, 1-36, 1995.
- STATISTIX® 9. **Analytical Software. User's manual**. 396 p. Tallahassee. FL. 2008.
- SCHMEHL, M. K.; VAZQUEZ, I. A. AND 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.
- 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.
- VANNI, R; ARABI, S; GALLI, A. **Storage of sheep semen at 4°C: comparison among different milk based extenders with or without gelatin**. 6^o Meeting of Association for Applied Animal Andrology, 12-13 July 2008, Budapest, Hungary.