



## **AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DA MEMBRANA CELULAR DOS ESPERMATOZÓIDES DE SUÍNOS E CÃES**

**Ulguim R.R.<sup>1\*</sup>; Varela Junior, A. S.<sup>1</sup>; Corcini, C.D.<sup>1</sup>; Panzardi, A.<sup>1</sup>; Piassi, L.M.<sup>1</sup>;  
Bianchi, I.<sup>1</sup>; Lucia, T. Jr.<sup>1,2</sup>; Deschamps, J.C.<sup>1,2</sup>; Corrêa, M.N.<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup> *PIGPEL – Centro de Biotecnologia, Faculdade de Veterinária*

<sup>2</sup> *Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Veterinária*

<sup>3</sup> *Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Veterinária*

*Campus Universitário s/n – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900*

*Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS.*

\* [arulquim.fv@ufpel.edu.br](mailto:arulquim.fv@ufpel.edu.br) [www.ufpel.edu.br/pigpel](http://www.ufpel.edu.br/pigpel)

**APOIO : FAPERGS – Fundação de Amparo a Pesquisa e Ensino do Rio Grande do Sul**

### **1. INTRODUÇÃO**

As avaliações de rotina da qualidade espermática são baseadas em parâmetros físicos que incluem principalmente motilidade, morfologia e concentração. Porém, somente estas avaliações não são suficientes para garantir a fertilidade ou infertilidade de um ejaculado [5]. A membrana celular desempenha função determinante na arquitetura do sistema biológico e é um elemento estrutural básico para manutenção dos fluidos intracelulares [4]. Uma membrana íntegra não é somente importante para o metabolismo espermático, mas também as mudanças nas propriedades da membrana do espermatozóide são necessárias na capacitação espermática, reação de acrossoma, e fertilização [5].

O teste do choque hipoosmótico (CHIPO), tem como função avaliar a integridade funcional da membrana dos espermatozoides após a coleta e após o acondicionamento. Os espermatozoides com membrana bioquimicamente ativa irão aumentar de volume, quando expostos ao estresse hipoosmótico, devido ao influxo de água. Isto é mais facilmente observado na cauda do que na cabeça do espermatozóide, pois a membrana plasmática da cauda parece ser mais facilmente afetada do que a membrana que circunda a cabeça [1]. O teste foi desenvolvido para várias espécies, principalmente para avaliação da qualidade do sêmen para melhor estimar a capacidade fertilizante [6].

O objetivo deste trabalho foi determinar possíveis variações existentes na avaliação da integridade de membrana, quanto a resposta dos espermatozoides suínos em relação aos espermatozoides caninos e as possíveis interações com os diluentes seminais.

### **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Na execução do trabalho, foram utilizados 4 cães da raça Cocker Spaniel, e 5 machos suínos da raça Landrace.

A coleta de sêmen dos cães foi realizada através da técnica de manipulação digital [2]. Após a coleta, era feita avaliação de motilidade e vigor, e logo em seguida realizava-se a diluição do ejaculado em Tris-glicose (TG) com 20% de gema e TG com 6, 8 e 10% de LDL (Lipoproteína de baixa densidade), sendo posteriormente



armazenado em caixas refrigeradas à temperatura de 5°C. O sêmen suíno foi coletado pelo método da mão enluvada, e imediatamente foi avaliado quanto à motilidade e vigor, e após realizada a diluição nos diluentes BTS (Beltsville Thawing Solution) e Piggel e em seguida armazenado em caixa refrigerada à 17°C.

Todos os ejaculados foram armazenados durante 48 horas. O CHIPO e a motilidade foram realizados nas 24 e 48 horas após a coleta do sêmen.

Para a realização do CHIPO, utiliza-se uma solução a base de citrato de sódio e de frutose, ambas, em água destilada a 300 mOsm/L, que são misturadas em partes iguais e diluídas com água até se obter uma solução hipoosmótica com osmolaridade de 75 mOsm/L. Na avaliação do CHIPO, recolhe-se uma alíquota de 100 µl de sêmen que é adicionado a 900 µl da solução hipoosmótica, sendo homogeneizada e incubada em banho-maria durante 15 minutos à 37°C. Depois da incubação, uma amostra é depositada na câmara de Neubauer, sendo contadas 100 células em microscópio em aumento de 200 x, registrando os espermatozoides que apresentavam inchaço da cauda, revelado pelo enrolamento ou dobra da cauda. Para se determinar um grupo controle para esta avaliação, um procedimento idêntico era realizado com uma solução isoosmótica ao sêmen (dilúente). Portanto, o valor que foi utilizado para análise do CHIPO, corresponde a diferença entre o número de espermatozoides com caudas enroladas ou dobradas, observadas no teste realizado com a solução hipoosmótica e isoosmótica. A motilidade foi avaliada após incubação de uma amostra de sêmen a 37°C durante 10 minutos. Para avaliar a motilidade espermática, coloca-se uma gota sobre uma lâmina de vidro, cobrindo-a com uma lamínula, ambas previamente aquecidas a 37-39°C. utiliza-se para a avaliação um microscópio em aumento de 400x, com platina pré-aquecida de 37-40°C [1].

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores da avaliação de motilidade e de integridade de membrana nas 24 e 48 horas foram superiores ( $P < 0,001$ ) na espécie canina em comparação com a suína (Tabela 1). Isto se deve ao fato do sêmen suíno ser mais sensível ao choque térmico [3]. Os valores da motilidade e integridade de membrana variaram dentro da mesma espécie devido aos diferentes diluentes utilizados (Tabela 2).

Foi avaliada a correlação entre a motilidade e a integridade de membrana, verificando os seguintes valores  $R = 0,71$  nas 24 horas e  $R = 0,77$  nas 48 horas. Esta correlação é alta, pois a motilidade espermática é dependente do transporte de soluções através da membrana (membrana íntegra) e das atividades bioquímicas do metabolismo espermático [4].

**Tabela 1:** Relação da motilidade e integridade da membrana (IM) entre as espécies suína e canina

Espécie	Motilidade		IM	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Canino	83,12 <sup>a</sup>	80,50 <sup>a</sup>	56,32 <sup>a</sup>	52,50 <sup>a</sup>
Suíno	43,61 <sup>b</sup>	32,15 <sup>b</sup>	13,07 <sup>b</sup>	9,92 <sup>b</sup>

Letras diferentes, na mesma coluna, representam diferença ( $P < 0,001$ ).

**Tabela 2:** Efeito dos diferentes tratamentos sobre a motilidade e integridade da membrana (IM) em cada espécie

Espécie	Tratamentos	Motilidade		IM	
		24 h	48 h	24 h	48 h
Canino	TG 20% Gema	79,00 <sup>a</sup>	73,75 <sup>a</sup>	46,25 <sup>b</sup>	43,95 <sup>b</sup>
	TG 6% LDL	83,50 <sup>a</sup>	83,00 <sup>a</sup>	62,60 <sup>a</sup>	57,00 <sup>a</sup>
	TG 8% LDL	86,50 <sup>a</sup>	83,50 <sup>a</sup>	59,10 <sup>a</sup>	55,05 <sup>a</sup>
	TG 10% LDL	83,50 <sup>a</sup>	81,75 <sup>a</sup>	57,35 <sup>a</sup>	54,00 <sup>a</sup>
Suíno	BTS	48,19 <sup>b</sup>	39,44 <sup>b</sup>	21,72 <sup>c</sup>	15,83 <sup>c</sup>
	Pigpel	39,02 <sup>c</sup>	24,86 <sup>c</sup>	4,41 <sup>d</sup>	4,00 <sup>d</sup>

Letras diferentes, na mesma coluna, representam diferença ( $P < 0,001$ ).

#### 4. CONCLUSÕES

Demonstrou-se neste trabalho que a espécie suína possui uma resposta inferior na motilidade e integridade de membrana durante o armazenamento por 48 horas em relação à espécie canina. Isto se deve ao fato da membrana espermática suína apresentar maior suscetibilidade a alterações funcionais e estruturais, quando expostas a estresse térmico. Com isso mostrou-se que o sêmen canino é mais resistente à variação de temperatura, sendo menos suscetíveis a alterações na integridade da membrana.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CORRÊA, M.N; MEINCKE, W; LUCIA JUNIOR, T., DESCHAMPS, J.C. Inseminação artificial em suínos. Ed. Marcio Nunes Corrêa. Pelotas-RS, 2001.
- [2] CRISTIENSEN, I.J Reprodução no cão e no gato. Editora Manole SP. 1988
- [3] HOLT, W. V. & MEDRANO, A. Assessment of boar sperm function in relation to freezing and storage. **J.Reprod.Fertil.Suppl.** 1997.v.52, p.213-222.
- [4] JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEN, H. H.; PEREZ-PALAEZ M.; CRABO, B. G.; ZANEVELD, L. J. D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **J. Reprod. Fertil.** 1984. v.70. p.219-225.
- [5] KEEL, B.K. & WEBSTER, B.W. Handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility. **Ed. Boston MA**, 1990. p.80-96,
- [6] ROTA, A., IGUER-OUADA, M., VERSTEGEN, J., LINDE-FORSBERG, C. Fertility after vaginal or intrauterine deposition of dog semen frozen in a Tris extender with or without Equex STM paste. **Theriogenology**, 1999. v.51. p.1045-1058.