



COMPARAÇÃO DO EFEITO CRIOPROTETOR DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE E DA GEMA DE OVO NO CONGELAMENTO DE SÊMEN CANINO.

Varela Junior, A. S.^{1*}; Ulguin R.R.¹; Corcini, C.D.¹; Bianchi, I.¹; Serret, C. G.¹; Perondi, A.¹; Albiero, I.¹; Lucia, T.Jr.^{1,2}; Corrêa, M.N.^{1,3}; Deschamps, J.C.^{1,2}

¹ PIGPEL – Centro de Biotecnologia, Faculdade de Veterinária

² Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Veterinária

³ Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Veterinária
Campus Universitário s/n – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900
Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS.

* varela@ufpel.edu.br www.ufpel.edu.br/pigpel

1. INTRODUÇÃO

Existe um crescente interesse no congelamento de sêmen canino, devido à facilidade de troca e preservação de material genético e controle sanitário. Entretanto, as células espermáticas quando submetidas a processos de congelamento e descongelamento, são expostas a variações de temperatura que levam ao choque térmico, resultando em alterações na estrutura e funcionalidade da membrana plasmática [3], o que leva a prejuízos para a motilidade e morfologia espermática, principalmente do acrossoma [9]. Assim, é necessária a adição aos diluentes de substâncias crioprotetoras, como a gema de ovo ou lipoproteína de baixa densidade (LDL) [5]. Estes são agentes eficientes na proteção dos espermatozóides contra danos de choque térmico, preservando a fertilidade espermática após congelamento [15, 18], possibilitando a manutenção da capacidade fecundante da célula espermática, para minimizar os efeitos negativos do resfriamento ou criopreservação de sêmen canino, bem como de substâncias com atividade tamponante que evitem variações de pH, propiciando pressão osmótica e concentrações de eletrólitos dentro dos parâmetros fisiológicos do sêmen canino [3, 8].

No entanto, a gema de ovo representa um risco em potencial de contaminação do diluente por microorganismos ou outras substâncias presentes, além desta diminuir a motilidade espermática [14] e dificultar a respiração celular [20].

A lipoproteína de baixa densidade (LDL) representa 68% da gema do ovo, sendo constituída de triglicerídeos, colesterol, fosfolípidos e proteínas, o que lhe confere a propriedade de ser um protetor das membranas celulares, podendo ser purificada e incluída nos diluentes para conservação de sêmen [1]. Estudos realizados mostraram que a LDL é a responsável pelo efeito crioprotetor da gema do ovo e pela manutenção da motilidade espermática após o armazenamento [4, 12, 14, 16, 21] prevenindo a perda de fosfolípidos pela membrana e aumentando a tolerância ao choque térmico, além de interagir com as proteínas BSP A1 e A2 presente no plasma seminal evitando a saída de lipídios da membrana espermática.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da substituição da gema do ovo por diferentes concentrações de LDL, adicionadas ao diluente TRIS-Glicose, como um crioprotetor das células espermáticas no processo de congelamento e descongelamento de sêmen canino.



2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados dois cães da raça Pastor Alemão, pertencentes ao Canil da Brigada Militar da cidade de Pelotas, sendo que os animais mantiveram sua dieta e rotina normal.

Para a extração da LDL, os ovos, previamente desinfetados com álcool, foram quebrados manualmente e a gema separada da clara. Após a separação, cada gema era rolada sobre um papel filtro para a remoção da chalaza e de restos de clara aderidos à membrana da gema. Esta então, era rompida com uma agulha e coletada em um becker imerso no gelo. Posteriormente, realizava-se a diluição da gema em solução salina isotônica (0,17M NaCl) homogeneizando a mistura durante 1 h. Logo após, centrifugava-se à 10000 g por 45 min a 4°C. Após coletado o sobrenadante, repetia-se a operação para a completa remoção dos grânulos. O sobrenadante oriundo da segunda centrifugação foi fixado e controlado o pH em 8,7 sendo misturado com 40% de sulfato de amônia durante 1 h à 4°C. Após, realizava-se outra centrifugação a 10000g a 4°C por 45 min separando o sobrenadante do sedimento. O sobrenadante desta centrifugação foi dializado por um período mínimo de 6 h em água destilada, para a eliminação do sulfato de amônia. A solução obtida era centrifugada e o sobrenadante rico em LDL era coletado. Então foi realizada a análise de matéria seca para determinar a quantidade a ser adicionada ao diluente. As coletas de sêmen foram realizadas através da técnica de manipulação digital [2], sendo coletados quatro ejaculados de cada animal num intervalo de 72 h. Imediatamente após a coleta, foram avaliados motilidade e vigor espermáticos. Foram utilizados no processo de congelamento somente os ejaculados com motilidade ≥ 80 e vigor ≥ 4 e frequência de anormalidades inferior a 20%. O sêmen fresco foi diluído em Tris-glucose na proporção 1:2 a temperatura de 30°C e resfriado até a temperatura de 20°C, sendo centrifugado a 800 xg por 5 min, sem variações na temperatura. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* de sêmen ressuspendido em 1 ml de Tris-glucose, e dividido em quatro alíquotas (0,25 ml) e adicionados a 0,25 ml dos diferentes tratamentos: tris glucose com gema de ovo 40% (T1), Tris-glucose com LDL 12% (T2), 16% (T3) e 20% (T4), ficando estes tratamentos na concentração final de 20%, 6%, 8% e 10%, respectivamente. As amostras foram submetidas a resfriamento lento durante 2 h, imersas em água, até chegar à temperatura de 5°C. Após atingir 5°C, era adicionado o diluente de congelamento específico para cada tratamento, suplementados com 10% de glicerol, ficando ao final na concentração de 5%. Passado 10 minutos era envasado em palhetas de 0,25 ml e estas colocadas no vapor de Nitrogênio líquido (N₂l), a 5 cm de distância, durante 10 min e, logo em seguida, armazenadas em botijões com N₂l.

O descongelamento era realizado, no mínimo dois dias após o congelamento, em banho-maria à 70 °C por 6 segundos e diluído 1:4 em Tris-Glucose à 37°C, sendo avaliados motilidade e morfologia espermáticas e funcionalidade da membrana através do choque hiposmótico (Chipo). A avaliação do efeito dos tratamentos foi realizada através de análise de variância com medidas repetidas, com comparação das médias pelo método LSD (Statistix²).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, no sêmen fresco e pós-diluição, nos parâmetros de motilidade e morfologia. Após o

descongelamento, observou-se que a motilidade no T1 foi inferior ($P < 0,01$) aos demais tratamentos e que estes não diferiram entre si. Apesar da motilidade estar reduzida no T1, T2, T3 e T4 (Tabela 1), ao descongelamento, esta se manteve na faixa aceitável para a realização da Inseminação Artificial [3], assemelhando-se aos resultados obtidos em outros protocolos [6, 13, 19]. O decréscimo na motilidade deve-se a uma soma de fatores como o choque térmico provocado pela queda da temperatura [7], a ação do glicerol, devido ao limite estreito entre seus efeitos tóxicos e protetores sobre a célula [5], ou seja, devido aos danos oriundos dos próprios processos de congelamento e descongelamento.

Tabela 1 – Média da motilidade (%) do sêmen canino fresco, pré-congelamento e descongelamento.

Tratamento	Sêmen Fresco	Pré congelamento	Descongelamento
T1	85 ^a	76,25 ^a	45,00 ^a
T2	85 ^a	77,50 ^a	60,00 ^b
T3	85 ^a	78,75 ^a	62,50 ^b
T4	85 ^a	80,00 ^a	60,00 ^b

Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,01$)

Na avaliação de integridade de membrana (Fig. 1), T2, T3 e T4 não diferiram ($P > 0,05$) entre si e foram superiores ($P < 0,05$) ao T1. Esta avaliação demonstra que a membrana ficou intacta nestes espermatozóides, após o descongelamento, pois, em caso de alterações, a mesma não responderia ao Chipó [17], o que apresenta impacto na eficiência do processamento seminal, pois a célula espermática necessita estar com sua membrana funcional para viabilizar o sêmen garantido assim o sucesso da fertilização [10, 11].

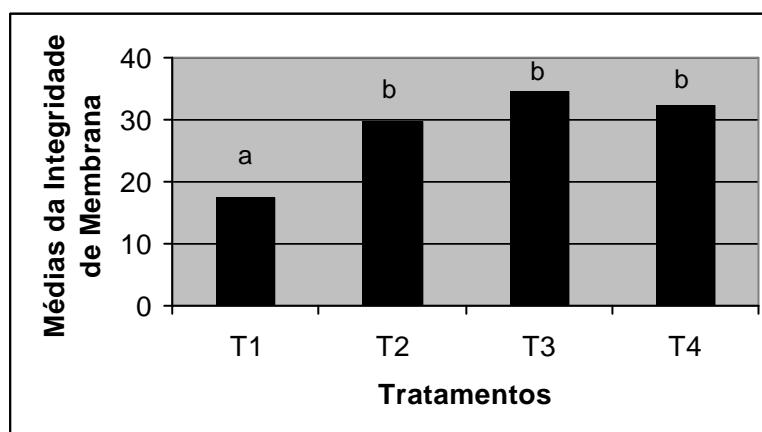


Figura 1 - Médias da integridade de membrana (%) após o descongelamento do sêmen canino conservado nos quatro tratamentos.

4. CONCLUSÕES

Os resultados deste experimento demonstram que a utilização do LDL melhora o efeito crioprotetor em relação à gema de ovo, no congelamento do sêmen canino, pois a motilidade e a funcionalidade da membrana pós-descongelamento foram superiores nos tratamentos com LDL.



5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANTON, M.; MARTINET, M.; DALGALARRONDO, V.; BEAUMAL, V.; DAVID, BRIAND, E.; RABESONA, H. Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. **Food Chemistry**. 2003.
- [2] CHRISTIANSEN, I. J. Reprodução no cão e no gato. SP. ed. **Manole**, 1986. p.363.
- [3] CONACANNON, P.W., BATISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: **CURRENT veterinary therapy**, 10. Philadelphia W. B. Mosby, 1989, p.1247-1259.
- [4] DEMANIOWICZ, W.; STRZEZEK, J. The effect of lipoprotein fraction from egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. **Reprod. Dom. Anim.**, 1996. v.31, p.279-80.
- [5] ENGLAND, G. C. W., Cryopreservation of dog semen: a review. **J. Reprod. Fertil.** 1993. v.47, p.243-255.
- [6] FARSTAD, W; ANDERSEN-BERG, K.; Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. **J. Reprod. Fertil.** 1989.v.39, p.289-292.
- [7] FARSTAD, W. Semen criopreservation in dogs and foxes. **Anim. Reprod. Sci.** 1996. v.42, p. 251-260.
- [8] FONTBONNE, A. L. insemination artificielle dans lespece canine. **Assosiation pour l'etude de la reproduction animale**. 1993. v.16.
- [9] HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, 2000. v.53, p.47-58.
- [10] JEYENDRAN R.S., VAN DER VEN H.H., PEREZ-PAEZ M, CRABO B.G. AND 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.
- [11] KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test **Theriogenology**. 1993. v.39. p.1279-1289,
- [12] MOUSSA, M.; MARINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**. 2002. v.57, p.1695-1706.
- [13] MORTON, D.B.; BRUCE, S.G. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. **J. Reprod. Fertil.** 1989. v.39, p.311-316.
- [14] PACE, M.M., GRAHAM, E. F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. **J. Anim. Sci.** 1974. v.39, p.1144-9.
- [15] PHILLIPS P, LARDY AL. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. **J Dairy Sci.** 1940. v.23. p.399-40.
- [16] QUINN, P.J.; CHOW, P.Y.W. Evidence that phospholipids protectors spermatozoa from could shock at a plasma membrane site. **J. Reprod. Fertil.** 1980. v.60. p. 403-7.
- [17] SAACKE R.G. AND ALMQUIST J.O. Freezing-drying of bovine spermatozoa. **Nature** 1961. p.995-998.
- [18] SHANNON, P.; CURSON, B. Effect of egg yolk levels on the fertility of diluted bovine sperm stored at ambient temperatures. **N Z J Agric Res** 1983. v.26. p.187-189.



[19] SILVA, L.D.M.; VERSTEGEN, J.P. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**, 1995. v.44, p.571-579,.

[20] TOSIC, P.H.; WALTON, A. Effects of egg yolk and its constituents on the respiration and fertilizing capacity of spermatozoa. **J. Agric. Sci.** 1946. v.37 p.69-76.

[21] WATSON, P. F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. **J.Reprod.Fertil.**1981. v.62. p.483-492

XIII
CIC
CONGRESSO
DE INICIAÇÃO
CIENTÍFICA

VI ENPOS
ENCONTRO DE
PÓS-GRADUAÇÃO

outubro | 2004