



## EFEITO DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE DA GEMA DO OVO SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN CANINO RESFRIADO A 5°C

Corcini, C.D.<sup>1\*</sup>; Varela Junior, A. S.<sup>1</sup>; Ulguin R.R.<sup>1</sup>; Bianchi, I.<sup>1</sup>; Alvarenga M.V.F.<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.

\* [ccorcine.fv@ufpel.edu.br](mailto:ccorcine.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

### INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas tem aumentado a utilização de sêmen diluído e resfriado para a utilização na inseminação artificial em cães. Diferentes tipos de diluentes foram avaliados para preservar o espermatozóide [3, 6]. Os diluentes que apresentaram melhores resultados na preservação do espermatozóide canino a 5°C são acrescidos de gema de ovo [6], sendo esta a responsável por proteger a célula espermática contra o choque térmico [9]. Foi sugerido por diversos autores que a fração lipoprotéica de baixa densidade (LDL) presente na gema é a responsável pelo efeito crioprotetor durante os processos de congelamento e resfriamento dos espermatozóides de mamíferos [2, 5, 14, 16], em função das lipoproteínas associarem-se com a membrana espermática [17, 18], prevenindo a perda de fosfolipídios [2, 12] e colesterol [2] estabilizando, desta forma, a membrana. Entretanto, na gema de ovo, existem substâncias que inibem a respiração mitocondrial e motilidade [11, 15]. A substituição da gema do ovo pela LDL pode trazer benefícios na qualidade das doses inseminantes, já que a LDL tende a melhorar as características qualitativas espermáticas, quando comparado com diluentes contendo a gema de ovo integral [1, 2, 8, 10].

Este trabalho avalia o efeito da substituição da gema de ovo pela LDL, em três concentrações (6, 8 e 10%), no diluente Tris-Glucose, sobre a qualidade do sêmen canino acondicionado à 5°C.

### MATERIAIS E MÉTODOS

#### Purificação da LDL da gema de ovo:

Primeira Etapa – Os ovos foram quebrados manualmente e as gemas separadas das claras. Cada gema foi colocada sobre um papel filtro para remoção da chalaça e traços de clara aderida à membrana vitelínica. Esta foi rompida e a gema coletada em um Becker resfriado em gelo.

Segunda Etapa – Separou-se a fração plasmática da gema, método descrito por McBee e Cotterill [9], onde a gema de ovo é diluída duas vezes com solução salina isotônica (0,17 M NaCl) e misturada por uma hora. Posteriormente é centrifugada por 45 minutos à 4°C por 10.000 x g, e o sobrenadante é centrifugado novamente para remover completamente os grânulos.

Terceira Etapa – Extração da LDL do plasma da gema do ovo, técnica descrita por Moussa [10], o plasma é misturado com o Sulfato de amônia à 40% por 1 hora para precipitar, o pH é fixado e controlado a 8,7 e a temperatura à 4°C. Em



seguida é centrifugado a 10.000 x g por 45 minutos à 4°C e o sobrenadante residual, rico em LDL, é coletado para ser dializado por pelo menos 6 horas com água destilada, para eliminar o sulfato de amônia. Após, é centrifugado a 10.000 x g por 45 minutos e o sobrenadante residual, rico em LDL, é coletado.

**Preparação dos diluentes:** Foi utilizado como diluente base o Tris Glucose (TG) [6] que é composto de tris hidroximetil aminometano (3,025g), Acido cítrico (1,7g), glicose (1,25g), benzilpenicilina (100mg), sulfato de dihidrostreptomomicina (100mg) e diluído em água destilada e deionizada. Com um pH e osmolalidade de 6,9 e 380 mOsm, respectivamente. A diferença entre os diluentes foi determinada pela adição de 40% de gema de ovo (controle), 12, 16 e 20% de LDL da gema de ovo e estas concentrações foram determinadas considerando o fato de que, no momento desta diluição, as células espermáticas estarão diluídas em uma fração de TG puro que será adicionada a cada um dos diluentes numa proporção de 1:1, reduzindo a concentração destes componentes aos valores desejados (20% gema de ovo, 6, 8 e 10% LDL).

**Animais e coleta seminal:** No presente estudo foram utilizados 4 cães adultos da raça Cocker Spaniel. O sêmen foi coletado através de manipulação digital [3], em tubos cônicos graduados sendo coletado as três frações do ejaculado separadamente, respeitando um intervalo mínimo de uma semana entre as coletas e totalizando 5 coletas para cada animal (20 ejaculados). Durante a coleta, somente a segunda fração do ejaculado, rica em espermatozóides, foi retida tendo suas características macroscópicas (aspecto, volume e cor) avaliadas logo após cada coleta, e em seguida, sua motilidade e vigor avaliados sendo separada amostra para avaliação morfológica posterior, os ejaculados que apresentaram valores inferiores a 80% de motilidade e vigor 4 foram descartados.

**Processamento seminal:** Cada ejaculado foi diluído em igual volume de TG puro em condições isotérmicas. As frações diluídas foram submetidas à centrifugação a 800 rpm por 5 minutos para separação do plasma seminal e o *pellet* de células espermáticas novamente diluído em 6 ml de TG puro, sendo em seguida avaliado sua motilidade e vigor e coletado amostra para avaliação morfológica. Este total é dividido em quatro alíquotas de 1,5 ml, destinadas à diluição de 1:1 em cada um dos quatro diluentes, obtendo assim as concentrações desejadas de gema de ovo e LDL (20% gema e 6,8,10% LDL). Para o resfriamento as amostras foram estabilizadas à 25°C por 2 h e em seguida resfriadas à 5° C.

**Avaliação da qualidade espermática:** As avaliações realizadas no sêmen diluído e resfriado tiveram o objetivo de estimar o desempenho do diluente TG frente à substituição da gema do ovo pela LDL em diferentes concentrações. Foram realizadas avaliações de motilidade [13], morfologia espermática [4] e teste do Choque Hipoosmótico – CHIPO [7], sendo estas repetidas a cada 24h pelo período de 96 h, e as avaliações de motilidade continuaram sendo repetidas até que fossem encontrados valores inferiores a 50% de motilidade para a avaliação do tempo Máximo de Duração (MD) de cada amostra.

**Análise estatística:** Foram geradas estatísticas descritivas e distribuições de freqüências. Também foi realizada análise de variância com medidas repetidas e feita a comparação entre médias através do teste LSD, através do programa STATISTIX (2004).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante os 4 períodos, a avaliação da Motilidade (MOT) no tratamento Tris-Glucose com 20% de gema de ovo (T1) foi menor ( $P < 0.01$ ) que os tratamentos Tris-Glucose com 6, 8 e 10% de LDL (T2, T3 e T4 respectivamente), mas a MOT não



diferiu ( $P > 0.05$ ) entre estes 3 tratamentos (Tabela 1). A integridade de membrana foi inferior no T1 ( $P < 0.01$ ) quando comparada aos T2 e T3 em todos os períodos e também foi inferior ao T4 ( $P < 0.01$ ) nas 24, 48 e 96 h (Tabela 2), mas T2, T3 e T4 não diferiram entre si ( $P > 0.05$ ).

A duração máxima de T1, T2, T3 e T4 foram de 152,6, 204,4, 212,1 e 200,6 horas sendo que T2, T3 e T4 não diferiu entre si ( $P > 0.05$ ), mas T1 foi inferior ( $P < 0.01$ ) em relação a estes tratamentos.

Tabela 1: Motilidade espermática (%) do sêmen canino por tratamento e período de estocagem

Tratamentos	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
TG com 20% de gema de ovo	87.0 <sup>a</sup>	79.0 <sup>a</sup>	73.7 <sup>a</sup>	68.2 <sup>a</sup>	61.5 <sup>a</sup>
TG com 6% de LDL	86.5 <sup>a</sup>	83.5 <sup>b</sup>	83.0 <sup>b</sup>	76.5 <sup>b</sup>	70.5 <sup>b</sup>
TG com 8% de LDL	88.5 <sup>a</sup>	86.5 <sup>b</sup>	83.5 <sup>b</sup>	81.5 <sup>b</sup>	75.5 <sup>b</sup>
TG com 10% de LDL	87.0 <sup>a</sup>	83.5 <sup>b</sup>	81.7 <sup>b</sup>	76.5 <sup>b</sup>	70.0 <sup>b</sup>

Letras diferentes, na mesma coluna, representam diferença ( $P < 0,01$ ).

Tabela 2: Médias da Integridade de membrana do sêmen canino por tratamento e período de estocagem

Tratamentos	24 h	48 h	72 h	96 h
TG com 20% de gema de ovo	46.2 <sup>a</sup>	43.9 <sup>a</sup>	42.7 <sup>a</sup>	35.0 <sup>a</sup>
TG com 6% de LDL	62.6 <sup>b</sup>	57.0 <sup>b</sup>	54.2 <sup>b</sup>	45.3 <sup>b</sup>
TG com 8% de LDL	59.1 <sup>b</sup>	55.0 <sup>b</sup>	54.0 <sup>b</sup>	47.0 <sup>b</sup>
TG com 10% de LDL	57.3 <sup>b</sup>	54.0 <sup>b</sup>	49.4 <sup>ab</sup>	45.1 <sup>b</sup>

Letras diferentes, na mesma coluna, representam diferença ( $P < 0,01$ ).

Estes resultados demonstraram que a LDL pode substituir a gema de ovo, no diluente TG para diluição de sêmen canino, pois teve melhores resultados na motilidade, integridade de membrana e no tempo de duração máxima, resultados obtidos também nas espécies bovina [10] suína [5] e ovina [18]. Desta forma podemos afirmar que a utilização da LDL purificada em substituição a gema integral é benéfica para o acondicionamento de sêmen destas espécies.

Devido à temperatura ser de 5°C, pode utilizar refrigeradores domésticos, difundindo ainda mais a utilização da inseminação artificial em dínicas veterinárias de pequenos animais.

Já em relação à morfologia não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3: Médias de espermatozoides normais na morfologia do sêmen canino por tratamento e período de estocagem.

Tratamentos	24 h	48 h	72 h	96 h
TG com 20% de gema de ovo	87.0	85.7	84.6	83.4
TG com 6% de LDL	87.3	85.9	85.0	83.3
TG com 8% de LDL	88.8	87.9	86.7	85.3
TG com 10% de LDL	87.7	86.6	86.2	84.1

Não houve diferença nos valores dentro da mesma coluna ( $P > 0,05$ ).

## CONCLUSÃO

Estes resultados demonstraram que a substituição da gema do ovo integral pela LDL nas concentrações de 6, 8 e 10%, adicionado ao diluente Tris-Glucose, melhora a qualidade do sêmen canino resfriado a 5°C por até 96h.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AMIRAT, L.; TAINURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GERARD, O.; COURTENS, J. L.; ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**. 2004. v.61,p. 895-907.
- [2] BERGERON, A.; CRÊTE, M.H.; BRINDLE, Y.; MANJUNATH, P. Low-density lipoprotein fraction from hen`s egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biol. Reprod**. 2004. v.70, p.708-717.
- [3] CHRISTIANSEN, I.J. Reprodução no cão e no gato. **Ed. Manole**, São Paulo-SP, 1986.
- [4] CORRÊA, M.N; MEINCKE, W; LUCIA JUNIOR, T., DESCHAMPS, J.C. Inseminação artificial em suínos. Ed. Marcio Nunes Corrêa. Pelotas-RS, 2001.
- [5] DEMANOWICZ, W.; STRZEZEK, J.The effect of lipoprotein fraction from egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of de semen in liquid state **Reprod. Dom. Anim**. 1996. v.31, p.279-280.
- [6] IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J. P. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. **Theriogenology**. 2001. v.55, p.671-684.
- [7] JULIANO, F; COLARES, T; TONIETO, S.R., *et al*. Choque Hiposmótico em espermatozóides suínos comparados aos testes convencionais de avaliação da qualidade espermática. **Cong. Lat. Am. de Suinocultura**, 2002
- [8] MANJUNATH, P.; NAUC, V., BERGERON, A; MENARD, M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biol. Reprod**. 2002. v.67, p.1250-1258.
- [9] MCBEE L.; COTTERILL O. Ion exchange chromatography and electrophoresis of egg yolk. **J. Food Sci**. 1979. v. 44, pg. 656-660.
- [10] 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.
- [11] PACE, M.M.: GRAHAM, E.F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. **J.Anim. Sci**. 1974. v.39, p.1144-1149.
- [12] PARKS, J.E.; GRAHAM, J. K.; effects of cryopreservation procedures on sperm membranes **Theriogenology**. 1992. v.38, p.209-222.
- [13] PLATZ, C.C.; SEAGER, S.J.W. Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. **Lab. Anim. Sci**. 1977. v.27, n.6, p.1013-1016,
- [14] QUINN P.J.; CHOW, P.Y.W.;Evidence that phospholipids protects spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. **J. Reprod. Fertil**. 1980. v.60 p.403-407.
- [15] 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.
- [16] TRIMECHE, A.; ANTON, M.; RENARD, P.; GARDEMER, G.TAINURIER, D. Quail egg yolk :A novel cryoprotactant for the freeze preservation off poitou jackass sperm. **Cryobiology**. 1996. v.34, p.385- 393.
- [17] 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.
- [18] WATSON, P. F. ; MARTIN, I. C. The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5 degrees C. **J. Biol. Sci**. 1975.. v.28, p.145-152.