



AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL APÓS CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO UTILIZANDO TREALOSE COMO DILUIDOR

GOULARTE, Karina Lemos¹; TONIETO, Rafael Adolfo¹; GASTAL, Gustavo Desire Antunes²; SCHIAVON, Raquel Schiavon²; GONÇALVES, Alexander²; SCHNEIDER, Jonas Rafael²; LUCIA, Thomaz, Jr¹.

^{1,2}Laboratório de Reprodução Animal, Faculdade de Veterinária/UFPel
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900. kgoularte@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) é uma valiosa ferramenta para programas de melhoramento genético e conservação de raças em ovinos. No entanto, esta técnica não é tão difundida nessa espécie, quando comparada a outras espécies domésticas, não somente devido ao fato dos baixos e irregulares índices de fertilidade, mas também à dificuldade na aplicação de melhorias, tais como o uso de sêmen congelado (Anel *et al.*, 2006). Salamon e Maxwell (2000) relataram que a célula espermática sofre alterações ultra-estruturais, bioquímicas e funcionais após passar pelo processo de criopreservação, o que conduz à queda na motilidade e perda da sua viabilidade dentro do trato genital. Apesar disto, consideráveis avanços têm sido obtidos no sentido de minimizar os efeitos do processo de preservação sobre a estrutura e função espermática (Gillan *et al.*, 2004).

Várias técnicas têm sido propostas para a avaliação das características estruturais e funcionais do ejaculado ovino, porém, até agora, nenhuma possui uma relação consistente com a fertilidade *in vivo* (Meara *et al.*, 2008). No entanto, para fecundar o oócito, a célula espermática deve apresentar integridade das membranas plasmática e acrossomal.

Os crioprotetores devem ser adicionados ao meio de congelamento para que haja uma proteção do espermatozóide durante a criopreservação e o descongelamento. Eles podem atuar na membrana da célula espermática, como a gema de ovo, permitindo a reconstituição de sua estrutura e função após o descongelamento (Moussa *et al.*, 2002). Ou, então, penetrar na membrana celular agindo intracelularmente, como faz o glicerol (Holt, 2000).

O dissacarídeo Trealose tem sido muito utilizado como um crioprotetor para espermatozóide (Dalimata & Graham, 1997), por ser capaz de resistir à desidratação ou ao congelamento em plantas e animais (Westh & Ramlv, 1991). Segundo Berlinguer *et al.* (2007), as propriedades protetoras da trealose foram mais do que evidenciadas na manutenção da capacidade de congelamento do espermatozóide *in vitro*, que é considerado como um ponto crucial na avaliação do procedimento de congelamento.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a integridade das membranas plasmática e acrossomal da célula espermática ovina, após sofrer congelamento em meio diluente contendo trealose.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas nove coletas de sêmen, em sete machos ovinos SRD (sem raça definida), durante os meses de maio e junho de 2008. Os animais foram mantidos em área pertencente ao Biotério Central (UFPEL – RS), manejados sob as mesmas condições ambientais. A coleta era realizada mediante o uso de vagina artificial previamente aquecida a 42°C, utilizando uma fêmea imobilizada como manequim.

Imediatamente após a coleta, o ejaculado era dividido em duas porções iguais e diluído em condições isotérmicas (1:1 v/v) em dois tratamentos: T1, com o diluente TRIS com inclusão de gema de ovo e glicerol; e T2: TRIS com inclusão de gema de ovo e trealose (100 mM). As amostras eram mantidas em tubos Falcon, imersos em um Becker contendo água em igual temperatura. A motilidade espermática foi determinada como o percentual de células com movimento progressivo visualizadas no campo do microscópio, com escala entre 0 e 100% (Bearden & Fuquay, 1997). Foi realizado o cálculo da concentração de espermatozóides, através de contagem na câmara de Neubauer, até uma concentração final de 100×10^6 por palheta de 0,25 mL. Após, as amostras eram mantidas a 5°C por duas horas (curva de resfriamento). Passado este período, era acrescentado glicerol nas amostras de T1, na concentração de 5%. Posteriormente, era feito o envase e fechamento das palhetas. Então, era realizada a curva de congelamento: as palhetas eram mantidas por 10 min no vapor de N₂L (-90°C) e após eram mergulhadas no N₂L e armazenadas no botijão. Para as avaliações subseqüentes, as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C durante 30 s (Maxwell, 1995) e, re-suspensas em tubo Falcon contendo 1,5 mL de solução de 2,9 g citrato de sódio em 100 mL de água deionizada.

A avaliação da integridade da membrana espermática foi realizada através das sondas fluorescentes Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídio (IP), conforme descrito por Harrison & Vickers (1990). A avaliação foi feita sob aumento de 400 x em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo – Brasil), com a contagem de 100 células por lâmina. As células que apresentavam fluorescência verde foram consideradas íntegras, enquanto as células apresentando fluorescência vermelha foram consideradas danificadas.

A avaliação da integridade do acrossoma foi baseada na técnica descrita por Kawamoto *et al.* (1999), com modificações subseqüentes. Inicialmente, as amostras (20 µl) foram centrifugadas a 16000 x g por 10 min e o sobrenadante desprezado. Após, o pellet era re-suspenso em 80 µl de PBS (*Phosphate Buffer Saline*), sendo a amostra agitada e centrifugada novamente a 16000 x g por 10 min. O sobrenadante era novamente desprezado e o pellet resultante re-suspenso em 20 µL de PBS a 1%. A partir dessas amostras, foram confeccionados esfregaços em lâminas. Depois de secas, as lâminas foram submersas em álcool etílico absoluto 95,55% por 5 min e depois novamente lavadas em PBS. Em uma sala escura, adicionaram-se às amostras, por 10 minutos, 20 µL de *Lectin from Arachis hypogaea FITC Conjugate* (20 mg/mL). Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água deionizada e drenadas. Após esse procedimento, adicionaram-se 10 µL de solução de Glicerol com PBS (9:1 v/v). As lâminas foram avaliadas sob aumento de 1000 x em

microscópio de epifluorescência. Após a contagem de 100 espermatozoides por lâmina, foram consideradas células com acrossoma íntegro (fluorescência verde no acrossoma). Quando toda a célula não era corada ou a coloração verde não era aparente, o acrossoma foi considerado intacto.

A integridade das membranas plasmática e acrossomal foram comparadas entre os tratamentos através de análise de variância com medidas repetidas, considerando também os efeitos do dia da coleta de sêmen, da interação entre coleta e tratamento e o efeito individual dos machos, agrupado no efeito do tratamento. Como estas duas respostas não seguiam distribuição normal, estas variáveis sofreram transformação arco-seno. As comparações entre médias foram feitas pelo método LSD (Statistix 8.0).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 mostra a média dos resultados de integridade de membrana pré-congelamento e pós-descongelamento e integridade de acrossoma pós-descongelamento.

Tabela 1: Média dos resultados de integridade de membrana pré-congelamento e pós-descongelamento e integridade de acrossoma pós-descongelamento.

| Tratamento | Integridade de membrana pré-congelamento % | Integridade de membrana pós-descongelamento % | Integridade de acrossoma pós-descongelamento % |
|------------|--|---|--|
| T1 | 51.730 | 13.984 | 21.667 |
| T2 | 48.032 | 14.968 | 20.778 |

Segundo Salamon & Maxwell (2000), apenas 20 – 30% dos espermatozoides permanecem biologicamente não danificados após o processo de congelamento e descongelamento. O dano ultraestrutural durante esse processo é acompanhado por mudanças bioquímicas ou diminuição do seu conteúdo vital. Assim, os dados de integridade de acrossoma pós-descongelamento tanto com a utilização de T1 quanto com a de T2 (21,6% e 20,7%, respectivamente) estão dentro dos parâmetros esperados.

A sobrevivência espermática é afetada pelo glicerol durante o processo de criopreservação (Anel *et al.*, 2003). Em diluentes sem glicerol, a motilidade espermática de carneiro foi maior na presença de trealose do que na de glicose, indicando um efeito crioprotetor do dissacarídeo (Molinia *et al.*, 1994).

A substituição do glicerol pela trealose como crioprotetor para congelamento de sêmen ovino obteve resultados similares (não diferindo estatisticamente) na avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal da célula espermática.

4. CONCLUSÕES

A utilização de trealose como crioprotetor para congelamento de sêmen ovino manteve a qualidade seminal após o descongelamento, conservando a integridade das membranas plasmática e acrossomal dentro de parâmetros comparáveis com os

obtidos com o glicerol, podendo então, ser utilizada para congelamento de sêmen ovino.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANEL, L., DE PAZ, P., ALVAREZ, M., CHAMORRO, C.A., BOIXO, J.C., MANSO, A., GONZALEZ, M., KAABI, M., ANEL, E. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. **Theriogenology**, 2003, 60, p. 1293–1308.
- ANEL, L., ALVAREZ, M., MARTINEZ-PASTOR, F., GARCIA-MACIAS, V., ANEL, E., PAZ, P. Improvement strategies in ovine artificial insemination. **Reproduction Domestic Animal**, 2006, suppl. 2, p. 30 – 42.
- BEARDEN, H.J., FUQUAY, J.W. Semen evaluation. IN: BEARDEN, H.J., FUQUAY, J.W. **Applied Animal Reproduction**, 1997, 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall, p. 677 – 689.
- BERLINGUER, F., LEONI, G.G., SUCCU, S., MOSSA, F., GALIOTO, M., MADEDDU, M., NAITANA, S. Cryopreservation of European Mouflon (*Ovis Gmelini* Musimon) Semen During the non-Breeding Season is Enhanced by the Use of Trehalose. **Reproduction Domestic Animal**, 2007, 42, p. 202–207
- DALIMATA, A.M., GRAHAM, J.K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, 1997, 48, p. 831-841.
- GILLA, L., CHIS MAXWELL, W.M., EVANS, G. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. **Reproduction, Fertility and Development**, 2004, 16, p. 447-454.
- HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal Reproduction and Fertility**, 1990, 88, p. 343 – 352.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, 2000, 62, p. 3-22.
- KAWAMOTO, A., KAZUTOMO, O., KISHIKAWA, H., ZHU, L., AZUMA, C., MURATA, Y. Two-color fluorescent staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrosomal status. **Fertility and Sterility**, 1999, 71, p. 497 – 501.
- MAXWELL, W.M.C., LANDERS, A.J., EVANS, G. Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubes. **Theriogenology**, 1995, 43, p. 1201-1210.
- MEARA, C.M.O., HANRAHAN, J.P., PRATHALINGAM, N.S., OWEN, J.S., DONOVAN, A., FAIR, S., WARD, F., WADE, M., EVANS, A.C.O., LONERGAN, P. Relationship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, 2008, 69, p. 513-522.
- MOLINIA, F.C., EVANS, G., CASARES, P.I., MAXWELL, W.M.C. Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, 1994, 36, 113-122.
- MOUSSA, M., MARINET, V., TRIMECHE, A. *et al.* 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.
- SALAMON, S., MAXWEL, W.M. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, 2000, 62, p. 77–111.

STATISTIX®. **Statistix® 8 Analytical Software**. User's manual. 396 p. Tallahassee. FL. 2003

WESTH, P., RAMLV, H. Trehalose accumulation in the tardigrade *Adorybiotus coronifer* during anhydrobiosis. **Journal of Experimental Zoology**, 1991, 258, 303-311.