



## ADIÇÃO DA GELATINA SOBRE A INTEGRIDADE DE ACROSSOMA E MOTILIDADE DO SÊMEN OVINO RESFRIADO

*PRADIEÉ, Jorgea<sup>1</sup>; CORCINI Carine Dahl<sup>1</sup>; GONÇALVES, Alexander de Oliveira <sup>1</sup>; SCHNEIDER, Jonas Rafael <sup>1</sup>; MENEGELLO, Stela Mari Gheller<sup>1</sup>; VARELA JUNIOR, Antonio Sergio<sup>2</sup>; LUCIA, Thomaz JR <sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Laboratório de Reprodução Animal, Faculdade de Veterinária- UFPel

<sup>2</sup> Instituto de Ciências Biológicas- FURG

Campus Universitário, Caixa postal 354, CEP 96010-900,

E-mail: jpradiee@veterinaria.med.br

### 1. INTRODUÇÃO

A inseminação artificial cervical em ovinos com o uso do sêmen congelado ainda apresenta baixa taxa de concepção pela diminuição da viabilidade espermática no processo de congelamento. Uma alternativa é o uso do sêmen resfriado, sendo prático e vantajoso economicamente, podendo ser utilizado na IA cervical (YÁNIZ, 2005). Para isso, é necessário um diluente que seja capaz de manter as células viáveis por um maior período de tempo sem perda na qualidade seminal.

A ressuspensão dos espermatozóides minimizaria os efeitos de aglutinação das células, isto pelo fato da sedimentação impedir que as células se mantenham em contato com os substratos, diminuindo as trocas entre os espermatozóides e o meio. Em experimentos conduzidos com sêmen de coelhos (LÓPEZ-GATIUS, 2005), a adição de gelatina ao diluente reduziu o gasto de energia pelo espermatozóide, em função da imobilização da célula, estendendo a viabilidade espermática por mais tempo, quando comparado com o diluente líquido. Como também permitiu que os espermatozóides se mantivessem em contato com os substratos energéticos e crioprotetor. Desta forma, as células espermáticas, mesmo resfriadas por 2 ou 3 dias, se mantinham distribuídas de forma uniforme no meio, evitando a necessidade de agitação manual, reduzindo o efeito da oscilação de temperatura e do pH (LÓPEZ-GATIUS, 2005). O diluente com gelatina, mesmo após resfriado, volta ao estado líquido em temperaturas próximas à temperatura corporal do ovino, sendo indicado para o deslocamento dos espermatozóides dentro do trato reprodutivo da fêmea.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição da gelatina sobre a integridade de acrossoma e motilidade espermática em ovinos.

### 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 8 carneiros, alojados na cabanha do Biotério (Universidade Federal de Pelotas) com fertilidade comprovada. Foram conduzidas quatro coletas de sêmen para cada macho. As coletas de sêmen foram realizadas com vaginal artificial. Foram avaliados motilidade e integridade de acrossoma durante quatro períodos, 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento. O sêmen foi armazenado em geladeira a 5°C, por 72 horas. Os diluentes utilizados foram diluente 1 (D1) era constituído de leite integral a 10%; 0,2g D-glucose; 50 mg estreptomicina em aproximadamente 100mL de água ultra pura e o diluente 2 (D2) a igual constituição do D1 porém acrescentado 1,5% de gelatina. Somente foram utilizados ejaculados que apresentaram motilidade  $\geq 80\%$  e vigor  $\geq 3$ .

A avaliação da integridade do acrossoma foi baseada na técnica descrita por Kawamoto et al. (1999), com modificações subseqüentes. Inicialmente, adicionou-se 20  $\mu$ L de IP (iodeto de propidium) a uma alíquota de 20  $\mu$ L de sêmen. Posteriormente, as amostras foram mantidas a 24°C por 3 min e, em seguida, centrifugadas duas vezes a 300 x g por 10 min para retirar todo excesso do corante. O sobrenadante foi desprezado, e o pellet resultante foi re-suspenso em 20  $\mu$ L de PBS (Phosphate Buffer Saline) a 1% (Uptima, Montluçon cedex – França). A partir dessas amostras, foram confeccionados esfregaços em lâminas. Depois de secas, as lâminas foram submersas em álcool etílico absoluto 95,55% (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO - USA) por 5 minutos e depois novamente lavadas em PBS. Em uma sala escura, adicionaram-se às amostras, por 10 minutos, 20  $\mu$ L de Lectin from *Arachis hypogaea* FITC Conjugate (20 mg/mL) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água deionizada e drenadas. Após esse procedimento, adicionaram-se 10  $\mu$ L de solução de Glicerol (Synth, Diadema, SP - Brasil) com PBS (9:1 v/v).

As lâminas foram avaliadas sob aumento de 1000x em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo - Brasil), através de excitação em filtro UV com excitações de 450-490 nm e emissão 520 nm. Após a contagem de 100 espermatozoides por lâmina, foram consideradas células com acrossomas íntegros aquelas que apresentavam fluorescência verde no acrossoma. Quando toda a cabeça da célula era corada de vermelho (indicativa de acúmulo de IP) e a coloração verde não era aparente, o acrossoma foi considerado danificado.

A avaliação da motilidade foi realizada com sêmen *in natura*. Nova avaliação foi feita após a incubação em banho-maria a 37°C por 10 min, com visualização de uma alíquota de 10 $\mu$ L, em uma lâmina coberta por lamínula, ambas previamente aquecidas a 37°C, em aumento de 200 vezes em microscópio ótico com contraste de fases (Olympus BX41-PH-III América INC, São Paulo - Brasil). A motilidade foi determinada pelo percentual de células móveis identificadas no campo do microscópio, com escala entre 0 a 100% (BEARDEN E FUQUAY, 1997). Essa avaliação foi sempre realizada por um único técnico treinado.

A avaliação da motilidade espermática e integridade de acrossoma entre os tratamentos foram feitas através da análise de variância de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos (Statistix®, 2003).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) na motilidade espermática entre os tratamentos nas 72h de resfriamento (Tabela 1).

Os valores citados para motilidade espermática na 0h corroboram com os dados encontrados por Yániz et. al. (2005) onde acondicionaram o sêmen ovino a uma temperatura de 15° C por até 48 horas, porém os resultados de 24 e 48h deste trabalho diferem dos resultados do presente trabalho que teve a motilidade espermática diminuída com o aumento do tempo de armazenamento. Da mesma maneira, Salvador et. al. (2006) obteve com sêmen de caprinos maior motilidade espermática usando gelatina.

Resultados apresentados por Yániz et. al (2005), mostram que a proporção de motilidade de células e integridade de membrana foi significativamente menor para o controle do que para o tratamento utilizando gelatina no diluente nos períodos de 24 e 48h. Após 2h de armazenamento, a proporção de membranas intactas foi significativamente menor no controle do que utilizando gelatina, enquanto motilidade mostrou valores similares em ambos os grupos.

**TABELA 1.** Motilidade espermática nos diferentes diluentes durante o período de acondicionamento (média± erro padrão da média).

TRATAMENTO	Motilidade espermática (%)			
	0h	24h	48h	72h
Sem gelatina	73,0±16,43	64,48±17,23	52,06±25,60	31,05±20,78 <sup>B</sup>
Gelatina	76,78±15,64	69,28±16,98	57,85±20,06	51,90±16,0 <sup>A</sup>

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ).

Houve diferença estatística ( $P < 0,05$ ) para integridade de acrossoma nas 72h sendo que a maior média foi apresentada pelo tratamento contendo gelatina (66,25±17,51) (Tabela 2).

**TABELA 2.** Integridade de acrossoma nos diferentes diluentes durante o período de acondicionamento (média± erro padrão da média).

TRATAMENTO	Integridade de Acrossoma (%)			
	0h	24h	48h	72h
Sem gelatina	28,45±16,43	68,09±18,86	54,25±25,39	42,91±23,12 <sup>B</sup>
Gelatina	45,84±33,16	64,82±20,62	68,66±18,34	66,25±17,51 <sup>A</sup>

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ).

Resultados para integridade de acrossoma são demonstrados por Salvador et. al. (2006), utilizando sêmen de caprinos em diluente contendo gelatina em iguais períodos (0, 24, 48 e 72h) foram 89; 69; 60 e 50, respectivamente, mostrando-se maiores do que os apresentados neste trabalho. Enquanto Yániz, et. al. (2005) trabalhando com sêmen ovino diluído em gelatina obtiveram nas 24h 65,3% e nas 48h 63,15% nas taxas para integridade de membrana.

Assim, o armazenamento em meio sólido pode ter dois efeitos positivos: previne a sedimentação das células espermáticas e, conseqüentemente, reduz as

variações na composição do meio e imobiliza os espermatozoides, reduzindo as demandas metabólicas no movimento, enquanto preserva o potencial de fecundação (LÓPEZ-GATIUS, 2005).

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados deste experimento demonstraram que a gelatina pode ser utilizada no diluente para acondicionamento de sêmen ovino resfriado, sem prejuízos para a motilidade espermática nem para integridade de acrossoma até 72h. Indicando que poderia ser uma alternativa no processo de armazenamento no caso de utilização da IA cervical.

#### 5. BIBLIOGRAFIA

BEARDEN, H.J., FUQUAY, J.W. Semen evaluation. IN: BEARDEN, H.J., FUQUAY, J.W., **Applied Animal Reproduction**. 4<sup>th</sup> Ed. New Jersey: Prentice Hall, 677 – 689, 1997.

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**, 1999, 71, 497 – 501.

LÓPEZ-GATIUS, F.; SANCHES, G.; SANCHO, M.. Effect of solid storage at 15°C on subsequent motility and fertility of rabbit semen. **Theriogenology**, 2005, v.64, 252-260.

SALVADOR, I., YÁNIZ, J., VIUDES-DE-CASTRO, M.P., GÓMEZ, E.A., SILVESTRE, M.A. Effect of solid storage on caprine semen conservation at 5°C. **Theriogenology**, 2006, v.66, 974–981.

YÁNIZ, J., MARTÍ, J.I., SILVESTRE, M.A., FOLCH, J., SANTOLARIA, P., ALABART, J.L., LÓPEZ-GATIUS, F. Effects of solid storage on sheep spermatozoa at 15°C on their survival and penetrating capacity. **Theriogenology**, 2005, v. 64, 1844 -1851.