



EFEITO DE BLOQUEADOR SINTÉTICO DE GELO E LIPOSSOMAS DE LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE NO CONGELAMENTO DE SÊMEN DE GALOS

SCHENKEL, Moisés¹; CUNHA, Samuel Kabke da¹; SILVA, Janaína Madruga¹; MARTEN, Cíciane Pereira¹; DESCHAMPS², João Carlos; BONGALHARDO, Denise Calisto¹

¹Laboratório de Biotécnicas de Reprodução de Aves – Instituto de Biologia - UFPel

²Laboratório de Reprodução Animal - Faculdade de Veterinária – UFPel
Campus Universitário s/n – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900
Universidade Federal de Pelotas- Pelotas/RS - schenkel.moi@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Muitos trabalhos já foram realizados na tentativa de congelar o sêmen de aves (Lake & Ravie, 1984; Maeda et al., 1984; Buss, 1993; Tselutin *et al.*, 1995 e 1999; Wishart, 1997; Donoghue e Wishart, 2000), entretanto ainda não existe um protocolo que proporcione índices de fertilidade pós congelamento adequados para uso comercial. Melhorar as técnicas de criopreservação de sêmen de aves não só otimizaria o uso da técnica de inseminação artificial, como também possibilitaria a comercialização de sêmen de machos de elite (Bakst & Cecil, 1992; Blesbois & Grasseau, 1998).

Um dos principais problemas decorrentes do congelamento de sêmen é a ruptura da membrana plasmática devido à formação de cristais de gelo durante o processo de criopreservação. Alguns polímeros sintéticos vêm sendo utilizados nos diluentes para congelamento de embriões eqüinos (Curcio, 2005) e oócitos suínos (Macedo Jr et al., 2006), eqüinos (Leon, 2008), bovinos (Santos, 2008) e de camundongos (Fahy *et al.*, 2004; Santos, 2008) com a finalidade de bloquear a formação de gelo (Wowk *et al.*, 2000), impedindo que ocorram danos à membrana plasmática. A adição destes polímeros nos diluentes para criopreservação de sêmen de aves ainda não foi reportada na literatura.

Um componente comumente utilizado em diluentes de sêmen é a gema de ovo, que contém lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Anton *et al.*, 2003). A adição de LDL aos diluentes para congelamento mostrou-se benéfica para os espermatozóides de eqüinos (Martin, 2005) e caninos (Varela Junior, 2005). Em aves, foi demonstrado que o uso de proteolipossomas contendo principalmente fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina promove incrementos na motilidade e integridade de membrana do espermatozóide de galos após quatro horas de armazenamento à temperatura ambiente (Bongalharo & Buhr, 2002), enquanto a adição de lipossomas de LDL ao diluente de resfriamento melhorou a integridade da membrana espermática (Marten et al., 2007).

Esta pesquisa teve por objetivo avaliar o efeito da adição de bloqueador sintético da formação de gelo e de lipossomas de LDL ao diluente de congelamento sobre parâmetros *in vitro* (motilidade e integridade de membrana) dos espermatozóides de galos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O sêmen de 10 galos foi coletado através de massagem dorso-abdominal. Após a coleta, foi feito pool de sêmen e o volume foi medido em tubo coletor graduado. O volume total foi separado em 4 alíquotas e cada uma foi diluída 1:1 (vol:vol) com um dos seguintes tratamentos: T1) diluente de Lake (controle), T2) diluente de Lake + lipossomas de LDL, T3) diluente de Lake + bloqueador de gelo e T4) diluente de Lake + lipossomas de LDL + bloqueador de gelo. Foram separadas alíquotas de cada tratamento para avaliação de motilidade e integridade de membrana. À seguir, as amostras foram refrigeradas à 5°C por 10 – 30 min.

Para o congelamento seguiu-se o protocolo descrito por Miranda et al. (2007), que utiliza 6% de dimetilacetamida (DMA) como crioprotetor. Após 1 min da adição de DMA, o sêmen é acondicionado em palhetas, que são submetidas ao vapor de nitrogênio por 1 min antes de serem imersas no nitrogênio líquido.

O LDL foi preparado à 6%, utilizando-se o protocolo simplificado de CORCINI et al. (2007): adicionou-se 6 ml de gema de ovo fresco em 94 ml de diluente de Lake; a mistura foi centrifugada à 10000 xg por 45 minutos por três vezes e o sobrenadante foi salvo e sonificado por 30 min para a formação de lipossomas.

A motilidade foi observada subjetivamente numa escala de 0 à 100%; 10 µL de sêmen diluído foi colocado numa lâmina, coberto com lamínula e observado ao microscópio ótico. A integridade de membrana foi observada em microscópio fluorescente após a incubação dos espermatozóides com as sondas fluorescentes SYBR-14 e PI (iodeto de propídeo); os espermatozóides corados em verde foram considerados íntegros, enquanto os corados em vermelho ou com dupla coloração foram considerados não-íntegros.

Os dados de motilidade e integridade de membrana foram submetidos à ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. As análises estatísticas foram conduzidas através do software Statistix 8.0® (2003).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de motilidade e integridade de membrana são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Médias e erros padrão de motilidade e integridade de membrana de sêmen de galos congelado com ou sem lipossomas de LDL e bloqueador sintético da formação de gelo.

Tratamento ¹	Motilidade (%) ²	Integridade de Membrana (%) ²
T1	7,5 ± 4,3 ^b	6,7 ± 3,3 ^b
T2	9,2 ± 0,8 ^b	15,0 ± 10,4 ^b
T3	20,0 ± 5,0 ^b	25,0 ± 5,0 ^b
T4	56,7 ± 1,7 ^a	61,7 ± 10,1 ^a

¹ T1: controle, T2: diluente com lipossomas de LDL, T3: diluente com bloqueador sintético, T4: diluente com lipossomas de LDL e bloqueador sintético

² Média na mesma coluna com letras distintas foram diferentes (Tukey, p < 0,05)

Houve diferença significativa nas médias dos tratamentos, sendo que T4, contendo lipossomas de LDL e bloqueador sintético da formação de gelo, foi superior aos outros tratamentos tanto em motilidade quanto em integridade de membrana ($p < 0,05$). A adição isolada de lipossomas de LDL ou de bloqueador (T2 e T3, respectivamente) não promoveu incrementos nestes parâmetros quando comparados com o tratamento controle (T1), sugerindo que a estabilização da membrana plasmática promovida pela adição de lipossomas de LDL (T2) não é suficiente para proteger a célula espermática quando há a formação de gelo; da mesma maneira, o bloqueio da formação de gelo promovida pelo bloqueador sintético (T3) não é capaz de impedir os danos na membrana decorrentes do efluxo de fosfolipídios. Entretanto, os dois juntos (T4) promovem uma maior proteção do espermatozóide, diminuindo as injúrias sofridas pelo mesmo durante o processo de criopreservação.

Embora motilidade e integridade de membrana sejam indicadores *in vitro* do potencial de fertilização do sêmen, é sabido que outros atributos são necessários para que ocorra a fertilização (Amann e Hammerstedt, 1993). Entre estes atributos estão a habilidade do espermatozóide de ligar-se ao ovo, sofrer a reação acrosomal e liberar enzimas para hidrolisar a membrana perivitelina interna do ovo. Portanto, continuando esta pesquisa, testes de penetração espermática estão atualmente sendo conduzidos em nosso laboratório.

4. CONCLUSÃO

Podemos concluir que a adição de lipossomas de lipoproteínas de baixa densidade, em conjunto com o bloqueador sintético de gelo, preserva com mais eficiência a motilidade e integridade de membrana dos espermatozoides de galo submetidos à criopreservação.

5. AGRADECIMENTO

Ao CNPq pela bolsa de iniciação científica do primeiro autor.

6. BIBLIOGRAFIA

- ANTON, M.; MARTINET, V.; DALGALARRONDO, M.; BEAUMAL, V.; DAVID-BRIAND, E.; RABESONA, H. Chemical and structural characterization of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. **Food Chemistry**, v.83, p.175-183, 2003.
- AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H. *In vitro* evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of Andrology**, v.14, p.397-406, 1993.
- BAKST, M. R.; CECIL, H. C. Research note: effects of agitation and temperature changes on turkey sperm viability after twenty-four hour storage. **Poultry Science**, v.71, p.395-397, 1992.
- BLESBOIS, E.; GRASSEAU, I. Effects of *in vitro* storage (48 h at 2-5°C) on the lipid content of fowl semen. **International Symposium on Spermatology**, v. 8, p.117, 1998.
- BONGALHARDO, D. C.; BUHR, M. M. Proteoliposomes improve rooster sperm function. In: **91st Annual Meeting of the Poultry Science Association, Proceedings**. Newark, Delaware, 2002. p.106-107, 2002.

BUSS, E. G. Cryopreservation of rooster sperm. **Poultry Science**, v.72, p.944-954, 1993.

CORCINI, C. D.; CARVALHO, C.; PRESTES, R. C.; LAVADOURO, B. J. B.; JULIANO, F.; LUCIA Jr, T.; DESCHAMPS, J. C.; VARELA JUNIOR, A. S. Simplificação da purificação da lipoproteína de baixa densidade para a criopreservação de sêmen canino. In: **V Jornadas Técnicas de la Facultad de Veterinaria**. Montevideo, 2007.

CURCIO, B. R. **Maturação e vitrificação de oócitos eqüinos incubados em meio contendo hormônio do crescimento e fator de crescimento semelhante à insulina-I**. Pelotas, 2005. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pelotas, 2005.

DONOGHUE, A. M.; WISHART, G. J. Storage of poultry semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.213-232, 2000.

FAHY, G. M.; WOWK, B.; WU, J.; PAYNTER, S. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. **Cryobiology**, v.48, p.22-35, 2004.

LAKE, P. E.; RAVIE, O. An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. **British Poultry Science**, v.25, p.145-150, 1984.

LEON, P. M. M. **Oócitos eqüinos: maturação in vitro e vitrificação**. Pelotas, 2008. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas; 2008.

MACEDO JR, M. C.; DESCHAMPS, J. C.; LUCIA JR, T.; BORDIGNON, J.; SERRET, C. G.; RAMBO, G.; PIVATO, I.; SCHIMITT, E. In vitro penetration of fresh and vitrified swine oocytes by homologous spermatozoa using different incubation system. **Animal Reproduction Science**, v. 92, n. 3-4, p. 334-348, 2006.

MAEDA, T.; TERADA, T.; TSUTSUMI, Y. Comparative study of the effects of various cryoprotectants in preserving the morphology of frozen and thawed fowl spermatozoa. **British Poultry Science**, v.25, p.547-553, 1984.

MARTEN, C. P.; OLIVEIRA, E. B.; VAN DER LAAN, G. M.; DESCHAMPS, J. C.; BONGALHARDO, D. C. Resfriamento de sêmen de galos utilizando lipossomas de LDL. In: **XVI Congresso de Iniciação Científica da UFPel**, Pelotas, RS, 2007.

MARTIN, C. E. G. **Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre algumas características funcionais dos espermatozoides eqüinos criopreservados**. Pelotas, 2005. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pelotas, 2005.

MIRANDA, R. C.; OLIVEIRA, E. B.; CALDERAM, K.; CASTRO, T. F.; LAAN, G. M.; DESCHAMPS, J. C.; BONGALHARDO, D. C. Comparação entre forma de envase e temperatura de descongelamento de sêmen de galos criopreservado com dimetilacetamida. In: **Anais do XVI Congresso de Iniciação Científica e IX Encontro de Pós-Graduação da UFPel**. Pelotas, RS, 2007.

SANTOS, E. C.S. **Efeito dos métodos de vitrificação, OPS e SSV, com adição de bloqueador sintético de gelo, sobre a viabilidade de oócitos de camundongos e de bovinos**. Pelotas, 2008. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas; 2008.

STATISTIX 8.0, 2003. **Computer Program** – Analytical Software.

TSELUTIN, K.; NARUBINA, L.; MAVRODINA, T.; TUR, B. Cryopreservation of poultry semen. **British Poultry Science**, v.36, p.805-811, 1995.

TSELUTIN, K.; SEIGNEURIN, F.; BLESBOIS, E. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. **Poultry Science**, v.78, p.586-590, 1999.

VARELA JUNIOR, A. S. **Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre a qualidade do sêmen canino submetido à criopreservação**. Pelotas, 2005. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pelotas; 2005.

WISHART, G. J. Cryopreservation of avian spermatozoa. **Methods of Molecular Biology**, v.38, p.167-177, 1997.

WOWK, B.; LEITI, E.; RASCH, C. M.; KARIMI, N. B.; HARRIS, S. B.; GREFORY, M. F. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. **Cryobiology**, v.40, p.228-236, 2000.