

PRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE OVINOS DA RAÇA CRIOLA LANADA USANDO DIFERENTES ADITIVOS CRIOPROTETORES

PRADIEE, Jorgea¹; FERREIRA, Carlos Eduardo Ranquetat¹; GOULARTE, Karina Lemos¹; SILVA, Aline da Rosa,¹; LUCIA, Thomaz Jr.¹;

¹ Grupo de pesquisa ReproPel - PigPel - Faculdade de Veterinária – UFPel

Campus Universitário s/n – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900

Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS.

jorgeapradiee@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

Os ovinos da raça crioula lanada se desenvolveram na região sul do Brasil a partir das raças ovinas trazidas pelos colonizadores. Durante sua evolução, o processo de seleção zoológica lhe conferiu maior capacidade de tolerar endoparasitoses do que as raças ditas especializadas (BRICANELLO et. al., 2004). As vantagens adaptativas da raça crioula lanada sustentaram sua importante participação no desenvolvimento da pecuária riograndense até a introdução de novas raças. Após isso, um processo de cruzamento indiscriminado vem colocando em risco a manutenção destes animais que representam um importante patrimônio genético e de identidade cultural. Desta forma, é premente a necessidade de garantir a manutenção de bancos de material genético da raça crioula lanada para impedir sua total extinção.

Diferentes estudos já caracterizaram a sensibilidade dos espermatozoides ovinos ao processo de criopreservação, fato este que determina a necessidade pela busca de processos que minimizem os danos provocados pelo congelamento, aumentem as taxas de fertilidade e reduzam os riscos sanitários.

Durante o processo de criopreservação, os espermatozoides são submetidos a um grande estresse. Dentre os principais pontos a serem afetados, a membrana citoplasmática da célula é a primeira a sofrer danos pelo resfriamento. Como alternativa protetora, identificou-se a lecitina da gema do ovo e a caseína do leite. Durante muito tempo esses produtos vêm sendo utilizados com relativo sucesso, entretanto atualmente tem sido buscada uma alternativa de origem não animal, para reduzir riscos de transmissão de possíveis contaminantes. Neste sentido, produtos de origem vegetal como a lecitina da soja tem se mostrado promissora (FOROUNZANFAR et. al., 2010).

Além dos protetores externos de membrana, faz-se necessário reduzir danos provocados por radicais livres. Diferentes antioxidantes já foram adicionados ao sêmen na busca de reduzir os efeitos oxidativos, entretanto, os resultados nem sempre são consistentes pelo fato de tais agentes necessitarem de diferentes tipos de biotransformação para serem ativos. Uma alternativa seria a adição de agentes indutores da produção de antioxidantes intracelulares como a glutathiona. O β mercaptoetanol (BME) já demonstrou efeito positivo no aumento nos níveis de glutathiona em ovócitos ovinos (BAI, et.al. 2008), bovinos (de MATOS, et.al. 2000) e

suínos (ABEYDEERA, et.al. 1998), podendo ser uma alternativa promissora para criopreservação dos espermatozóides.

Como não existem informações suficientes a respeito da associação do BME em diluentes para criopreservação de sêmen ovino, este trabalho tem por objetivo determinar o efeito do uso do BME e da lecitina de soja sobre a viabilidade espermática após o congelamento de sêmen de ovinos da raça crioula lanada.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Como doadores de sêmen foram utilizados quatro machos ovinos adultos da raça crioula lanada, alojados nas instalações do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. Os animais foram submetidos a seis procedimentos de coleta (duas vezes por semana) no final da estação reprodutiva de 2010 (maio). Os animais foram coletados com o uso de vagina artificial, sendo procedidas as primeiras análises seminais no momento da coleta para utilização apenas de ejaculados com motilidade $\geq 70\%$ e vigor ≥ 3 (0-5). Após a determinação da concentração espermática em câmara de Neubauer, procedeu-se a constituição de um *pool* de sêmen com contribuições iguais entre os machos. Desse *pool* foram coletadas amostras para determinação da viabilidade espermática pré-congelamento.

Depois de constituído o *pool*, procedeu-se a diluição do sêmen nos diluentes de cada tratamento: Tris-gema sem BME (Trat 1), Tris-gema com BME (Trat 2), Tris-lecitina da soja sem BME (Trat 3) e Tris-lecitina da soja com BME (Trat 4). As concentrações foram ajustadas de modo que cada dose de sêmen congelado possuísse 100×10^6 espermatozóides em cada palheta com 0,25 mL.

As palhetas foram estabilizadas a 5°C durante duas horas antes de serem congeladas a -80°C em vapor de nitrogênio líquido e serem estocadas em botijão criogênico a -196°C .

Para avaliação, as palhetas de cada tratamento foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Após 10 minutos de estabilização, foram avaliados a motilidade e vigor espermático e recolhidas amostras para determinação dos parâmetros de viabilidade e realização das colorações especiais. As amostras foram mantidas em banho-maria a 37°C para avaliação da integridade metabólica dos espermatozóides. A integridade de membrana e de acrossoma mediante uso de sondas fluorescentes segundo Harrison e Vickers (1990) e Kawamoto *et al.* (1999), respectivamente. Sob microscopia de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC), os espermatozóides (100/tratamento) foram classificados de acordo com sua coloração para determinação da integridade de membrana (íntegros = corados em verde; ou lesados = corados em vermelho) e integridade de acrossoma (íntegro = corado em verde sem deformação do contorno).

Adicionalmente, foi realizada a determinação da integridade funcional de membrana através de teste hiposmótico segundo (Bucak et. al., 2007).

O experimento configura um fatorial 2×2 , sendo a avaliação da motilidade espermática e choque hiposmótico entre os tratamentos foi feita através da análise de variância de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos, e integridade de membrana e acrossoma foi realizada análise de variância ANOVA usando software Statistix® (2009).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Imediatamente após o descongelamento, foi observado que as amostras dos tratamentos em que foi utilizada gema de ovo apresentaram uma tendência de melhor motilidade. Entretanto, neste momento as taxas de motilidade foram semelhantes ($P>0,05$) entre todos os tratamentos (Tabela 1). Já no segundo momento de avaliação (1 h), as amostras em que foi utilizada a gema associada ao BME apresentaram uma maior ($P<0,05$) motilidade do que os tratamentos a base de lecitina com e sem BME (Tabela 1). No momento 2 h, os tratamentos a base de gema demonstraram uma leve redução na motilidade em relação ao momento 1 h. Entretanto, nestes tratamentos não foi evidenciado efeito da adição do antioxidante BME. Já nos tratamentos a base de lecitina da soja, observou-se um maior comprometimento da motilidade das amostras no momento 2 h em relação ao momento 1 h. Nos dois tratamentos a base de lecitina observou-se uma tendência de maior comprometimento da motilidade no tratamento em que foi adicionado o BME (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados (médias e desvio padrão) de atividade metabólica (motilidade) após incubação das amostras dos diferentes tratamentos nos momentos 0, 1 e 2 horas pós-descongelamento.

Tratamento	BME	Motilidade pós-descongelamento		
		0 h	1 h	2 h
Gema	+	45,0 ± 13,8 ^a	36,7 ± 15,0 ^{ab}	33,3 ± 13,7 ^a
Gema	-	38,3 ± 14,7 ^{ab}	36,7 ± 10,3 ^a	31,7 ± 11,7 ^{ab}
Lecitina	+	20,0 ± 0,0 ^b	11,7 ± 7,5 ^c	1,7 ± 4,1 ^c
Lecitina	-	26,7 ± 13,7 ^{ab}	13,3 ± 8,2 ^{bc}	5,0 ± 8,4 ^{bc}

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P<0,05$).

Os resultados obtidos com o uso da lecitina da soja neste estudo contrastam com os resultados observados por outros pesquisadores (Aires et. al., 2003; Forounzafar *et al.*, 2010) que obtiveram melhores resultados pós-descongelamento com lecitina da soja do que com gema de ovo.

Nas avaliações morfológicas observou-se um importante comprometimento da viabilidade espermática pré e pós-congelamento.

Nas avaliações de integridade de membrana, de acrossoma e de integridade funcional da membrana no teste hiposmótico pós-congelamento não foram observadas diferenças entre os tratamentos.

4 CONCLUSÕES

O uso do antioxidante β -mercaptoetanol não demonstrou interferência na qualidade do sêmen congelado com gema de ovo. Entretanto, o uso do β -mercaptoetanol associado a lecitina da soja comprometeu a viabilidade espermática em relação aos tratamentos com gema de ovo, não sendo recomendada essa associação para criopreservação de sêmen de ovinos da raça crioula lanada.

5 REFERÊNCIAS

AIRES, V.A., HINSCH, K.D., MUELLER-SCHLOESSER, F., BOGNER, K., MUELLER-SCHLOESSER, S., HINSCH, E. In vitro and in vivo comparison of egg

yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology**, v.60, p. 269-279, 2003.

BAI, J., HOU, J., GUAN, H., YAN, F., CUI, X., LIU, L., WANG, S., AN, X. Effect of 2-mercaptoethanol and cysteine supplementation during in vitro maturation on the developmental competence of oocytes from hormone-stimulated lambs. **Theriogenology**, v. 70, p. 758–764, 2008.

BRICARELLO, P. A., GENNARI, S. M., OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G., VAZ, C. M. S. L., GONÇALVES DE GONÇALVES, I.; ECHEVARRIA, F. A. M.. Worm burden and immunological responses in Corriedale and Crioula Lanada sheep following natural infection with *Haemonchus contortus*. **Small Ruminant Research**, v.51, p. 75-83, 2004.

BUCAK, M. N.; ATESSAHIN, A.; VARISLI A, O.; YUCE, A.; TEKIN, N.; AKCAY, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen Microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. **Theriogenology** v. 67, p.1060–1067, 2007.

BUCAK, M.N.; ATESSAHIN, A.; YUCE, A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. **Small Ruminant Research**, v. 75, p. 128–134, 2008.

FOROUZANFAR, M.; SHARAFI, M.; HOSSEINI, S.M.; OSTADHOSSEINI, S.; HAJIAN, M.; HOSSEINI, L.; ABEDI, P.; NILI, N.; RAHMANI, H.R.; NASR-ESFAHANI, M.H. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders of cryopreservation of RAM semen. **Theriogenology**, v.73, p.480-487.2010.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 343-352, 1990.

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C.; SICHERLE, C. C.; SOUSA, D. B.; RODELLO, L. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. **Small Ruminant Research**, v.85, p.85–90, 2009.

MATOS, D.G., FURNUS, C.C. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: effect of p-mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology**, v.53, p.761-771, 2000.