

POTENCIAL CRIOPROTETOR DA GOMA XANTANA EM SÊMEN OVINO

**SILVA, Estela Fernandes¹; CARDOSO, Tainã Figueiredo¹; MION, Bruna¹;
GASTAL, Gustavo Desire Antunes¹; BIANCHI, Ivan¹.**

¹ *Laboratório de Reprodução Animal, Faculdade de Veterinária- UFPel
Campus Universitário s/n – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900
Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS. estela-fs@hotmail.com*

1 INTRODUÇÃO

A utilização de sêmen congelado para a inseminação artificial (IA) permite o transporte e o armazenamento prolongado do sêmen, contribuindo para a difusão do material genético de animais zootecnicamente superiores (Donovan *et al.*, 2004). Entretanto, a criopreservação causa danos que reduzem a motilidade, a viabilidade e prejudicam o transporte dos espermatozóides após a IA cervical (Salamon e Maxwell, 1995²), diminuindo as taxas de prenhes em ovinos. Um importante aspecto na redução de viabilidade trata-se das crioinjúrias à membrana plasmática tornando-a mais suscetível à ruptura e a penetração de íons. Estas alterações interferem significativamente na sobrevivência e capacidade fecundante dos espermatozóides (Martin, 1968; Maxwell e Watson, 1996). A fim de minimizar os danos inerentes à criopreservação, a descoberta de novos crioprotetores se justifica. Uma macromolécula, o polissacarídeo de *Gynostemma Pentaphyllum* (espécie vegetal) demonstrou resultados promissores como crioprotetor de sêmen suíno (Hu *et al.*, 2009). Nesse contexto, a goma xantana, um polissacarídeo viscoso e de alto peso molecular, amplamente utilizada na indústria alimentícia, ganha destaque para os alimentos congelados, por diminuir os danos causados pelo congelamento e descongelamento nas células vegetais (Weber *et al.*, 2008). Assim, poderia ser associada ao diluidor de sêmen ovino atuando como crioprotetor. Dessa forma, a goma xantana realizaria proteção externa mantendo principalmente a integridade da membrana plasmática. A utilização desse polissacarídeo na criopreservação de sêmen ovino ainda não foi relatada na literatura científica. Assim sendo, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial crioprotetor da goma xantana sobre a integridade da membrana plasmática e motilidade de espermatozóides ovinos.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Utilizaram-se 7 carneiros para a coleta de sêmen através de vagina artificial. Esses animais estavam alojados nas dependências do Biotério Central da UFPel. Foram realizadas 8 coletas de cada ovino. Após a coleta, eram avaliados volume, aspecto, motilidade, vigor e concentração, sendo utilizados no experimento apenas os ejaculados que apresentavam motilidade $\geq 70\%$, vigor ≥ 3 (escala de 0 a 5) e concentração $\geq 2 \times 10^9$ espermatozóides por mL. Em seguida procedeu-se a primeira diluição com o diluente Tris-Gema-Glicerol (TGG) (Evans & Maxwell, 1987) na proporção de 1:1 (v/v), para todos os machos. Através da câmara de Neubauer determinou-se a concentração espermática. Retirou-se uma alíquota que contivesse $1,2 \times 10^9$ espermatozóides móveis e redilui-se para completar um volume de 0,5 mL (sêmen + TGG), sendo o volume de sêmen dependente da concentração apresentada por cada macho. Logo, a alíquota de 0,5 mL era adicionada ao volume

padrão dos tratamentos, de 2,5 mL, finalizando um volume de 3 mL. Um total de 4 tratamentos foram comparados: TGG: Tris-gema-glicerol sem goma xantana (controle); TGGX15: Tris-gema-glicerol com 0,15% de goma xantana; TGGX20: Tris-gema-glicerol com 0,20% de goma xantana; TGGX25: Tris-gema-glicerol com 0,25% de goma xantana.

Depois da formação dos 4 tratamentos, previamente ao envase, o sêmen foi avaliado para obtenção dos parâmetros pré-congelamento de motilidade e vigor e integridade de membrana. A avaliação de motilidade e vigor ocorreu em lâmina sob lamínula aquecida a 37°C (Bearden & Fuquay, 1997; CBRA, 1998) e a avaliação de integridade de membrana plasmática através das sondas diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio em microscopia de fluorescência (Harrison & Vickers 1990). O envase foi realizado em palhetas de 0,25 mL (IMV® Technologies, L'Aigle, France) com 1×10^8 espermatozoides móveis. O congelamento ocorreu em equipamento automático de congelamento (TK 3000®, Uberaba, MG, Brasil) e em seguida armazenou-se as palhetas em nitrogênio líquido. O descongelamento ocorreu em banho maria a 36°C durante 30 segundos após o mínimo de 7 dias de armazenagem, utilizando sempre duas palhetas de cada tratamento e de cada macho. Após 10 minutos de incubação, procediam-se as mesmas avaliações realizadas no sêmen fresco: motilidade e vigor e avaliação de integridade de membrana plasmática. As análises estatísticas foram realizadas através do software STATISTIX®9 (2008).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre o controle e os demais tratamentos pré-congelamento (Tab. 1). Porém, pós-descongelamento (Tab. 2) o tratamento TGGX25 diferiu estatisticamente ($P < 0,05$) do controle apenas em relação à motilidade. Entretanto, os valores das médias para integridade de membrana pós-descongelamento nos grupos que utilizaram goma xantana foram numericamente superiores em relação ao controle, principalmente o grupo TGGX15 ($28,9\% \pm 2,3$). Apesar de não haverem estudos associados ao sêmen com a goma xantana pode-se fazer uma analogia a outro biopolímero, a gelatina, por compartilharem propriedades como a viscosidade. Assim, para sêmen ovino resfriado a 15°C, em estudo de Yániz *et al.*, (2005) verificou-se que o percentual de membranas íntegras foi significativamente maior nos tratamentos contendo gelatina que no controle (sem gelatina). Porém, no estudo de Yániz *et al.*, (2005) o sêmen não foi submetido a temperaturas negativas evitando a faixa crítica da criopreservação (entre -15°C e -25°C) na qual ocorre a maioria dos danos espermáticos (Salamon e Maxwell *et al.*, 1995¹). Assim, a goma xantana poderia exercer maior ação crioprotetora sobre as membranas espermáticas, por ter ocorrido o congelamento e o descongelamento.

Contudo, nota-se uma diminuição da motilidade pós-descongelamento, à medida que a concentração de goma xantana aumenta. Desse modo, TGGX20 e TGGX25 obtiveram os desempenhos mais baixos ($21,9\% \pm 2,6$ e $20,3\% \pm 2,6$, respectivamente). Comparando-se à gelatina, López-Gatius *et al.*, (2005) em estudo de sêmen de coelho resfriado a 15°C obteve motilidade significativamente maior nos tratamentos contendo gelatina em relação ao controle (sem gelatina). Yániz *et al.*, (2005) em estudo semelhante, porém com sêmen ovino, obteve uma motilidade significativamente maior (nos tratamentos contendo gelatina) após períodos de armazenamento de 24 e 48 h. Essas diferenças de motilidade entre a goma xantana

e a gelatina talvez se expliquem primeiramente porque no estudo com a gelatina não ocorreu o congelamento que seria responsável pela maioria das lesões espermáticas, contribuindo para a queda na motilidade. Além disso, diluentes contendo gelatina voltam ao estado líquido em função do aumento da temperatura. Assim, a incubação a 37°C (antes da avaliação) reverteu o estado sólido da gelatina aumentando a motilidade. Por outro lado, a viscosidade da goma xantana nas soluções praticamente não se altera com a temperatura entre 4 e 93°C. Desse modo, mesmo com a incubação a 37°C, as propriedades da goma foram mantidas contribuindo para a imobilização das células e conseqüentemente para a queda na motilidade.

Entretanto, a imobilização celular poderia ser vantajosa, por reduzir as demandas energéticas do movimento, preservando o potencial fecundante. Assim, testes que avaliem a atividade mitocondrial seriam convenientes para validar essa hipótese. Nesse contexto, seria interessante mais estudos a partir da concentração de 15% de goma xantana (TGGX15) para concentrações mais baixas, pois foi esse tratamento que menos interferiu na motilidade, mantendo ainda, a mais alta porcentagem de membranas íntegras (pré-congelamento e pós-descongelamento).

Tabela 1: Média e erro padrão para motilidade e integridade de membrana pré-congelamento.

Tratamento	Motilidade(%)	Membrana (%)
TGG	81,7 ± 3,3	67,5 ± 4,3
TGGX15	77,5 ± 3,3	64,3 ± 4,3
TGGX20	76,7 ± 3,3	58,5 ± 4,3
TGGX25	75,9 ± 3,3	59,6 ± 4,3

TGG – tratamento controle;

TGGX15 – tratamento com adição de 0,15% da goma xantana;

TGGX20 – tratamento com adição de 0,20% da goma xantana;

TGGX25 – tratamento com adição de 0,25% da goma xantana;

Tabela 2: Média e erro padrão para motilidade e integridade de membrana pós-descongelamento.

Tratamento	Motilidade(%)	Membrana (%)
TGG	31,4 ± 2,6 ^A	25,6 ± 2,3
TGGX15	25,7 ± 2,6 ^{AB}	28,9 ± 2,3
TGGX20	21,9 ± 2,6 ^{AB}	28,1 ± 2,3
TGGX25	20,3 ± 2,6 ^B	28,0 ± 2,3

TGG – tratamento controle;

TGGX15 – tratamento com adição de 0,15% da goma xantana;

TGGX20 – tratamento com adição de 0,20% da goma xantana;

TGGX25 – tratamento com adição de 0,25% da goma xantana;

Médias na coluna seguidas de diferentes letras diferem (P < 0,05).

4 CONCLUSÃO

A xantana não apresentou efeitos prejudiciais à integridade da membrana plasmática em nenhuma concentração testada. Logo, mostra uma possível nova fonte para realização de estudos referentes a crioprotetores externos para sêmen ovino.

5 REFERÊNCIAS

BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. **Semen evaluation**. In: BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Applied Animal Reproduction. 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. 159-170.

CBRA. 1998. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2^a Ed. Belo Horizonte: CBRA, 49.

DONOVAN, A; HANRAHAN, J. P.; KUMMEN, E. *et al.* Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed semen at a natural or synchronized oestrus. **Animal Reproduction Science**.vol.84, p. 359-368, 2004.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. 1987. **Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats**. Australia: Star Printery Pty Ltd, 1987, 194 p.

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

HU, J.H.; LI, Q.W.; ZHANG, T.; JIANG, Z.L. Effect of *Gynostemma Pentaphyllum* Polysaccharide on boar spermatozoa quality following freezing-thawing. **Cryobiology**, 59, 244–249, 2009.

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.

MARTIN, I.C.A. Milk and synthetic diluents for ram semen. In: International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination, 2, 1968, Paris. **Proceedings**. Paris, 1968, p.1619-1622.

MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.55-65,1996.

¹SALAMON, S.; MAXWELL W.M.C. Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v.37, p.185-249, 1995.

²SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, 38, 1-36, 1995.

WEBER, F.H.; QUEIROZ, F.P.C.; CHANG, Y.K. Estabilidade de géis de amido de milho normal, ceroso e com alto teor de amilose adicionados de gomas guar e xantana durante os processos de congelamento e descongelamento. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, 28, 413-417, 2008.

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