

AVALIAÇÃO *in vitro* DA TREALOSE COMO CRIOPROTETOR PARA SÊMEN OVINO CONGELADO

**GOULARTE, K.L.¹; TONIETO, R.A.¹; GASTAL, G.D.A.²; SCHIAVON, R.S.²;
GONÇALVES, A.O.²; SCHNEIDER, J.R.^{2*}; LUCIA, T. Jr³.**

^{1,2}*Laboratório de Biotécnicas da Reprodução CENBIOT/UFPeI*

³*Professor Adjunto Faculdade de Veterinária/UFPeI*

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, devido não somente aos 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 nenhuma até agora possui uma relação consistente com a fertilidade *in vivo* (MEARA et al., 2008). No entanto, para fecundar o ovócito, a célula espermática deve apresentar motilidade progressiva e integridade das membranas plasmática e acrossomal.

Segundo Alberti (2004) o meio diluente e o crioprotetor são utilizados com o intuito de proteger os espermatozóides dos choques térmico e osmótico que ocorrem durante o processo de congelamento/descongelamento. O crioprotetor pode 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 glicerol é o agente crioprotetor mais utilizado para a redução dos danos impostos aos espermatozóides durante esse processo (MELO et al., 2003; ALBERTI et al., 2004). Entretanto, seu efeito tóxico tem sido relatado para o sêmen equino, bovino e ovino, conforme a concentração (ALVARENGA et al., 2000).

A Trealose, um dissacarídeo da glicose, vem sendo incorporada aos diluentes e tem sido encontrado que ela protege o espermatozóide de várias espécies durante o processo de congelamento e aumenta a motilidade espermática pós-descongelamento em caprinos (TERADA & ABOAGLA., 2004), ovinos (AISEN et al., 2002), e bovinos (FOOTE et al., 1993). A Trealose formaria pontes de hidrogênio com a cabeça polar dos grupos de fosfolípidos para impedir acontecimentos de fusão de membranas justapostas (ANCHORDOGUY et al., 1987). Assim, esse açúcar tem sido amplamente utilizado como um crioprotetor de espermatozóides (DALIMATA & GRAHAM., 1997). 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 (MOLINA, 1994).

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

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizadas nove coletas de sêmen, em sete machos ovinos SRD, 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. As amostras eram mantidas em tubo 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). Após foi realizado o cálculo da concentração de espermatozoides, 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 h (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. Era realizada então, 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 et al., 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 de membrana espermática foi realizada através das sondas fluorescentes Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídio (IP), conforme descrito por Harrison e Vickers (1990). A avaliação foi feita sob aumento de 400 x em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo – Brasil). Foi realizada 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 danificado.

A integridade das membranas plasmática e acrossomal, e motilidade 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

Os valores médios da motilidade espermática pré-congelamento e pós-descongelamento estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1: Média dos resultados da motilidade espermática pré-congelamento e pós-descongelamento.

Tratamento	N	Motilidade pré-congelamento (%)	Motilidade pós-descongelamento (%)
T1	63	70.952	19.206
T2	63	71.016	22.381

Na Tabela 2, estão expressos os valores médios de integridade de membrana pré-congelamento e pós-descongelamento e integridade de acrossoma pós-descongelamento.

Tabela 2: Média dos resultados de integridade de membrana pré-congelamento e pós-descongelamento e integridade de acrossoma pós-descongelamento.

Tratamento	N	Integridade de membrana pré-congelamento (%)	Integridade de membrana pós-descongelamento (%)	Integridade de acrossoma pós-descongelamento (%)
T1	63	51.730	13.984	21.667
T2	63	48.032	14.968	20.778

Segundo Salamon e Maxwell (2000) mesmo o glicerol oferecendo crioproteção ao espermatozóide, também pode causar dano estrutural durante o processo de pré-congelamento. Por conseguinte, foi sugerido que o glicerol deveria ser adicionado não mais que 20–30 min antes do congelamento. A crioproteção efetiva foi demonstrada para touro e cachaaço depois de um contato curto, 5-10 s

com glicerol, e para sêmen de carneiro, 0–5 min, sustentando a visão de que antes desse período, a penetração de glicerol na célula não é essencial para sua proteção.

A concentração de glicerol incluída em diluentes para armazenamento de sêmen congelado de carneiro é limitada por sua toxicidade, que depende das taxas de resfriamento e congelamento, composição do diluente e método de adição do glicerol (SALAMON & MAXWELL., 2000).

A trealose tem uma ação protetora relacionada ao efeito osmótico e interações específicas com fosfolípidios de membrana. Sua ação parece estar conectada com sua habilidade para substituir a água na interface membrana-solução (BAKÁS et al., 1991; CROWE et al., 1989).

A substituição do glicerol pela trealose como crioprotetor para congelamento de sêmen ovino no presente trabalho, obteve resultados similares (não diferindo estatisticamente) na avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal, e motilidade da célula espermática ovina.

4. CONCLUSÕES

A utilização de trealose como crioprotetor para congelamento de sêmen ovino manteve a qualidade seminal após o descongelamento, conservando parâmetros comparáveis com os obtidos com o glicerol, podendo então, ser utilizada para congelamento de sêmen desta espécie.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AISEN, E. G., MEDINA, V.H., VENTURINO, A. Cryopreservation and Post-thawed Fertility of Ram Semen Frozen in Different Trehalose Concentrations, **Theriogenology**, 2002, 57, p.1801-1808.

ALBERTI, G., MICHALIK, P., DALLAI, R., GIUSTI, F. The Ultrastructure of the Peculiar Synspermia of Some Dysderidae (Araneae, Arachnida), **Tissue & Cell**, 2004, 36, 447-460.

ALVARENGA, M. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. **Equine Veterinary Journal**, 2000, 32, p. 541-545.

ANCHORDOGUY, T., RUDOLPH, A., CARPENTER, J., CROWE, J. Modes of Interaction of Cryoprotectants with Membrane Phospholipids During Freezing, **Cryobiology**, 1987, 24, p.324-331.

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.

BAKÁS, L.S., DISALVO, E.A. Effect of Ca⁺⁺ on the cryoprotective action of trehalose. **Cryobiology**, 1991, 28, p. 347-353.

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.

CROWE, J., CARPENTER, J., CROWE, L., ANCHORDOGUY, T. J. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. In: **Symposium on Cryosentizing and**

cryoprotective Agents at the 26th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Charleston, South Carolina, 1989.

DALIMATA, M., GRAHAM, J. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, 1997, 48, p. 831-841.

FOOTE, R.H., CHEN, Y., BROCKETT, C.C. Fertility of Bull Spermatozoa Frozen in Whole Milk Extender With Trehalose, Taurine, or Blood-serum, **Journal of Dairy Science**, 1993, 76, p.1908-1913.

GILLAN, L., MAXWELL, W.M.C. 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.

MELO, EP; CHEN, LY; CABRAL, JMS, FOJAN, P., PETERSEN, S.B., OTZEN, D.E. Trehalose Favors a Cutinase Compact Intermediate Off-folding Pathway, **Biochemistry**, 2003, 42, p.7611-7617.

MOLINA, F. 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, p.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®. **StatistixÔ 8 Analytical Software**. User's manual. 396 p. Tallahassee. FL. 2003

TERADA, T., ABOAGLA, E.M.E. Effects of the Supplementation of Trehalose Extender Containing Egg Yolk with Sodium Dodecyl sulfate on the Freezability of Goat Spermatozoa, **Theriogenology**, 2004, 62, p. 809-818.