

EFEITO DE TRÊS CRIOPROTETORES SOBRE A MEMBRANA DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE OVINOS

PATRÍCIA SOARES ¹, EURÍPEDES VILELA DA SILVA ², JOSÉ OCTAVIO JACOMINI ³

RESUMO

O armazenamento do sêmen por um longo período, permitindo o seu posterior uso representa uma importante ferramenta para criadores que desejam resguardar o potencial genético de seus reprodutores. O meio diluente e o crioprotetor são utilizados com o intuito de proteger os espermatozóides dos choques térmicos e osmóticos que ocorrem durante o processo de congelamento, já que este pode causar danos irreversíveis aos espermatozóides. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito dos crioprotetores: glicerol (GLI), etilenoglicol (EGL) e dimetilformamida (DMF), sobre a membrana das células espermáticas de ovinos quando igualadas as osmolaridades destes meios. A fração espermática do ejaculado de 16 ovinos foi avaliada macro e microscopicamente e, destes foram selecionados 4 reprodutores para a realização deste estudo. Observou-se para tanto a reação dos espermatozóides aos testes hiposmótico e aos crioprotetores. A avaliação consistiu na alteração morfológica das células espermáticas em ambos os testes. O resultado encontrado no teste hiposmótico foi de $07,08 \pm 4,46$ espermatozóides reativos. A avaliação dos crioprotetores obteve como resultado $23,42 \pm 4,12$ espermatozóides reativos ao etilenoglicol, $31,88 \pm 5,47$ reativos ao glicerol e $21,92 \pm 6,27$ responderam a dimetilformamida. Concluiu-se, nesta etapa, que o glicerol obteve maior efeito protetor sobre as membranas dos espermatozóides, podendo exercer melhor atividade crioprotetora se utilizado na preservação do sêmen ovino.

PALAVRAS-CHAVE: Membrana celular, Ovinos, Glicerol, Etilenoglicol, Dimetilformamida.

INTRODUÇÃO

A criação de pequenos ruminantes tem experimentado uma grande expansão durante as duas últimas décadas. O melhoramento das raças acompanhado de tecnologias reprodutivas é necessário para avaliar e melhorar a eficiência reprodutiva.

O desenvolvimento de técnicas adequadas para preservação de sêmen é um dos passos mais importantes no avanço da reprodução animal nas diferentes espécies e vem sendo conseguido através da aplicação de biotécnicas cada vez mais modernas (PAPA et. al., 2000).

O processo de criopreservação das células espermáticas resulta em diminuição da fertilidade quando comparado com sêmen fresco.

1 Médica Veterinária – FAMEV-UFU, Rua Tupaciguara, 455. B.Aparecida, Uberlândia-MG, CEP 38400-618. Endereço eletrônico: psouares.vet@hotmail.com

2 Médico Veterinário – FAMEV-UFU. Endereço eletrônico: euripedes_vilela@hotmail.com.

3 Orientador/ Professor do curso de Medicina Veterinária – FAMEV-UFU. Endereço eletrônico: jojacomini@ufu.br

Este prejuízo se dá pela perda da viabilidade espermática ou por danos na capacidade funcional dos espermatozóides sobreviventes. O processo exerce efeitos negativos principalmente sobre a membrana celular, particularmente vulnerável a este processo. Espermatozóides de carneiros são mais sensíveis a criopreservação que de touros (WATSON, 2000).

Conforme resultados de estudos empíricos ao longo de várias décadas, muitos fatores podem afetar a sobrevivência dos espermatozóides, estes fatores incluem dentre outros a composição dos meios e os crioprotetores usados para congelamento (GUTHRIE et. al. 2002).

Para avaliar o efeito do congelamento e das substâncias utilizadas para promovê-lo, o teste hiposmótico tem sido apresentado como um bom teste para avaliar a integridade das membranas dos espermatozóides em vários animais domésticos incluindo bovinos, eqüinos e suínos (FONSECA et. al., 2005). Entretanto, ainda não foi desenvolvido um método eficiente de teste hiposmótico para sêmen ovino.

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade do glicerol, do etilenoglicol e da dimetilformamida na preservação das células espermáticas de ovinos avaliando-se parâmetros como motilidade, o vigor e integridade de membranas de células espermáticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia e em criatórios da região de Uberlândia – MG, durante o período de março de 2006 a março de 2007.

Os ejaculados foram coletados de 16 animais em quatro criatórios da região. Todos os animais foram submetidos ao exame andrológico e ao espermograma. Por meio da análise dos andrológicos e dos ejaculados escolheu-se um criatório e 4 carneiros da raça Santa Inês, com idades entre 8 e 24 meses. Foram realizadas três coletas de sêmen de cada animal por meio de estimulação elétrica (eletroejaculador).

Imediatamente após a coleta, o sêmen foi acondicionado em banho-maria a 37 °C, observando seu aspecto, sendo o volume determinado no próprio tubo de coleta (graduado). As avaliações da motilidade, do turbilhonamento, do vigor e da concentração espermática foram realizadas com o auxílio de um microscópio óptico. Finalmente, a concentração espermática foi determinada pela contagem de células em câmara de Neubauer. Uma alíquota de 20 µL de sêmen foi adicionada a uma solução de Citrato de sódio formolado para avaliação morfológica com o objetivo de ser comparado ao efeito dos testes hiposmótico e dos crioprotetores.

Três alíquotas (20 µL) de sêmen foram distribuídas em tubos contendo diluidor (1 mL) à base de Citrato (2,94) preparado com três crioprotetores diferentes: glicerol 7,42% (GLI), etilenoglicol 4,97% (EGL) e dimetilformamida 5,89% (DMT), sendo igualadas as osmolaridades destes para retirar o efeito desta variável e avaliar a integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozóides. As três soluções, acrescidas do sêmen, foram submetidas à incubação por 40 minutos. Decorrido este tempo, uma alíquota de 80 µL de cada amostra foi adicionada a um tubo contendo 1 mL de solução hiposmótica.

Para efeito de comparação, uma alíquota (20 µL) de sêmen *in natura* foi adicionada a um tubo contendo 1 mL de solução hiposmótica (125 mOsm) fixada em formol, após 40 minutos de incubação.

Procedeu-se à leitura do percentual de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico, em preparação úmida entre lâmina e lamínula sob objetiva de imersão, em microscopia de contraste de fase com aumento de 1000 vezes (Microscópio Olympus BX41).

Foram contadas cem células por amostra, incluindo-se os dobramentos de cauda que pudessem ser classificados como patológicos, pois estes seriam descontados quando diminuídos dos dobramentos observados na morfologia espermática. Para tal cálculo foi utilizada a seguinte fórmula: HO (%) = [% de alterações na região da cauda (peça principal) após teste HO] – [% de alterações na região da cauda (peça principal) antes do teste HO] (MELO & HENRY, 1999).

Para avaliar o efeito dos crioprotetores sobre a membrana plasmática dos espermatozóides foi colocada em uma lâmina uma gota de sêmen diluído nos crioprotetores, colocando-se lamínula e realizando-se vedação com esmalte. Assim que os espermatozóides se estabilizaram foram avaliadas, em imersão, alterações de cauda, peça intermediária e na estrutura geral das células espermáticas.

Para o cálculo foi utilizada a seguinte fórmula: Crioprotetor (%) = (% de alterações na cauda no teste com crioprotetor) – (% de alterações na cauda no teste sem crioprotetor).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção espermática está altamente correlacionada com o peso do testículo e, a medida da circunferência escrotal tem sido usada como indicador da produção espermática em várias espécies (DYRMUNDSSON, 1973).

As características da fração espermática dos ejaculados são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Espermograma e Exame andrológico dos animais utilizados no experimento.

Animal	Idade (meses)	C.E (cm)	Volume (mL)	Aspecto	TBM	MOT (%)	Vigor	Concentração
1*	24	31,0	0,7	Aquoso	3,5	70	3,0	4,50 X 10 ⁹
2*	18	29,0	2,0	Aquoso	3,0	75	3,5	1,60 X 10 ⁹
3*	28	34,0	2,5	Creoso	5,0	85	4,0	5,40 X 10 ⁹
4*	12	31,0	2,4	Creoso	4,0	80	4,0	4,70 X 10 ⁹

* Média entre as três coletas; C.E. - Circunferência Escrotal; TBM – Turbilhonamento; MOT - Motilidade

A leitura da morfologia espermática do ejaculado dos ovinos, neste estudo, revelou as seguintes médias: alterações de cabeça (2,11 ± 3,22); gota citoplasmática proximal (0,5 ± 1,0); gota citoplasmática distal (0,5 ± 1,0); peça principal (3,79 ± 2,08); A média de espermatozóides classificados como normais foi de 79,53 ± 13,57.

O volume do sêmen varia de acordo com o método de coleta, com a idade do animal, estação e frequência das coletas. Segundo Hafez & Hafez (2004), o volume ejaculado varia de 0,5 a 2 mL em animais adultos e de 0,5 a

0,7 mL em carneiros jovens. A determinação da motilidade envolve estimativas subjetivas de viabilidade dos espermatozóides.

Segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998), os padrões seminais de ovinos desejáveis para motilidade, vigor, turbilhonamento e concentração espermática são 75% - 3 - 3 e 3×10^9 , respectivamente.

A leitura da morfologia espermática no teste hiposmótico, após 40 minutos de incubação, revelou as seguintes médias: alterações de cabeça ($4,4 \pm 3,45$); gota citoplasmática proximal ($3,26 \pm 4,69$); gota citoplasmática distal ($3,26 \pm 4,84$); peça principal ($20,87 \pm 8,40$); A média de espermatozóides classificados como normais foi de $68,21 \pm 8,13$.

Na Figura 1 estão demonstradas algumas alterações observadas nos espermatozóides submetidos ao teste hiposmótico.

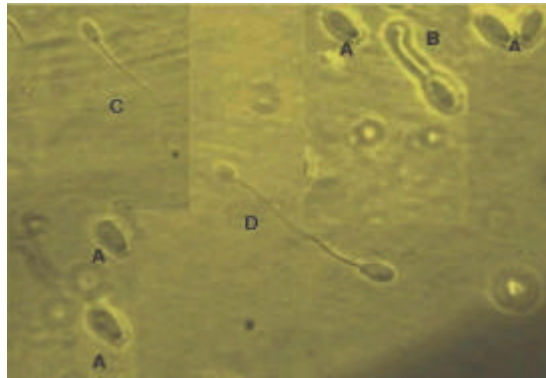


Figura 1 - Morfologia espermática do ejaculado submetido ao teste hiposmótico observado em microscópio de contraste de fase. Aumento de 1000X. (A) Cabeça isolada; (B) Cauda dobrada com gota citoplasmática distal; (C) Espermatozóide Normal; (D) Cauda com gota citoplasmática distal.

A leitura da morfologia espermática no teste que teve etilenoglicol como crioprotetor revelou as seguintes médias: alterações de cabeça ($12,25 \pm 1,70$); gota citoplasmática proximal ($1,75 \pm 1,70$); gota citoplasmática distal ($1,75 \pm 0,95$); peça principal ($30,5 \pm 9,11$); A média de espermatozóides classificados como normais foi de $53 \pm 6,48$.

Nas Figuras 2 e 3 são demonstradas algumas das alterações observadas nos testes com etilenoglicol e glicerol, respectivamente.

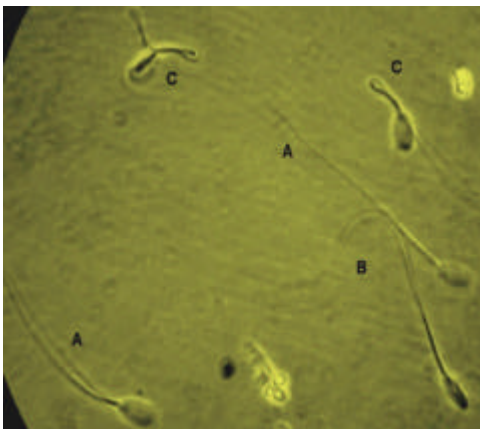


Figura 2 - Ejaculado submetido ao teste com etilenoglicol observado em microscópio de contraste de fase. Aumento 1000X. (A) Espermatozóide Normal; (B) Cauda enrolada; (C) Cauda fortemente enrolada.



Figura 3 - Morfologia espermática do ejaculado submetido ao teste com glicerol observado em microscópio de contraste de fase. Aumento de 1000X. (A) Cauda fortemente enrolada; (B) Cabeça isolada.

Na avaliação da utilização de glicerol como crioprotetor, a leitura da morfologia espermática revelou as seguintes médias: alterações de cabeça ($5,25 \pm 3,30$); gota citoplasmática proximal ($4,0 \pm 2,77$); gota citoplasmática distal ($0,75 \pm 0,95$); peça principal ($42,75 \pm 7,88$); A média de espermatozóides classificados como normais foi de $40,25 \pm 2,75$.

Utilizando-se como crioprotetor a dimetilformamida, as alterações observadas obtiveram as seguintes médias: alterações de cabeça ($5,25 \pm 3,40$); gota citoplasmática proximal ($2,0 \pm 1,82$); gota citoplasmática distal ($3,0 \pm 0,81$); peça principal ($31 \pm 8,13$); A média de espermatozóides classificados como normais foi de $58,75 \pm 15,28$.

Comparando as alterações na cauda dos espermatozóides antes e após o teste hiposmótico, determinou-se o percentual de células reativas ao teste HO, que foi de $17,08 \pm 4,46$. Já na avaliação dos crioprotetores os resultados obtidos foram: espermatozóides reativos ao etilenoglicol $9,63 \pm 4,12$; reativos ao glicerol $21,88 \pm 5,47$ e a dimetilformamida $10,13 \pm 4,27$.

Assim como demonstrado em outras espécies de animais domésticos (NEILD et. al., 1999), os espermatozóides ovinos apresentaram um resultado similar quando expostos ao teste hiposmótico. Isto ocorre devido à absorção de água pelas células espermáticas com membranas intactas aumentando seus volumes para estabelecer o equilíbrio entre o fluido do compartimento interno dos espermatozóides e o meio extracelular. Isto culmina numa expansão esférica da membrana plasmática da célula na região da cauda forçando a retração da mesma. Esta retração começa da extremidade final da cauda e prossegue pela peça intermediária diminuindo a pressão osmótica dos meios.

Fonseca et. al. (2005) apontaram a solução hiposmótica a 125 mOsm como aquela ideal para analisar alterações sobre a membrana plasmática das células espermáticas de bodes.

Comparando os resultados entre os testes hiposmótico com cada um dos crioprotetores, aquele que apresentou melhor resultado foi o glicerol, seguido pela dimetilformamida. O efeito dos crioprotetores sobre a membrana plasmática foi avaliado pelas alterações sobre a cauda. Aquelas células que apresentaram alterações morfológicas foram os espermatozóides que possuíam membranas intactas, capazes de absorver água e restabelecerem o equilíbrio entre os meios intra e extracelular.

Nesse sentido, o glicerol foi a substância que proporcionou maior proteção à membrana plasmática das células espermáticas. Uma vez que a osmolaridade dos diluentes foi igualada antes da realização dos ensaios, o efeito de cada um destes pôde ser melhor avaliado.

A superioridade do glicerol na preservação da membrana plasmática (21,88 %) permite evidenciar o fato de que esta proteção ainda não é a ideal, pois ocorrem graves lesões à membrana plasmática, o que pode inviabilizar o processo reprodutivo.

Portanto, mais pesquisas com estes e outros crioprotetores se fazem necessárias. Outros testes como reação acrossomal e mitocondrial, podem revelar ainda mais o efeito das substâncias aqui estudadas sobre os espermatozóides de ovinos.

A ovinocultura é uma atividade em franca expansão no Brasil e estudos para avaliar a capacidade reprodutiva da espécie e melhorá-la pode contribuir ainda mais para o aumento da produtividade e da qualidade dos animais criados no país.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o glicerol preserva melhor a membrana plasmática das células espermáticas de ovinos quando comparado à dimetilformamida e ao etilenoglicol em osmolaridades iguais. A dimetilformamida apresentou melhor resultado que o etilenoglicol, porém este resultado não foi significativo.

REFERÊNCIAS

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação seminal animal**. Belo Horizonte, 1998. 53 p. (Elaborado conforme convênio MA/CBRA Nº. 021/1997).

DÝRMUNDSSON, Ó. R. Puberty and early reproductive performance in sheep. II Ram lambs. **Animal Breeding Abstracts**, v.41, n9, p. 419-430, 1973.

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; MAFFILI, V. V.; BORGES, A. M.; SANTOS, A. D. F.; RODRIGUES, M. T.; OLIVEIRA, R. F. M. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. **Animal Reproduction**, v. 2, n. 2, p. 139-144, april/ june, 2005.

GUTHRIE, H. D.; LIU, J.; CRITSER, J. K. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 6, p. 1806-1811, 2002.

MELO, M.I.V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 1, p.71-78, 1999.

NEILD, D.; CHAVES, G.; FLORES, M.; MORA, N.; BECONI, M.; AGÜERO, A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 51, p. 721-727, 1999.

PAPA, F.O., ZAHN, F.S., DELL'AQUA Jr., et al. Utilização do diluente MP50 para criopreservação de sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. V. 26, p. 184-191, 2002.

WATSON, P.F. Artificial insemination and the preservation of semen. In:Lamming, G.E. (Ed), **Marshall's Physiology of Reproduction**. Churchill Livingstone, Edinburgh, p.747-869, 1990.