

EFEITO DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE SOBRE A VIABILIDADE DE ESPERMATOZÓIDES OVINOS RESFRIADOS.

Effect of low density lipoprotein on the viability of cooling sheep spermatozoa

SILVA, M.C.¹; SNOECK, P.P.N.¹; SILVA, S.C.B.¹; ÁLVARES, C.T.G.¹, FUJII, J.B.², NEVES, M.M.²; HENRY, M.²

RESUMO

O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito da lipoproteína de baixa densidade (LBD) em diferentes concentrações em substituição a gema de ovo integral sobre a viabilidade espermática no processo de resfriamento de sêmen ovino. As amostras de sêmen foram avaliadas quanto às características físicas macro e microscópicas antes e pós-resfriamento. Após a determinação da concentração espermática, foram fracionadas e diluídas em meio contendo gema de ovo e LBD nas proporções de 5, 10 e 20%. Após a avaliação do sêmen diluído, as amostras foram envasadas e submetidas aos tempos de equilíbrio de 0 minutos, 30 minutos, 1 hora e 2 horas pré-resfriamento. As palhetas foram resfriadas à temperatura de 5°C num período de duas horas. O sêmen foi submetido ao teste de termorresistência lento (TTR) pós-resfriamento e ao teste hiposmótico (HO) com frutose-citrato pós-resfriamento. As avaliações de motilidade espermática demonstraram que o diluidor contendo gema de ovo foi superior ($P < 0,05$) ao demais diluidores pós-resfriamento e em todos os tempos de TTR. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos nas avaliações de integridade funcional de membrana plasmática. Os resultados demonstraram que a LBD purificada não deve substituir a gema de ovo integral na composição dos diluidores para resfriamento de sêmen ovino quando da avaliação da motilidade, no entanto, preservam a integridade de membrana de forma semelhante a gema de ovo.

PALAVRAS-CHAVE: diluidor, gema de ovo, carneiro, Santa Inês.

SUMMARY

The purpose of this experiment was to evaluate the effect of low density lipoprotein (LDL) in different concentrations in place the egg yolk in the extender for cooling of sheep semen. Samples of semen were evaluated after cooling. After determining the sperm concentration the semen was diluted in media containing egg yolk or LDL in the proportions of 5, 10 and 20%. After evaluating the diluted semen, samples were divided and different equilibrium time was tested: 0 minutes, 30 minutes, 1 hour and 2 hours before cooling. The semen was cooled to a temperature of 5°C over a period of two hours after envase into 0,25 mL straws. The sperm was submitted to the thermo-resistance slow test (TTR) and hypoosmotic swelling test (HOS) after cooling. Evaluations of sperm motility showed that the extender containing egg yolk was better than the others extenders with LDL ($P < 0.05$). There was no significant difference between treatments in the evaluations of the sperm integrity of plasma membrane ($P > 0.05$). The results showed that the purified LDL should not replace the egg yolk in full composition of semen extenders for cooling of sheep.

KEYWORDS: extender, egg yolk, sheep, Santa Inês.

¹ Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC)

² Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

INTRODUÇÃO

A gema de ovo é freqüentemente utilizada na composição de diluidores para a criopreservação de espermatozóides dos mamíferos (ENGLAND, 1993), visando à proteção das células contra o choque térmico. Este mecanismo de proteção é atribuído à fração lipoprotéica de baixa densidade (LBD) que interage com as proteínas presentes no plasma seminal, impedindo o efeito deletério dessas proteínas na membrana espermática (MANJUNATH *et al.*, 2008). Apesar dos seus efeitos protetores, o uso da gema de ovo integral apresenta desvantagens, como a possibilidade de transportar microrganismos patogênicos (SILVA *et al.*, 2002), além de conter substâncias que inibem a respiração dos espermatozóides e promovem a diminuição da motilidade espermática (PACE; GRAHAM, 1974).

Estudos recentes demonstraram ser possível a purificação da LBD, permitindo a sua utilização em substituição à gema de ovo integral na formulação dos diluidores utilizados na criopreservação de espermatozóides (MOUSSA *et al.*, 2002). A ação crioprotetora da LBD já foi demonstrada nas espécies bovina (AMIRAT *et al.*, 2004), eqüina (JULIANI *et al.*, 2004), canina (VARELA JR, 2004) e suína (DEMANIOWICZ; STRZEZEK 1996). Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da LBD em diferentes concentrações em substituição a gema de ovo integral sobre a viabilidade espermática no processo de resfriamento de sêmen ovino.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) no período de janeiro a julho de 2008. Foram utilizados nove carneiros da raça Santa Inês adultos, os quais foram coletados por meio de vagina artificial (um ejaculado/animal) com auxílio de uma fêmea no estro induzido. Os ejaculados foram avaliados quanto às características físicas macroscópicas (volume, cor, odor e aspecto) e microscópicas (motilidade total, motilidade progressiva, vigor e turbilhonamento). O cálculo de concentração espermática foi realizado com auxílio da câmara de Neubauer, com sêmen diluído na proporção de 10 μ l para 3990 μ l (1:400) de solução tamponada de formol-salina (CBRA, 1998). As amostras foram fracionadas e diluídas em diferentes meios, que constituíram os grupos experimentais: D1) composto de tris, glicose, gema e 5% de glicerol a 1221 mOsmol/L (SALAMON; VISSER, 1972); D2) tris, glicose, 5% de LBD e 5% de glicerol a 1072 mOsmol/L; D3) tris, glicose, 10% de LBD e 5% de glicerol a 1138 mOsmol/L e D4) tris, glicose, 20% de LBD e 5% de glicerol a 1182 mOsmol/L. Após a diluição, as amostras foram novamente avaliadas no intuito de verificar possíveis alterações nas características seminais durante o processo de diluição. O ajuste final da diluição foi realizado de forma a obter 150x10⁶ spz/palheta 0,25 mL. O sêmen envasado foi submetido ao tempo de equilíbrio em temperatura ambiente (20-25°C) para permitir a interação do meio diluidor com os espermatozóides. Foram testados os seguintes tempos de equilíbrio: 0 minutos, 30 minutos, 1 hora e 2 horas pré-resfriamento. Após o equilíbrio as palhetas foram colocadas em geladeira com temperatura interna estabilizada entre 2 e 5°C de modo a permitir a queda gradativa de temperatura ambiente à 5°C num período de duas horas. Ao final da curva de resfriamento, o sêmen foi

avaliado quanto à motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e vigor espermático (V), a fim de verificar possíveis alterações nas características seminais durante o processo de resfriamento. O sêmen resfriado foi avaliado quanto à integridade funcional de membrana plasmática por meio do teste HO utilizando solução de frutose-citrato com osmolaridade aproximada de 100 mOsmol/L. As amostras que obtiveram os valores mínimos de 30% de motilidade e vigor = 2 pós-resfriamento foram submetidas ao TTR para sêmen ovino, sendo realizadas avaliações de motilidade espermática e vigor após uma, duas e três horas de incubação. O delineamento experimental foi em esquema fatorial quatro x quatro (quatro diluidores *versus* quatro tempos de equilíbrio pré-resfriamento) e o ejaculado de cada reprodutor foi considerado uma repetição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sêmen fresco dos animais utilizados no experimento apresentou coloração branco marfim, odor *suis generis*, aspecto leitoso e volume médio de $1,2 \pm 0,3$ mL. O valor médio de turbilhonamento foi $3,7 \pm 0,6$. A concentração espermática variou de $1,7 \times 10^9$ a $7,1 \times 10^9$ espermatozóides/mL, tendo como média $3,6 \times 10^9$ espermatozóides/mL. Vale ressaltar que todas essas características estavam dentro dos padrões requeridos para o resfriamento e criopreservação de sêmen ovino, conforme estabelecido pelo CBRA (1998). As médias de motilidade espermática e vigor do sêmen fresco e pós-diluição estão dispostos na tabela 1.

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão de motilidade total, motilidade progressiva e vigor dos espermatozóides ovinos para cada tratamento antes da refrigeração

Variáveis	Sêmen fresco	Tratamento			
		D1	D2	D3	D4
Motilidade Total (%)	81,9 ± 8,1%	76,9±7,7	74,3±6,7	74,5±10,2	65,2±29,7
Motilidade Progressiva (%)	75,3± 9,9%	68,6±9,4	64,3±9,7	54,7±23,6	56,9±27,2
Vigor (0-5)	3,6 ± 0,5	3,3±0,5	3,4±0,5	3,6±0,5	3,1±1,5

Não houve diferença entre os tratamentos ($P>0,05$).

D1= gema de ovo (SALAMON & VISSER, 1972); D2=LBD5%; D3=LBD10%; D4=LBD20%.

Verificou-se neste estudo que os quatro diluidores testados preservaram de maneira similar as características físicas do sêmen pós-diluição, não havendo diferença significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos, demonstrando que o uso de LBD purificada nas proporções de 5, 10 e 20% é capaz de garantir proteção aos espermatozóides ovinos de forma semelhante à gema de ovo, durante este processo. MANJUNATH *et al.* (2007) verificaram que o plasma seminal de bovinos contém proteínas vinculadas a lipídios chamadas de BSP. Estas proteínas são produzidas nas vesículas seminais e atuam na membrana espermática através da remoção de colesterol e fosfolipídios, afetando negativamente a capacidade dos espermatozóides de se manterem viáveis. Desta forma, a LBD purificada nas proporções estudada é capaz de permitir a ocorrência destes mecanismos de proteção, com a mesma eficiência da gema de ovo integral, durante o processo de diluição de sêmen ovino.

Os resultados de motilidade espermática progressiva e vigor para cada tratamento após o resfriamento estão demonstrados na figura 1. As médias de motilidade progressiva após o resfriamento de sêmen foram diferentes entre os

diluidores testados ($P < 0,05$), demonstrando que o uso de LBD em proporções variadas, em substituição a gema de ovo, não confere maior proteção ao choque térmico durante o processo de refrigeração para sêmen ovino. É possível que o efeito protetor da LBD para sêmen ovino seja mais evidente após a descongelação, uma vez que no resfriamento o diluidor a base de gema de ovo foi mais eficaz para proteger a motilidade espermática. No entanto, é importante ressaltar que todos os diluidores preservaram de forma semelhante o vigor espermático ($P > 0,05$).

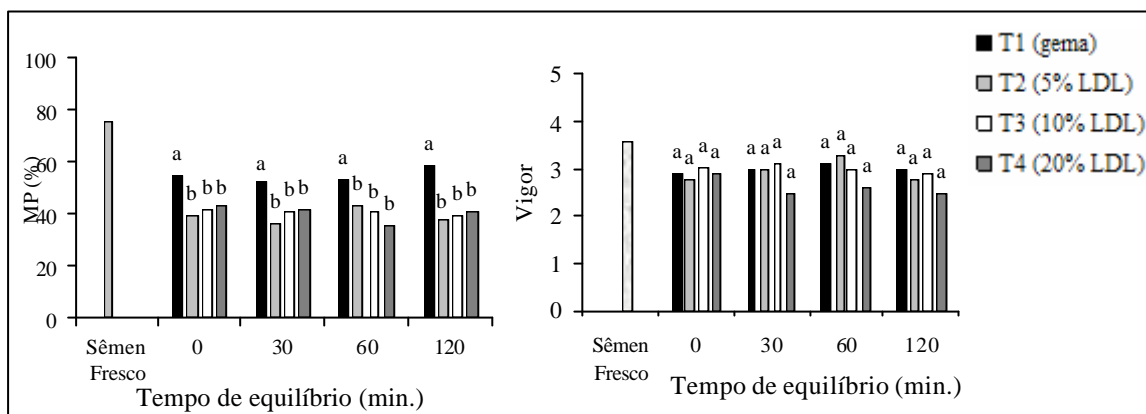


Figura 1. Valores médios de motilidade progressiva (%) e vigor espermático (0-5) do sêmen ovino fresco e após o resfriamento utilizando diferentes meios diluidores

Os resultados de motilidade progressiva e vigor espermático após três horas de TTR são mostrados na figura 2.

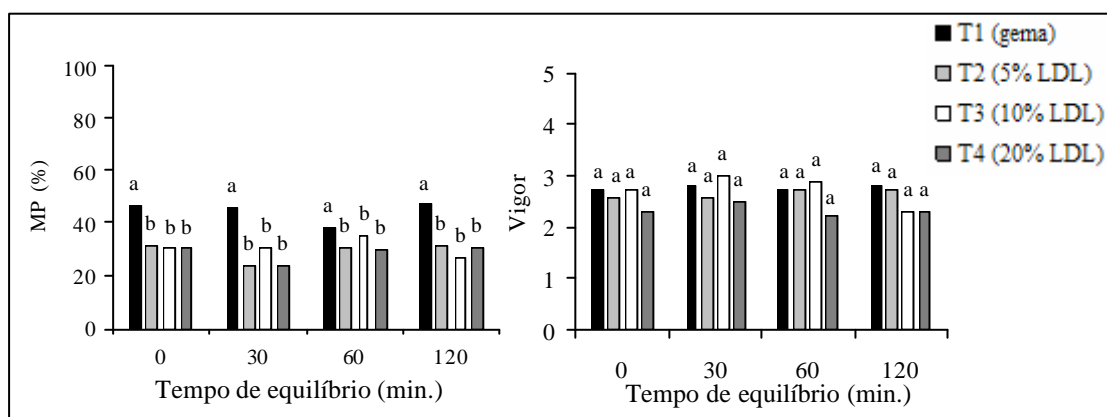


Figura 2. Valores médios de motilidade progressiva (%) e vigor espermático (0-5) do sêmen ovino submetido a três horas de incubação a 38°C utilizando diferentes meios diluidores

Nota-se que o D1 manteve-se superior aos demais diluidores em preservar a motilidade progressiva ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa nas avaliações de vigor espermático após as três horas de incubação. Estes resultados indicam que a LBD, nas proporções estudadas, em substituição a gema de ovo, não confere maior longevidade aos espermatozoides ovinos resfriados, contrariando Moussa *et al.* (2002) que encontraram melhores resultados com o uso da LBD na sua forma purificada comparada ao uso de

gema de ovo integral na composição de diluidores para criopreservação de sêmen.

Os resultados dos espermatozoides reativos ao teste hiposmótico são apresentados na tabela 2. Os diluidores preservaram de forma semelhante a integridade funcional de membrana plasmática ($P>0,05$), independente do tempo de equilíbrio pré-resfriamento utilizado.

Tabela 2. Porcentagem de espermatozoides ovinos reativos ao teste hiposmótico, após o resfriamento utilizando-se diferentes diluidores e tempos de equilíbrio.

Diluidor	Tempo de Equilíbrio			
	0 min.	30 min.	60 min.	120 min.
D1 (gema)	57,2±18,1 ^a	59,3±25,3 ^a	66,3±17,8 ^a	57,8±21,7 ^a
D2 (5% LBD)	51,6±25,0 ^a	45,4±21,2 ^a	62,4±19,8 ^a	55,4±19,9 ^a
D3 (10% LBD)	58,4±19,7 ^a	51,7±19,8 ^a	63,4±20,9 ^a	57,7±23,3 ^a
D4 (20% LBD)	62,3±18,6 ^a	52,0±17,8 ^a	56,6±21,3 ^a	52,6±20,4 ^a

HO%= % de alterações na região da cauda após o teste HO- % de alterações na região da cauda antes do teste HO (MELO & HENRY, 1999). HO sêmen fresco: 72,2±17,7.

Os diluidores formulados com LBD apresentaram potencial semelhante para preservar a integridade de membrana espermática que diluidores formulados com gema de ovo. É importante salientar que a integridade funcional da membrana é um requisito essencial para o processo de fertilização, portanto, o sêmen resfriado com os diluidores testados possivelmente apresenta potencial para ser utilizado na inseminação artificial.

REFERÊNCIAS

AMIRAT, L.; TAINURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GERARD, O.; COURTENS, J.L., ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LBD: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, v.61, p.895-907, 2004.

CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**, p. 31-34, 1998.

DEMANIOWICZ, W.; STRZEZEK, J. The effect of lipoprotein fraction from egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. **Reproduction in Domestic Animals**, v31, p. 279-280, 1996.

ENGLAND, G. C. Cryopreservation of dog semen. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement** v.47, p.247-255, 1993.

JULIANI, G.; HENRY, M.; MELO, V.I. Freezing of equine semen in extenders with low density lipoproteins. In: INTERNACIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15, 2004, Porto Seguro. *Anais...*Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004. p.498.

MANJUNATH, P.; BERGERON, A.; LEFEBVRE, J.; FAN, J. Seminal Plasma Proteins: Functions and Interaction With Protective Agents During Semen

Preservation. **Society of Reproduction and Fertility Supplement**, v.65, p.217-228, 2007.

MANJUNATH, P.; LUSIGNAN, M. F.; BERGERO, A. Sperm Protection by Extender Components. In: BIENNIAL MEETING, 6, 2008, Budapest. *Anais...* Budapest: Association for Applied Animal Andrology, 2008.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by a new method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.57, p.1695-1706, 2002.

PACE, M.M.; GRAHAM, E.F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. **Journal of Animal Science**, v.39, p.1144-1149, 1974.

SALAMON, S.; VISSER, D. Effect of composition of tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. *Aust. J. Biol. Sci.* v. 25, p. 605- 618, 1972.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Effect of Tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. **The Veterinary Journal**, v. 164, p244-246, 2002.

VARELLA JR., A.S.; Efeito da Lipoproteína de baixa densidade sobre a qualidade do sêmen canino submetido a criopreservação. Dissertação de Mestrado – UFPEL Pelotas-RS, 2004.