

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ESPERMÁTICOS NA ADIÇÃO DE GOMA XANTANA AO DILUENTE DE RESFRIAMENTO DE SÊMEN EQUINO

**GEÓRGIA DA CRUZ TAVARES¹; STELA MARI MENEGHELLO GHELLER²;
VITÓRIA GASPERIN GUAZZELLI COSTA³; FERNANDA CARLINI CUNHA DOS
SANTOS⁴; CARINE DAHL CORCINI⁵**

¹ Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – georgiadacruz.tavares@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – stelagheller@hotmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – vitória.guazzelli@hotmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – carlini@portoweb.com.br

⁵ Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – corcincd@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A principal biotecnologia aplicada na reprodução equina é a inseminação artificial, sendo largamente praticada em todo o mundo, e comumente usada mediante o resfriamento e transporte de sêmen (LOOMIS, 2006).

O resfriamento visa prolongar a viabilidade espermática através da redução no metabolismo energético dos espermatozoides (GRAHAM, 2011). Esta biotecnica possibilita o transporte de sêmen por longas distâncias e um melhor aproveitamento de garanhões geneticamente superiores (PIMENTEL; CARNEIRO, 2008).

Na procura por novas substâncias que consigam manter a qualidade e viabilidade das doses de sêmen equino resfriado, a opção de diluentes que apresentam meios mais viscosos se apresenta como uma alternativa viável por evitar a sedimentação (LÓPEZ-GATIUS et al., 2005), neste contexto optou-se por algo de origem natural que fosse atóxico aos espermatozoides, como a goma xantana, uma substância semelhante a gelatina, inerte, que aumenta a viscosidade do meio, um polissacarídeo produzido pela fermentação da bactéria *Xanthomonas campestris* (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da goma xantana adicionada ao diluente de resfriamento de sêmen equino, utilizando como parâmetros de qualidade espermática, motilidade espermática, integridade de DNA e integridade de acrossoma, por um período de armazenamento de 72 horas a 5°C.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados 30 ejaculados, oriundos de 10 garanhões da raça Crioula, a partir de 3 coletas de sêmen através do método de vagina artificial com presença de uma égua em estro. As amostras de sêmen foram diluídas com diluente base, Kenney (1975), até a concentração final de 50×10^6 espermatozoide/mL e submetidos aos tratamentos: grupo controle Kenney; Kenney + 0,01%; Kenney + 0,12% e Kenney + 0,25% de goma xantana. Em seguida, as amostras foram mantidas sob resfriamento a 5°C.

As amostras eram avaliadas após 5 minutos de imersão em banho maria a 37°C, nas 0; 24; 48 e 72h de resfriamento e os parâmetros analisados incluíram motilidade espermática, integridade de DNA e integridade de acrossoma.

A motilidade espermática (0 a 100%), foi determinada pelo percentual de células móveis em movimento progressivo, uma alíquota de 10 µl de sêmen foi colocada entre lâmina e lamínula aquecidas a 37°C. As amostras foram avaliadas através de microscopia ótica (CBRA, 2013).

A integridade de DNA foi realizada pela técnica descrita por EVENSON et al. (1999) e a integridade de acrossoma conforme protocolo modificado por KAWAMOTO et al. (1999), ambas realizadas em microscópio de epifluorescência.

As análises estatísticas foram realizadas através do *software* Statistix 9®, com análise de variância (ANOVA) com comparação de médias pelo teste de Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na motilidade espermática, a partir das 24h, foi observado diferença estatística entre o controle e o tratamento 0,25%. O tratamento 0,12%, nas 24h, não diferiu do controle, porém foi estatisticamente inferior ao tratamento 0,01% (Tabela 1).

Tabela 1. Percentual de motilidade (média ± erro padrão da média) de sêmen equino mantido sob resfriamento a 5°C por 72h em diluente com adição de goma xantana.

Horas	0	0,01%	0,12%	0,25%
0	85 ± 1.0 A,a	85 ± 1.0 A,a	85 ± 1.0 A,a	85 ± 1.0 A,a
24	60.5 ± 1.6 AB,b	63.6 ± 2.5 A,a	51.5 ± 2 BC,b	44.7 ± 2.6 C,b
48	43.6 ± 2.6 A,bc	41 ± 2.1 A,b	33.6 ± 2.4 AB,bc	25.2 ± 2.2 B,bc
72	26.8 ± 3.1 A,c	23.1 ± 2.9 AB,b	18.2 ± 2.5 AB,c	23.3 ± 2.4 B,c

a,b,c Letras distintas indicam diferença estatística nas colunas (ANOVA, p<0,05).

A,B Letras distintas indicam diferença estatística nas linhas (ANOVA, p<0,05).

O tratamento 0,25% de xantana afetou negativamente a motilidade espermática a partir das 24h, quando comparado ao controle; isso pode ser atribuído a concentração total de xantana adicionada ao diluente (superior aos demais tratamentos) e ao fato de que, apesar das amostras passarem por um aquecimento de 5 minutos a 37°C, a goma xantana não modificou sua fluidez. Segundo GARCÍA-OCHOA et al. (2000), a viscosidade da goma xantana não se altera em temperaturas entre 4 e 93°C, desse modo, as amostras, quando incubadas a 37°C, a viscosidade se manteve e contribuiu para a imobilização das células espermáticas na solução que, devido a essa dificuldade de locomoção, consequentemente diminuiu a motilidade das células espermáticas (Tabela 1).

Na tabela 2, podemos observar que as médias para integridade de DNA, obtiveram uma queda, conforme o período de estocagem aumentava, porém sem diferença estatística.

Observou-se na tabela 3 um declínio no percentual de integridade de acrossoma, após 24h, no controle e tratamento 0,25%, contudo nos tratamentos 0,01% e 0,12%, se evidenciou essa diferença apenas a partir das 48h, o que se torna um resultado favorável a adição deste biopolímero, pois o acrossoma é uma estrutura essencial para o processo de fertilização (KAWAKAMI et al. 1987). Esses dados corroboram com que SALVADOR et al. (2006) descreveu em trabalho com sêmen de caprinos, onde encontrou taxas de integridade de acrossoma superiores em tratamentos contendo gelatina, a partir de 24hs após refrigeração.

Tabela 2. Percentual de integridade de DNA (média \pm erro padrão da média) de sêmen equino mantido sob resfriamento a 5°C por 72h em diluente com adição de goma xantana.

Horas	0	0,01%	0,12%	0,25%
0	99.8 \pm 0.5	99.8 \pm 0.5	99.8 \pm 0.5	99.8 \pm 0.5
24	99.8 \pm 0.5	99.6 \pm 0.5	98.0 \pm 1.3	98.8 \pm 1.2
48	99.4 \pm 0.5	98.4 \pm 0.6	97.7 \pm 1.6	99.6 \pm 0.1
72	99.3 \pm 0.5	99.4 \pm 0.5	97.7 \pm 2.1	99.6 \pm 0.5

Não houve diferença entre os tempos e tratamentos (ANOVA, $p < 0,05$).

Tabela 3. Percentual de integridade de acrossoma (média \pm erro padrão da média) de sêmen equino mantido sob resfriamento a 5°C por 72h em diluente com adição de goma xantana.

Horas	0	0,01%	0,12%	0,25%
0	79.1 \pm 1.6 ^{A,a}	79.1 \pm 1.6 ^{A,a}	79.1 \pm 1.6 ^{A,a}	79.1 \pm 1.6 ^{A,a}
24	61 \pm 2.9 ^{A,b}	63.6 \pm 3.2 ^{A,ab}	63.6 \pm 3 ^{A,ab}	62.5 \pm 3.6 ^{A,b}
48	55.5 \pm 2.2 ^{A,b}	54.1 \pm 3.2 ^{A,b}	48.8 \pm 3.8 ^{A,b}	58.5 \pm 3.8 ^{A,b}
72	52.9 \pm 4.1 ^{A,b}	53.5 \pm 2.9 ^{A,b}	48.7 \pm 3.5 ^{A,b}	48.3 \pm 3.4 ^{A,b}

^{a,b,c} Letras distintas indicam diferença estatística nas colunas (ANOVA, $p < 0,05$).

^{A,B} Letras distintas indicam diferença estatística nas linhas (ANOVA, $p < 0,05$).

4. CONCLUSÕES

A adição de goma xantana ao diluente de resfriamento de sêmen equino não apresentou efeito negativo na motilidade, exceto na concentração de 0,25%. A integridade de DNA e acrossoma não sofreram efeito negativo sobre nenhuma das concentrações testadas durante armazenamento a 5°C por até 72h.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CBRA: COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte: CBRA, 2013, 49 p.

EVENSON, D.P.; JOST, L.K.; MARSHALL, D.; ZINAMAN, M.J.; CLEGG, E.; PURVIS, K.; ANGELIS, P.; CLAUSSEN, O. P. Utility of the sperm chromatin structure

as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Hum Reprod.** v. 14, n. 4, p. 1039-1049, 1999.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; CASAS, J.A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: Production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, 18, 549-579, 2000.

GRAHAM, J.K. Principles of cooled semen. In: MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L. **Equine Reproduction**. Publishing Ltda. 2011, v.1, cap.127, p.1308-1315.

KAWAKAMI, E.; VANDEVOORT, C.A.; MAHI-BROWN, C.A.; OVERSTREET, J.W. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**. v.7, p.143-173, 1987.

KAWAMOTO, A.; KAZUTOMO, O.; KISHIKAWA, H.; ZHU, L.; AZUMA, C.; MURATA, Y. Two-color fluorescence staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrosomal status. **Fertil. Steril.** v.71, p.497 – 501, 1999.

KENNEY, R.M.; BERMAN, R.V.; COOPER, W.L et al. Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. In: **ANNUAL CONVENTION AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS**, 21., 1975, Boston. *Proceedings...* Boston, AAEP, p.327-336, 1975.

LOOMIS, P.R. Advanced methods for handling and preparation of stallion Semen. **Veterinary Clinics North American Equine Practice**, v.22, n.3, p. 663-676, 2006.

LÓPEZ-GATIUS F, SANCES G, SANCHO M, YÁNIZ J, SANTOLARIA P, GUTIÉRREZ R, et al. Effect of solid storage at 15 °C on subsequent motility and fertility of rabbit semen. *Theriogenology* 2005;64: 252–60.

PIMENTEL, C.A.; CARNEIRO, G.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução de eqüinos. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2ªed. São Paulo: Editora Roca. p.145-159. 2008.

SALVADOR, I.; YÁNIZ, J.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; GÓMEZ, E.A.; SILVESTRE, M.A. Effect of solid storage on caprine semen conservation at 5 °C. **Theriogenology**, v. 66, p.974–981, 2006.