

ALTERAÇÕES CINÉTICAS EM SÊMEN EQUINO COM DILUENTES CENTRIFUGADOS E SONICADOS

MARIA ISABEL SANTOS¹; FELIPE HARTWIG, ANDREIA ANCIUTI, STELA
GHELLER, PABLO FRACARO²; CARINE CORCINI³

¹UFPEl – mariaisabelvet@hotmail.com

²UFPEl – hartwig.fertilidade.equina@gmail.com; vet.andreia@gmail.com;
stelagheller@hotmail.com; pablofracaro@hotmail.com.

³UFPEl – corcinicd@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A gema de ovo tem sido amplamente utilizada como criopreservante para o sêmen de muitas espécies ao longo dos anos. Adaptou-se rapidamente ao manejo do congelamento de sêmen equino devido aos seus benefícios no congelamento da célula, apesar de o mecanismo para que isso ocorra ainda não estar minuciosamente elucidado.

Apesar de ser amplamente utilizada a gema de ovo trás consigo algumas desvantagens que torna seu uso contraditório, tais como o risco de contaminação, a falta de praticidade para seu preparo e uso, tendo em vista que o tamanho das partículas deve igualar-se ao do espermatozoide. Alterações na composição de cada gema podem ser bem comuns, principalmente a fração lipídica que pode variar de acordo com a dieta do animal (BOSSEAUE, et al., 1998).

Grande parte dos benefícios da gema provém do LDL (Low Density Lipoproteins) que compõe 2/3 do material. Os primeiros achados sobre essas moléculas surgiram em 1974 quando Pace e Graham realizaram uma ultracentrifugação para purificar a gema e notaram que neste método haveria uma melhor capacidade de crioproteção para o sêmen de touro (PACE et al., 1974). Assim entende-se que ao diminuir o tamanho da molécula do LDL há uma maior incorporação de lipídios pela célula espermática á beneficiando no congelamento e pós-descongelamento (PILLET, 2011).

Quando realizada a centrifugação é possível separar a gema em plasma, que possui em sua composição 85% de LDL e grânulos. Portanto, ao utilizar apenas o plasma é possível usar somente as moléculas de importância para o congelamento e diminuir a deterioração quando comparado ao usa da gema inteira (PILLET, 2011).

O objetivo deste trabalho é comparar se a centrifugação e a sonicação em diluentes a base de gema de ovo podem possuir alguma capacidade de melhorar os parâmetros espermáticos no descongelamento de sêmen equino.

2. METODOLOGIA

Para realizar este estudo foram utilizados 19 machos provenientes de uma central de reprodução equina, localizada na região de Pelotas-RS dentre os dias 15 a 19 de abril de 2019. Todos os animais mantinham a mesma dieta e característica seminais semelhantes.

O diluente, gema de ovo, era composto de 1, 856 g de citrato de sódio, 1g de glucose, 5% de glicerol, 80 ml de água de injeção, 20 ml de gema de ovo e possuía pH 7,0. Após esta etapa ser concluída, o diluente era fracionado em quatro tratamentos diferentes.

Onde o T1 possuía apenas o diluente sem nenhum tratamento. O T2 era centrifugado à 10.000 RCF na temperatura de 4°C durante 45 minutos, este processo era repetido três vezes, até haver uma boa separação das moléculas. No T3 o diluente sofria o processo de centrifugação e também de sonicação, onde o diluente previamente centrifugado passava por um processo no sonicador durante 30 minutos em uma amplitude de 50%, com uma probe de 3mm. Por fim, o tratamento T4 era apenas sonicado.

Já para o congelamento do sêmen, assim que as amostras chegavam ao laboratório eram analisadas quanto a motilidade espermática com o auxílio da microscopia de análises espermáticas computadorizadas (CASA). Após identificar que as amostras possuíam um parâmetro de motilidade mínima de 60%, sofriam um processo de centrifugação de 600g/10minutos, onde o sobrenadante era descartado e o pellet ressuspensionado. A curva de congelamento utilizada foi de 0,5°C/min até as amostras chegarem a 5°C, quando a temperatura desejada era atingida as amostras ainda eram mantidas refrigeradas por mais 30 minutos para a estabilização, para que assim o diluente de congelamento seja adicionado e as amostras sejam envasadas em palhetas de 0,5 ml e finalmente expostas ao vapor de nitrogênio e congeladas.

Para o descongelamento as palhetas eram imersas em banho maria a 37°C durante 30 segundos, após isso as amostras eram armazenadas em eppendorfs e incubadas por 10 minutos em uma placa aquecedora, para que finalmente análises cinéticas fossem realizadas. A análise estatística foi pelo método ANOVACASA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliados dois parâmetros cinemáticos das células espermáticas, sendo eles, motilidade total e motilidade progressiva.

Quando analisada a motilidade total o tratamento T4 apresentou melhor resultado, quando comparado aos tratamentos T1, T2 e T3 que não apresentaram diferença estatística entre si. Já ao analisarmos os parâmetros da motilidade progressiva, nenhuma diferença estatística foi encontrada. Conforme HU et al., (2006) através da ultracentrifugação espera-se que os detritos das células da gema se centralizam no pellet e o sobrenadante rico em LDL fica disponível, o que leva a uma maior disponibilidade dessas moléculas aos espermatozoides causando uma melhor qualidade de proteção no congelamento e descongelamento, porém esta qualidade da ultracentrifugação não foi verificada neste experimento, sendo que os tratamentos que sofreram o processo, não tiveram resultados significativos. Já pela sonicação as partículas sofrem uma microemulsão, o que permite que elas sejam incorporadas pela célula espermática, as protegendo em melhor qualidade (KENTISH, 2008).

A composição química do LDL é pouco complexa quando comparada a um diluente de gema de ovo, assim, direta ou indiretamente o LDL tem a capacidade de diminuir as alterações na membrana plasmática. Bergeron e Manjunath, vem discutindo um dos mecanismos que pode estar ligado a essa boa crioproteção, que seria o sequestro de proteínas BSP presentes no plasma seminal que poderiam impedir o efluxo de lipídios da membrana celular, essa proteína também foi isolada

no ejaculado de garanhões, porém em menor quantidade (MANJUNATH et al., 2002) (BERGERON et al., 2004).

A interação do LDL com o BSP é principalmente pelos fosfolipídeos, porém, como essa proteína se encontra em grande quantidade no plasma seminal e para o processo de congelamento o plasma é retirado, o espermatozoide não se ligaria mais a esta proteína. Assim, sugerindo que a fixação deve ocorrer antes da centrifugação para remoção do plasma, explicando dessa forma a proteção parcial ao espermatozoide (PILLET et al., 2011).

Tabela 1. Análises cinéticas após descongelamento realizadas pelo sistema CASA

Parâmetros	TRATAMENTOS			
	T1	T2	T3	T4
MT (%)	24,72 ±2,63 ^A	29,28±2,03 ^{AB}	24,20±2,28 ^B	34,77 ±1,82 ^B
MP (%)	10,70 ±1,33 ^A	12,16±0,96 ^A	9,89±1,13 ^A	13,17 ±0,83 ^A

MT= motilidade total, MP= motilidade progressiva

Letras diferentes significam diferenças estatísticas nas linhas. (P=0,05)

Já na motilidade progressiva nenhum dos tratamentos se destacaram com vantagens, não havendo diferenças estatísticas entre os mesmos. PILLET (2011) descreveu que ao comparar o espermatozoide de cães com diluentes de gema de ovo e de LDL, apresentara motilidades de 27,7% e 55,3% respectivamente, sugerindo que diluentes de gema de ovo podem conter componentes prejudiciais para a motilidade seminal, levando a uma diminuição da mesma. Pace e Graham (1974) também apresentaram resultados comparando o uso do LDL e do HDL (High Density Lipoproteins), sendo que o HDL foi tóxico para as células.

AMIRAT et al. (2005) também descreveu resultados semelhantes, onde houve uma perda de 80% dos espermatozoides congelados apenas com o diluente gema de ovo, e 3% de perda com os diluentes a base de LDL.

Segundo Kentish (2008), na sonicação espera-se que haja uma microemulsão das moléculas do diluente e que assim, fossem melhor absorvidas pelas células, entretanto as amostras que ficaram expostas aos diluentes centrifugados e sonicados apresentaram resultados não satisfatórios, o que pode estar associado a uma quebra das moléculas dos lipossomos em tamanhos muito pequenos, absorvidos pelas células espermáticas e que levam a queda na motilidade. O baixo desempenho de mobilidade dos espermatozoides leva a baixas taxas de fertilização in vivo (VERSTEGEN et al., 2002)

4. CONCLUSÕES

Ao analisarmos as motilidades totais apenas o tratamento 4 apresentou diferença significativa e destacou-se por uma boa qualidade no descongelamento das amostras equinas, mostrando que a sonicação pode ser usado em prol do congelamento de semên equino e que a microemulsão causada por esta processo, permite uma melhor proteção as células contra as crioinjúrias. Porém ao analisarmos os tratamentos para a motilidade progressiva, resultados não satisfatórios foram encontrados, necessitando de maiores estudos para elucidar um maior aproveitamento dos diluentes a base de gema de ovo centrifugados, sonicados ou não.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIRAT L, ANTON M, TAINTURIER D, CHATAGNON G, BATTUT I, COURTENS JL. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Trila - dyl, before, during and after freezing and thawing. **Reprod**, v. 129, p. 535, 2005.

BOUSSEAU S, BRILLARD JP, MARGUANT-LE GUIENNE B, GUERIN B, CAMUS A, LECHAT M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, v. 50, p. 699 – 706, 1998.

BERGERON A, CRE^TE M-H, BRINDLE Y, MANJUNATH P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biol Reprod**, v. 70, p. 708 –17, 2004.

HU, J. H. LI, Q, W. LI, G. CHEN, X,Y. HAI-YANG, H, Y. HANG, S, S. WANG, L, Q. The cryoprotective effect on frozen-thawed boar semen of egg yolk low density lipoproteins, **Asian australasian journal of animal sciences**, v. 19 p. 486 - 494, 2006.

KENTISH, S. WOOSTER, T. ASHOKKUMAR, M. BALACHANDRAN, S. MAWSON, R. SIMONS, L. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation, **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, p. 170-175, 2008.

MANJUNATH P, NAUC V, BERGERON A, MENARD M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biol Reprod**, v. 67, p. 1250, 2002.

PACE M. M, GRAHAM E. F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. **J Anim Sci**, v. 39, p. 1144, 1974.

PILLET, Elodie et al. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. **Theriogenology**, v. 75, n. 1, p. 105 -114, 2011.