

B-MERCAPTOETANOL NO CONGELAMENTO DE SÊMEN DE OVINOS DA RAÇA CRIOULA

PRADIEÉ, Jorgea¹; CARDOSO, Tainã F. ¹; MADEIRA, Elisângela M. ¹;
SCHIAVON, Raquel S. ¹; VIEIRA, Arnaldo Diniz¹

¹ Laboratório de Reprodução Animal – ReproPel - Faculdade de Veterinária – UFPel.
e-mail: tainaacardoso@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) tem sido amplamente utilizada para a produção animal como ferramenta para incrementar o ganho genético do rebanho. Neste âmbito, a criopreservação de sêmen é uma biotécnica de grande importância, permitindo a difusão de material genético e produção *in vitro* de embriões.

Contudo, o espermatozóide ainda é susceptível aos efeitos do estresse oxidativo, ocasionado pelo processo de congelamento do sêmen. Resultados obtidos na criopreservação de sêmen ainda são divergentes dentre espécies, devido às características próprias de estrutura e de composição lipídica das células espermáticas, explicando um maior ou menor efeito de proteção do diluidor aos espermatozoides (Holt, 2000).

O espermatozóide ovino além de possuir características na membrana em relação a sua composição lipídica (Bucak *et al*, 2007), não possui uma atividade antioxidante adequada para o processo de congelamento (Aisen *et al.*, 2000). Desta forma, os efeitos deletérios ocasionados pelos radicais livres, tais como as espécies reativas de oxigênio (ROS), causam a peroxidação dos lipídeos de membrana nesta célula, acarretando alterações estruturais e de permeabilidade. Havendo perda da seletividade, troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, além da formação de produtos citotóxicos (Ferreira & Matsubara, 1997), culminando na diminuição da viabilidade celular, o que acaba por diminuir o sucesso da criopreservação, reduzindo a fertilidade.

Uma estratégia para reduzir tais danos, mantendo a integridade das membranas e a viabilidade espermática, é aumentar a concentração de substâncias antioxidantes, visando um balanço entre a produção de ROS e a quantidade de antioxidantes. O uso de antioxidantes, junto ao diluidor de sêmen tem sido empregado em experimentos em várias espécies (Bilodeau, 2001; Maia *et al*, 2010; Barbosa, 2009) levando a inibição ou diminuição da produção ROS e radicais livres, embora ainda não intervindo nos parâmetros de viabilidade espermática.

Um promissor composto antioxidante é o β mercaptoetanol, que vem sendo empregado com sucesso na produção *in vitro* de embriões (De Matos *et al.*, 2002) tendo seu efeito correlacionado com a biosíntese intracelular da glutatona, um antioxidante natural (De Matos e Furnus, 2000).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do antioxidante β mercaptoetanol (BME) no diluente para criopreservação de sêmen ovino.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Foram utilizados cinco machos ovinos da raça Crioula, alojados nas dependências do Biotério Central da UFPel. Os animais foram submetidos a seis coletas de sêmen, sendo duas coletas por semana, mediante o uso de vagina artificial. Imediatamente após a coleta, os ejaculados foram diluídos 1:1 (v/v) em diluente base (Evans & Maxwell, 1987) em condições isotérmicas. Posteriormente, através da câmara de Neubauer, determinou-se a concentração espermática para a

formulação de *pool* com contribuição igual entre os machos. Deste *pool* foram retiradas alíquotas para as avaliações pré-criopreservação. Após a constituição do *pool* procedeu-se seu fracionamento entre os tratamentos Tris-gema sem BME (T1) e Tris-gema com 7,5 mM de BME (T2). As concentrações foram ajustadas para 50×10^6 espermatozoides/palheta com 0,25 mL para o congelamento.

Para o congelamento, o sêmen já envasado, foi resfriado em geladeira a 5°C durante duas horas antes de serem congeladas a -80° C em vapor de nitrogênio por 10 minutos e armazenadas em botijão criogênico a -196 ° C.

Para as avaliações pós-descongelamento as palhetas foram submersas em banho-maria por 30 segundos a 36° C. Foi realizada uma incubação durante 10 minutos para a estabilização das amostras e posteriormente realizadas análises de motilidade através de microscopia óptica, em aumento de 200x. Para as análises de integridade de membrana, realizadas com sêmen fresco diluído e pós-descongelamento, foram utilizadas as sondas fluorescentes Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídio (IP), conforme descrito por Harrison & Vickers (1990). A avaliação foi feita em microscópio de epifluorescência, através de excitação em filtro WU com comprimento de onda de 525 nm, sob aumento de 400x. Foram contadas 100 células espermáticas, classificando-as conforme sua coloração, em íntegros (corados em verde) ou lesados (corados em vermelho). Enquanto para a integridade de acrossoma, foi utilizada a associação das sondas Iodeto de Propídio (IP) e Fluoresceína Isotil Cianato (FITC), modificado de Kawamoto *et al.* (1999). Também foram consideradas 100 células espermáticas, classificando como íntegra a célula corada em verde sem deformação do contorno, através de microscópio de epifluorescência, pela excitação em filtro WU com comprimento de onda de 490 nm e emissão de 520 nm, sob aumento de 1000x.

As avaliações dos dados não paramétricos foram realizadas através do teste Kruskal-Wallis, enquanto as avaliações de integridade de membrana e acrossoma foram realizadas através das análises de variância ANOVA usando software Statistix® (2009).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para que um espermatozóide esteja apto a fecundar é necessário que apresente motilidade progressiva e integridade de membranas plasmática e acrossomal após seu descongelamento. E dentre os fatores que influenciam na qualidade espermática pós-descongelamento estão os radicais livres e as ROS. Provocando a redução da motilidade espermática (Bilodeau, et al., 2001), além de comprometer sua viabilidade devido a danos nas membranas e material genético (Peris, et al.2007).

Porém, não foram encontradas diferença estatística ($P < 0,05$) com relação aos parâmetros espermáticos de motilidade e integridade de acrossoma entre T1 e T2 após descongelamento. Enquanto, no parâmetro integridade de membrana, foi observada uma redução significativa ($P < 0,05$) no tratamento T2.

O parâmetro de motilidade seminal pós-descongelamento exibiu valores recomendados pelo Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal do CBRA (1998). Embora tenha ocorrido diferença estatística para a integridade de membrana plasmática, T1 e T2 (66% e 40,5% respectivamente).

Tabela 1. Média e desvio-padrão da motilidade, integridade de acrossoma e integridade de membrana pós-descongelamento.

Tratamento	Motilidade pós-descongelamento	Integridade de Acrossoma	Integridade de Membrana
Controle (T1)	35 ± 10,48	35 ± 18,43	66 ± 17,01 ^a
Com βME (T2)	32 ± 7,52	30 ± 18,85	40,5 ± 17,62 ^b

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (P<0,05).

Com isso, busca-se reduzir os danos celulares causados por radicais livres e também espécies reativas de oxigênio (ROS), utilizando diferentes tipos de antioxidantes no congelamento de sêmen ovino (Sicherle, et al. 2011; Maia, et al. 2010; Bucak, et.al. 2008). Entretanto, os resultados obtidos não permitiram um incremento significativo na viabilidade espermática pós-congelamento. Esta resposta pode ter sido provocada pela rota de atuação dos antioxidantes utilizados.

4 CONCLUSÃO

Os resultados deste experimento demonstraram que a adição do antioxidante βmercaptoetanol na concentração de 7,5 mM não conferiu proteção á célula espermática processo de congelamento, além de prejudicar a integridade da membrana plasmática. Outros estudos já estão sendo realizados com objetivo de determinar a melhor concentração do antioxidante, juntamente com ensaios para determinação da concentração de ROS.

5 REFERÊNCIAS

- AISEN, E.G.; ALVAREZ, H.L.; VENTURINO, A.; GARDE, J.J. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. **Theriogenology**, v. 53, p.1053-1061.2000.
- BARBOSA, Filipa Ferreira da Silva. **Influência dos antioxidantes na qualidade do sêmen de homens em tratamento de fertilidade**. 2009. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente). Universidade de Lisboa. Lisboa, 2009.
- BILODEAU, J. F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, I C.; SIRARD, M.A. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v. 56, p. 275-286, 2001.
- BUCAK M.N., ATESSAHIN A., VARISLI O., YUCE A., TEKIN N., AKÇAY A. The influence of trealose, taurine cysteamine and hyaluronidase on ram semen parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**, v.67, p.1060-1067. 2007.
- BUCAK, M. N., ATESSAHIN, A., YUCE, A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. **Small Ruminant Research**, v.75, p.128–134, 2008.
- CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal/ **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998, 49p
- DE MATOS, D. G.; GASPARRINI, B.; PASQUALINI, S.R.; THOMPSON,J.G. Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on

embryo development and intracellular peroxid content. **Theriogenology**, v. 57, p.1443-1451, 2002.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development effect of betamercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology**, v. 53, p. 761-771, 2000.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C.. **Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats**. Australia: Star Printery Pty Ltd, p.194, 1987.

FERREIRA, A. L. A., MATSUBARA L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, p. 61-68, 1997.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 343-352, 1990.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p.03-22, 2000.

KAWAMOTO, A. M.D., OHASHI, K.M.D., KISHIKAWA, H.M.D., ZHU, L.M.D., AZUMA, C. M.D., MURATA, Y.M.D. Two-color fluorescence staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrosomal status. **Fertility and Sterility** v. 71, p.497-501, 1999.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D.; SICHERLE, C.C.; RODELLO, L.; GALLEGRO, I.C.S. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v. 122, Issues 1-2, p.118-123, 2010.

PERIS, S.I., BILODEAU, J.F., DUFOUR, M., BAILEY, J.L. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p.878-892, 2007.

SALAMON, S., MAXWEL, W.M. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.77-111, 2000.

SICHERLE, C.C.; MAIA, M.S.; BICUDO, S.D.; RODELLO, L.; AZEVEDO, H.C. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox. **Small Ruminant Research**, v. 95, p.144-149, 2011.