

# Criopreservação do Sêmen Ovino com Adição de Gelatina ao Meio Diluidor

*Rebeca Santos da Silva<sup>1</sup>; Allan Andrade Rezende<sup>2</sup>; Anderson Marques Pinto Bandeira<sup>3</sup>; José Eduardo Matos<sup>4</sup>; Hymerson Costa Azevedo<sup>5</sup>*

## Resumo

A criopreservação de sêmen tem trazido efeitos benéficos em programas de melhoramento animal. O uso da gelatina pode minimizar as crioinjúrias no sêmen criopreservado. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da adição de gelatina na qualidade e fertilidade do sêmen ovino congelado. Foram utilizados seis carneiros e 92 ovelhas da raça Santa Inês. Amostras de sêmen foram diluídas sem (controle) e com (tratamento) adição de gelatina a 1,5% ao meio, envasadas em palhetas de 0,25 mL, congeladas automaticamente e, submetidas às seguintes avaliações: cinética espermática pela análise computadorizada de sêmen (SCA<sup>®</sup>), integridades das membranas plasmática e acrossomal utilizando o microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 50i, e taxa de prenhez após inseminação transcervical em tempo fixo em ovelhas submetidas à sincronização do estro. Conclui-se que a adição da gelatina não melhora a qualidade e fertilidade do sêmen congelado de ovinos e que, apesar dos prejuízos observados na cinética, estes não se refletiram em diminuição da fertilidade à inseminação artificial.

**Palavras-chave:** análise computadorizada de sêmen; criopreservação; gelatina.

<sup>1</sup> Graduanda em Medicina Veterinária, bolsista CNPq/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, beca19silva@hotmail.com.br.

<sup>2</sup> Graduando em Medicina-Veterinária, bolsista CNPq/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, allan\_a.rezende@hotmail.com.br.

<sup>3</sup> Mestre em Biotecnologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, SE, marquespbandeira@yahoo.com.br.

<sup>4</sup> Mestrando em Zootecnia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, SE, eduardomatos@zootecnista.com.br.

<sup>5</sup> Médico-veterinário, Doutor em Medicina Veterinária, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, hymerson.azevedo@embrapa.br.

## Introdução

A biotecnologia tem sido de grande importância na reprodução animal, tendo as técnicas de criopreservação de sêmen trazido resultados benéficos em programas de melhoramento animal. (WATSON, 2000).

A manutenção da qualidade do sêmen durante a congelação depende dentre outras coisas da capacidade do diluidor em promover um ambiente apropriado para o espermatozóide (ROCA et al., 2000). No processo de criopreservação, a célula espermática está vulnerável ao choque térmico entre 15 e 5° C, faixa em que uma velocidade rápida de refrigeração induz a danos irreversíveis a sua motilidade e capacidade fertilizante (WATSON, 2000), e entre -5 e -10 °C, inicia-se a formação de cristais de gelo no meio extracelular, alterando o equilíbrio osmótico e ocasionando a desidratação celular (SQUIRES, 1999). A viabilidade e um maior tempo de sobrevivência dos espermatozoides da espécie ovina requerem diluidores que permitam uma maior proteção das células espermáticas, o meio diluidor conhecido como glicina-gema-leite (GGL) tem sido testado e mostrado eficiência na preservação do sêmen de ovinos (GONZALEZ, 1996). O experimento foi realizado com objetivo de avaliar a adição de gelatina na qualidade e fertilidade do sêmen ovino congelado.

## Material e Métodos

Para o experimento foram selecionados seis carneiros e 92 ovelhas da raça Santa Inês. Os carneiros selecionados foram submetidos a uma série de coletas de sêmen por meio de vagina artificial. As amostras com motilidade acima de 70% foram utilizadas para formação de um pool. Posteriormente, alíquotas de sêmen foram transferidas para tubos de ensaio previamente aquecidos contendo os meios diluidores à base de Glicina-Gema-Leite (controle: pH- 7,0; osmolaridade- 1400 mOsm/L) e Glicina-Gema-Leite com gelatina (pH- 6,9; osmolaridade- 1590 mOsm/L) (GONZALEZ, 1996). Após a diluição as amostras de sêmen diluído foram envasadas em palhetas de 0,25 mL (com  $100 \times 10^6$  espermatozoides por palheta) e foram congeladas utilizando-se a máquina TK® 4000.

A avaliação da motilidade espermática foi realizada pelo sistema computadorizado de análise de sêmen - SCA®. Análise da integridade das membranas plasmática e acrossomal foram realizadas sob microscopia

epifluorescente, pela associação de diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio, seguindo a técnica descrita por Harrison e Vickers (1990). Os tratamentos foram avaliados quando à fertilidade *in vivo* após inseminação artificial (IA). Para tanto, 92 ovelhas foram divididas aleatoriamente entre os grupos experimentais.

Para as análises estatísticas dos dados *in vitro* utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade. Os dados normais foram submetidos à ANOVA pelo método de General Linear Model (GLM) e os dados não normais pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon. A taxa de prenhez foi analisada pelo teste não-paramétrico de Qui-quadrado. Utilizou-se o nível de significância de 5% utilizando recursos computacionais do software SPSS 15.0.

## Resultados e Discussão

Os resultados das avaliações *in vitro* do sêmen congelado viabilidade espermática, integridade das membranas plasmática e acrossomal estão apresentados na Tabela 1. Não houve diferença ( $p > 0,05$ ) nesses parâmetros entre o grupo controle e tratado com gelatina.

**Tabela 1.** Avaliação *in vitro* (média  $\pm$  desvio padrão) do sêmen ovino Santa Inês tratado com gelatina e congelado.

Parâmetro	Meio Diluidor ( $x \pm \sigma$ )	
	Controle	Gelatina
Viabilidade espermática (VE, %)	43,0 $\pm$ 15,3	45,6 $\pm$ 21,9
Integridade da membrana plasmática (IMP, %)	30,4 $\pm$ 17,9	37,2 $\pm$ 24,4
Integridade da membrana acrossomal (IMAP, %)	56,1 $\pm$ 21,4	62,0 $\pm$ 23,1

Não houve diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ )

Os resultados da avaliação *in vitro* referente à análise computadorizada da cinética espermática do sêmen congelado estão apresentados na Tabela 2. A adição da gelatina ao meio diluidor diminuiu ( $p < 0,05$ ) a MP, VCL, VSL, VAP e o ALH. Os parâmetros, MT, STR, LIN e BCF não apresentaram diferenças ( $p > 0,05$ ) entre o grupo controle e gelatina.

**Tabela 1.** Avaliação *in vitro* (média  $\pm$  desvio padrão) do sêmen ovino Santa Inês tratado com gelatina e congelado.

Parâmetro	Meio Diluidor ( $x \pm \sigma$ )	
	Controle	Gelatina
<b>Motilidade total (MT, %)</b>	90,6 $\pm$ 6,7	84,6 $\pm$ 12,2
<b>Motilidade progressiva (MP, %)</b>	37,9 $\pm$ 9,2a	30,6 $\pm$ 11,3b
<b>Velocidade curvilinear (VCL, <math>\mu</math>m/s)</b>	269,1 $\pm$ 48,6a	220,8 $\pm$ 61,3b
<b>Velocidade em linha reta (VSL, <math>\mu</math>m/s)</b>	165,7 $\pm$ 40,8a	135,1 $\pm$ 44,9b
<b>Velocidade média do percurso (VAP, <math>\mu</math>m/s)</b>	209,5 $\pm$ 43,6 <sup>a</sup>	173,0 $\pm$ 52,6b
<b>Linearidade (LIN, %)</b>	61,4 $\pm$ 8,1	60,6 $\pm$ 8,9
<b>Retilinearidade (STR, %)</b>	78,6 $\pm$ 4,9	77,4 $\pm$ 6,6
<b>Amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, <math>\mu</math>m)</b>	2,8 $\pm$ 0,5a	2,5 $\pm$ 0,4 b
<b>Frequência do batimento flagelar cruzado (BCF, Hz)</b>	45,9 $\pm$ 4,5	43,3 $\pm$ 4,2

Médias seguidas por letras distintas, dentro de cada parâmetro avaliado, indicam diferenças entre meios diluidores ( $p < 0,05$ ).

Na análise *in vivo*, a adição da gelatina ao meio diluidor não influenciou ( $p > 0,05$ ) a taxa de prenhez: 19,6% (9/46) vs. 21,7% (10/46) para o grupo inseminado com sêmen congelado aditivado da gelatina e controle, respectivamente.

A adição de gelatina não promove nenhum incremento qualitativo ao sêmen congelado de ovinos. Os poucos estudos que têm testado a adição da gelatina ao sêmen congelado têm mostrado que ela não traz benefícios em ovinos (SCHIAVON et al., 2006) e coelhos (CORTELL; VIUDES DE CASTRO, 2008). Neste estudo, o diluidor com gelatina apresentou maior osmolaridade (1590 mOsm) que o controle (1400 mOsm). Este pode ser um dos fatores responsáveis pelas diferenças observadas nos parâmetros de cinética espermática.

## Conclusões

A adição da gelatina não melhora a qualidade do sêmen congelado e taxa fertilidade de ovinos.

## Agradecimentos

À Embrapa Tabuleiros Costeiros pela disponibilização dos equipamentos e dos reprodutores. Ao CNPQ pela bolsa de iniciação científica.

## Referências

CORTELL, C.; VIUDES DE CASTRO, M. P. Effect of gelatin addition to freezing extender on rabbit semen parameters and reproductive performance. **9th World Rabbit Congress**, 2008, Verona, Italy. Reproduction, p. 327-331, 2008.

GONZALEZ, C. I. M. **Avaliação "in vitro" e "in vivo" de sêmen ovino (Ovis aries) congelado em palhetas e "pellets" com diferentes diluidores**. Botucatu, 1996. Tese Doutorado em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

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.

ROCA, J.; MARTÍNEZ, S.; VÁZQUEZ, J. M., et al. Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15°C. **Animal Reproduction Science**, Amsterdã, v. 64, p.103-112, 2000.

SCHIAVON, R. S.; AMARAL, J. I.; GASTAL, G. D. A., et al. **Efeito da gelatina e da lipoproteína de baixa densidade sobre a motilidade do sêmen ovino após o descongelamento**. XVII Congresso Estadual de Medicina Veterinária, Gramado - RS, 2006.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; MCCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Principles of cryopreservation. In: **Cooled and frozen Stallion Semen**, 1999.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.481-492, 2000.