

# Reconcentração do sêmen congelado de carneiros por centrifugação da palheta após a descongelação: efeito sobre a viabilidade, capacitação e reação acrossomal dos espermatozóides

*Ana Cláudia França de Freitas<sup>1</sup>, Juliana Ramos de Souza Santos<sup>2</sup>, Rebeca Santos da Silva<sup>3</sup>, Fabiana Almeida Bidegain<sup>4</sup>, Paulo César Falanghe Carneiro<sup>5</sup>, Alexandre Nizio Maria<sup>6</sup>, Hymerson Costa Azevedo<sup>7</sup>*

## Resumo

Um dos problemas da técnica de inseminação artificial cervical (IAC) é o refluxo que ocorre durante este procedimento causando uma diminuição de sêmen e conseqüentemente dos espermatozoides disponíveis para a fertilização. A centrifugação do sêmen é uma alternativa para se depositar um elevado número de espermatozoides viáveis em pequenos volumes e que pode diminuir ou evitar o refluxo da dose inseminante na IAC. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da centrifugação da dose inseminante após a descongelação sobre a viabilidade espermática, capacitação e reação acrossomal dos espermatozoides a fim de estudar esta estratégia de redução do volume da dose inseminante. Amostras de sêmen de cinco carneiros Santa Inês foram coletadas através de vagina artificial, diluídas em meio glicina-gema-leite, envasadas em palhetas de 0,25mL com concentração espermática de  $400 \times 10^6$ /mL e, congeladas de forma automatizada (refrigeração a  $0,5^\circ\text{C}/\text{min}$  até  $5^\circ\text{C}$ , estabilização por 90 minutos, congelação a  $15^\circ\text{C}/\text{min}$  de  $5$  à  $-80^\circ\text{C}$  e  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  de  $-80$

<sup>1</sup> Médica-veterinária, mestre em Zootecnia, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE.

<sup>2</sup> Graduando em Medicina Veterinária da Faculdade Pio Décimo, bolsista Fapitec/PIBIC, Aracaju, SE.

<sup>3</sup> Médica-veterinária, mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE.

<sup>4</sup> Engenheiro-agrônomo, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>5</sup> Zootecnista, doutor em Produção Animal, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>6</sup> Veterinário, doutor em Reprodução Animal, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

à  $-140^{\circ}\text{C}$  e, imersão em nitrogênio líquido à  $-196^{\circ}\text{C}$ ). As palhetas foram descongeladas a  $37^{\circ}\text{C}/30\text{s}$  e divididas em um grupo não centrifugado (NC) e três grupos centrifugados durante 10 minutos em três diferentes velocidades: C800, C1000 e C1200 rpm correspondendo respectivamente a 96, 150 e 217 g. Utilizando-se um microscópio de epifluorescência, foram mensurados, logo após a descongelação e incubação ( $37^{\circ}\text{C}$ ) por 2 e 4h, a integridade das membranas plasmática (IMP), pela combinação dos fluorocromos SYBR<sup>®</sup>green e iodeto de propídio e, o *status* de capacitação e reação acrossomal dos espermatozoides pela clortetraciclina (CTC). Os percentuais de IMP obtidos nos grupos centrifugados a 800 e 1000 rpm não diferiram ( $p > 0,05$ ) do grupo controle não centrifugado em todos os momentos. Por outro lado, a centrifugação a 1200 rpm aumentou ( $p < 0,05$ ) o número de células lesadas em todos os tempos de incubação. De um modo geral, a centrifugação provocou uma diminuição ( $p < 0,05$ ) de células não capacitadas e sem reação acrossomal. Conclui-se que os espermatozoides submetidos à centrifugação após a descongelação mantêm a sua viabilidade numa força centrífuga de 96 e 150 g, porém, até 217 g têm sua capacitação e reação acrossomal induzidas com maior frequência.

**Palavras-chave:** criopreservação, integridade de membrana plasmática, ovinos.

## Introdução

A inseminação artificial (IA) é uma técnica que permite o melhoramento de raças, já que o patrimônio genético dos reprodutores é utilizado de forma mais eficiente, podendo ser difundida para maior número de fêmeas. Nessa prática, a utilização do material congelado proporciona maior facilidade de manutenção por tempo indeterminado e do transporte e uso de germoplasma de referência para melhoria do rebanho. Por outro lado, a diminuição da taxa de fertilidade é observada após o processo de congelamento e descongelamento e está relacionada principalmente, aos danos causados ao funcionamento e às estruturas das membranas dos espermatozoides (PARKS; GRAHAM, 1992).

Em ovinos, a IA cervical (IAC) é uma opção menos onerosa que não exige mão-de-obra tão especializada quanto a IA laparoscópica (IAPL), entretanto apresenta baixa fertilidade devido, dentre outras coisas, à perda parcial da dose inseminante por refluxo, ocasionado pela capacidade volumétrica limitada

da cérvix da ovelha. A centrifugação é uma alternativa para reduzir o volume dessa dose, concentrando os espermatozoides que são depositados na cérvix da ovelha. Porém, a centrifugação pode causar danos às células espermáticas (URREGO, 2008) interferindo nos resultados de fertilidade.

Esse trabalho objetivou testar a centrifugação do sêmen congelado na palheta após a descongelação, como método de reconcentração espermática e redução do volume da dose inseminante, avaliando-se o seu efeito sobre a viabilidade, reação e capacitação acrossomal dos espermatozoides.

## Material e Métodos

As atividades de colheita e a criopreservação do sêmen foram realizadas no Campo Experimental Pedro Arle, propriedade da Embrapa Tabuleiros Costeiros localizado no agreste sergipano (Latitude: 10°36'13.73''Sul e Longitude: 37°38'5.97''Oeste). As análises seminais foram conduzidas no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LABRA) da mesma instituição.

Foram utilizados ovinos da raça Santa Inês criados em regime semi-intensivo com acesso a sal mineral e água *ad libitum* todos em bom estado clínico e nutricional e sem histórico de problemas reprodutivos e sanitários. Cinco carneiros (n=5) com idade (36,5 ± 0,3 meses) e peso vivo (82,4 ± 5,9 kg) uniformes foram selecionados como doadores de sêmen a partir de exames andrológicos prévios.

As colheitas de sêmen foram feitas com vagina artificial à temperatura de 42°C usando-se fêmeas em estro. Os ejaculados (três por carneiro) foram mantidos em banho-maria à 32°C sendo selecionadas amostras com os parâmetros espermáticos mínimos de 70% de motilidade e 3 de vigor avaliados subjetivamente, 60% de viabilidade (coloração de eosina-nigrosina) e no máximo de 20% de alterações morfológicas (câmara úmida – Tampão Fosfato-Salina - Phosphate Buffered Saline - PBS + 0,2% de glutaraldeído), semelhante ao preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

Para a congelação cada ejaculado colhido foi diluído em meio Glicina-Gema-Leite, segundo Gonzalez (1996) com modificações realizadas por Bandeira

(2011) e Rodello et al. (2011), sendo envasados à temperatura ambiente ( $\pm 27^{\circ}\text{C}$ ) em palhetas de 0,25mL com concentração de  $400 \times 10^6/\text{mL}$  e submetidos à congelação automatizada (refrigeração a  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até  $5^{\circ}\text{C}$ , estabilização por 90 minutos, congelação à  $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até  $-80^{\circ}\text{C}$  e à  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até  $-140^{\circ}\text{C}$  e, imersão no nitrogênio líquido à  $-196^{\circ}\text{C}$ ).

Foram avaliadas três palhetas de cada ejaculado ( $n=3$ ) por carneiro ( $n=5$ ), totalizando 45 amostras. Essas amostras contidas nas palhetas foram descongeladas à  $37^{\circ}\text{C}/30\text{s}$  sendo divididas em grupos: controle (não centrifugado-NC) e tratamentos (centrifugados-C). O grupo NC foi formado pela retirada de uma alíquota de sêmen de todas as palhetas antes da centrifugação. Os grupos tratamento (C) foram representados por amostras de sêmen removidas após a centrifugação das palhetas durante 10 minutos em uma centrífuga (Centribio® – Mod. 80 2B, Centribio Co., LTDA, China) adaptada, aplicando-se três diferentes velocidades 800, 1000 e 1200 rpm correspondendo a respectivamente 96, 150 e 217 g.

Para avaliar a viabilidade espermática foi analisada a integridade da membrana plasmática (IMP) utilizando-se a combinação dos fluorocromos SYBR® Green e iodeto de propídio (Kit 1-7011 LIVE/DEAD, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA), com metodologia adaptada àquela descrita por Garner e Johnson (1995). Foram retirados  $50\mu\text{L}$  da amostra seminal diluída a uma concentração de  $15 \times 10^6$  espermatozoides/mL em solução de avaliação, sendo adicionados  $2,5\mu\text{L}$  ( $10\mu\text{M}$ ) de SYBR® para a incubação ( $37^{\circ}\text{C}/5\text{min}$ ). Depois disso foram adicionados  $2,5\mu\text{L}$  ( $120\mu\text{M}$ ) de iodeto de propídio e  $2,0\mu\text{L}$  de glutaraldeído a 1% em solução Tampão Fosfato-Salina (Phosphate Buffered Saline - PBS), sem cálcio (BARTH; OKO, 1989), e feita a leitura após a incubação ( $37^{\circ}\text{C}/5\text{min}$ ). Foram analisadas 200 células por amostra em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss Axio Imager A2, Alemanha) sob magnitude de 1000x, usando-se filtro de excitação de 450-490nm e de emissão de 515 nm. Foram considerados como viáveis aqueles espermatozoides portadores de membranas plasmáticas íntegras (cabeça corada somente de verde) e inviáveis aqueles com membranas plasmáticas lesadas (cabeça com qualquer proporção de vermelho).

Para avaliar a capacitação e reação acrossomal dos espermatozoides, foi utilizado o teste da clortetraciclina (CTC) segundo metodologia descrita por

Gillan et al. (1997) e adaptada por Azevedo (2006). Após a diluição em 1000  $\mu\text{L}$  de solução pré-aquecida ( $37^\circ\text{C}$ ) de PBS sem cálcio (BARTH; OKO, 1989), as amostras do grupo NC contendo  $20 \times 10^6$  espermatozoides foram submetidas à etapa de centrifugação (400 g/4min) para a remoção do sobrenadante e utilização do *pellet*. Os grupos submetidos à centrifugação (C), não passaram por essa etapa a fim de não sofrerem uma centrifugação adicional. Amostras de 5 $\mu\text{L}$  contendo espermatozoides ressuspendidos (NC) ou não (C) foram mantidas em 150  $\mu\text{L}$  de PBS em um microtubo ao qual foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de solução de 1 mM de CTC. A mistura foi homogeneizada e nela adicionada 2  $\mu\text{L}$  de solução de glutaraldeído a 1% para fixar os espermatozoides.

A análise foi feita em 200 espermatozoides em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss Axio 210 Imager A2, Alemanha) sob magnitude de 1000x, excitação de 450-490 nm e de emissão de 515nm, classificando-os como F (não capacitados com acrossomo intacto), B (capcitados com acrossomo intacto) ou AR (com acrossomo reagido).

## Resultados

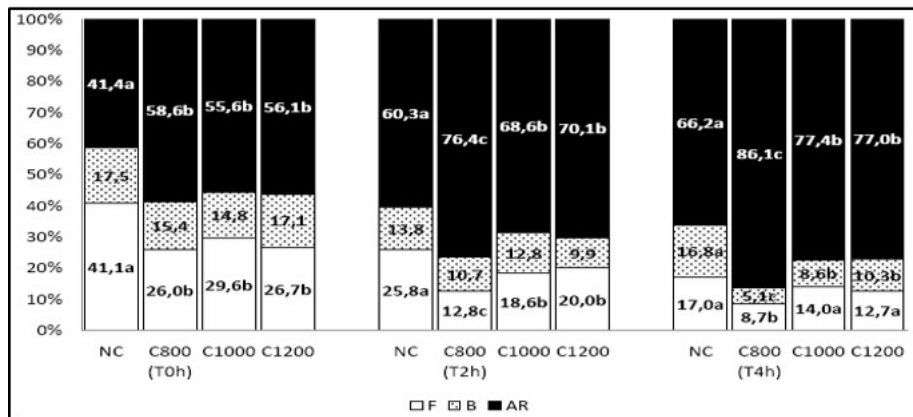
Os resultados de avaliação da integridade de membrana plasmática estão expostos na Tabela 1. Foi possível observar que as palhetas submetidas a 1200rpm apresentaram menor ( $p < 0,05$ ) proporção de espermatozoides com membrana plasmática íntegra no T0, T2 e T4h em relação aos demais grupos que não apresentaram diferenças significativas entre si ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 1.** Efeito da força centrífuga (C) aplicadas à palheta de sêmen de carneiros imediatamente após a descongelação (T0h) e incubação (T2h e T4h) sobre o parâmetro de integridade de membrana plasmática (média  $\pm$  desvio padrão).

Parâmetro	Tempo	Grupos experimentais			
		NC	C800	C1000	C1200
IMP (%)	0h	29,9 $\pm$ 9,7a	31,1 $\pm$ 10,6a	28,3 $\pm$ 11,0a	22,6 $\pm$ 8,9b
	2h	9,4 $\pm$ 8,1a	10,0 $\pm$ 7,3a	13,5 $\pm$ 8,5a	0,20 $\pm$ 0,56b
	4h	4,1 $\pm$ 5,1a	5,1 $\pm$ 7,1a	5,1 $\pm$ 5,3a	0,9 $\pm$ 2,6b

NC - grupo controle não centrifugado; C800, 1000 e 1200 – grupos centrifugados a 800, 1000 e 1200 rpm (96, 150 e 217 g respectivamente); IMP - integridade de membrana plasmática. Teste de Scott-knott  $p < 0,05$  para médias seguidas de letras diferentes na mesma linha.

Os resultados da avaliação da capacitação e reação acrossomal estão expostos na Figura 1. Nos momentos 0 e 2h, a porcentagem de espermatozoides da população F foi superior ( $p < 0,05$ ) no grupo controle em relação aos demais. Após 4h de incubação o grupo C800 apresentou a menor média ( $p < 0,05$ ) de F quando comparado aos demais grupos que não tiveram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre si. O percentual de espermatozoides capacitados (B) não diferiu entre os grupos testados ( $p > 0,05$ ) no T0h e T2h, não obstante, pôde-se observar no T4h uma menor proporção de B para o grupo C800, enquanto os demais não apresentaram diferença significativa entre si. Em comparação com o controle, o número de espermatozoides da população AR foi superior ( $p > 0,05$ ) para todos os grupos submetidos à centrifugação independentemente da força centrífuga aplicada e do tempo de incubação.



**Figura 1.** Representação gráfica da distribuição de espermatozoides não capacitados com acrossomo intacto (F), capacitados com acrossomo intacto (B) e com acrossomo reagido (AR) nas diferentes forças de centrifugação (NC - grupo controle não centrifugado, C800, 1000 e 1200 – grupos centrifugados a 800, 1000 e 1200 rpm 96, 150 e 217 g respectivamente) da palheta de sêmen de carneiros imediatamente após a descongelação (TOh) e incubação (T2h e T4h). Teste de Scott-knott  $p < 0,05$  para médias seguidas de letras diferentes no mesmo grupo de colunas.

## Conclusões

A estratégia de centrifugar as palhetas com sêmen congelado após a descongelação para reconcentrar os espermatozoides e diminuir o volume da dose inseminante não ocasiona prejuízos quanto à viabilidade espermática quando forças centrífugas de 96 e 150 g são utilizadas. Entretanto, centrifugações entre 96 e 217 g promovem um aumento da proporção de espermatozoides capacitados e principalmente com reação acrossomal o que pode diminuir seu tempo de vida útil.

## Agradecimentos

À Fapitec pela concessão da bolsa e à TK Equipamentos para Reprodução.

## Referências

ARRUDA, R. P. de; CELEGHINI, E. C. C; ANDRADE, A. F. C; GARCIA, A. R; NASCIMENTO, J; RAPHAEL C. F; SOUZA, L. W. O. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1., 2014, Londrina. **Anais...** Londrina: Geraembryo Reprodução Bovina, 2014.

BICUDO, S. D.; SOUSA, D. B.; TAKADA, L. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado e técnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 120-127, 2003.

CEZAR, M. F; SOUZA, B. B. de; SOUZA, W. H. de; FILHO, E. C. P; TAVARES, G. de P; MEDEIROS, G. X. Avaliação de parâmetros fisiológicos de ovinos Dorper, Santa Inês e seus mestiços perante condições climáticas do trópico semi-árido nordestino. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 3, may./jun., 2004

GOMES, G. M.; GOMES, L. P. M.; Problemas e soluções com o uso de sêmen congelado e refrigerado de garanhões da raça Mangalarga Marchador. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, n. 6, p. 210-215, dez. 2009.

LIMA, F. R. G.; ARAUJO, A. A. de; SANTOS, D. O.; FACO, O.; CATUNDA, A. G. V.; LIMA, I. C. S.; LINARD, M. A. B. Efeito da concentração espermática sobre sêmen congelado de carneiros da raça Santa Inês. In: CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL, 5.; SIMPÓSIO NORDESTINO DE ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES, 11.; SIMPÓSIO SERGIPANO DE PRODUÇÃO ANIMAL, 1., 2008, Aracaju. **Anais...** Aracaju: Sociedade Nordestina de Produção Animal; Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2008.

MEXIA, A. A; MACEDO, F. A. F. de; ALCALDE, C. R; SAKAGUTI, E. S; MARTINS, E. N; ZUNDT, M; YAMAMOTO, S. M; MACEDO, R. M. G. de. Desempenhos Reprodutivo e Produtivo de Ovelhas Santa Inês Suplementadas em Diferentes Fases da Gestação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 3, p. 658-667, 2004.



**PINHEIRO, C. B. M. Uso do sêmen ovino congelado em inseminações artificiais cervicais e fatores que afetam a fertilidade do rebanho.** 2009. 47 f. Dissertação (Mestrado do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.