

Interação de diluidores e taxas de congelação sobre a qualidade do sêmen criopreservado de carneiros: Resultados parciais

SOUZA, Ingrid Ellen Andrade¹; MOLINA, Julio Constantino Jerf²; AZEVEDO, Hymerson Costa³

¹ Graduanda em Medicina Veterinária, bolsista CNPq/PIBIC, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

² Mestre em Produção Animal, bolsista de doutorado FAPITEC/SE, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE

³ Médico Veterinário, doutor em Reprodução Animal, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

Resumo - Este trabalho teve como objetivo testar os efeitos da interação entre meios diluidores com diferentes concentrações de lecitina de soja e diferentes taxas de congelação sobre a cinética espermática no sêmen congelado de carneiros. Os ejaculados coletados de 12 carneiros foram diluídos em meios diluidores com adição de 20% de gema de ovo (GO-20) ou com adição de 0,5%, 1,0% e 2,0% de lecitina de soja (LS) em substituição à GO no diluidor à base de Glicina-Leite. Estas amostras de sêmen diluído foram submetidas à refrigeração e posteriormente a três taxas de congelação: -60, -20 e -10 °C/min. Apenas as amostras da taxa lenta (-10 °C/min) foram descongeladas (40°C/20 seg.) e submetidas à análise computadorizada da cinética espermática. Estes resultados parciais demonstraram que o GO-20 e LS-2,0% não diferiram entre si ($P>0,05$), obtendo maiores ($P<0,05$) e consequentemente melhores médias da maioria dos parâmetros de cinética espermática. Conclui-se que a adição de lecitina de soja a 2% é capaz de substituir a gema de ovo na composição do meio diluidor para congelação de sêmen de carneiros quando submetido a taxa de congelação lenta (-10 °C/min).

Termos para indexação: ovinos, criopreservação, cinética espermática, lecitina de soja.

Introdução

A membrana dos espermatozoides dos carneiros tem uma relação colesterol:fosfolípídio menor, com uma proporção relativamente maior de ácidos graxos polinsaturados (PUFA) comparada a outras espécies, tornando essas células mais sensíveis ao choque de frio e a peroxidação lipídica (Peris et al., 2007). Esta relação colesterol:fosfolípídio é importante, pois permite e determina a capacidade de manter a integridade da membrana plasmática estável, possibilitando que haja um intercâmbio iônico adequado e o funcionamento normal da atividade enzimática que será necessária nos processos de capacitação (Iamsaard et al., 2011), fertilização (Dey et al., 2019) e no desenvolvimento inicial do embrião (Simon et al., 2014). Ao sofrerem alterações devido à congelação, os fosfolípidios, proteínas e enzimas são alterados nas suas estruturas e posicionamento na membrana plasmática (Hinkovska-Galcheva et al., 1989), diminuindo suas quantidades e funções, a exemplo da atividade enzimática (Marti et al., 2008), e consequentemente afetando a sobrevivência e capacidade de fertilização dos espermatozoides após a descongelação.

Uma das estratégias consideradas para a melhoria da qualidade do sêmen congelado de ovinos é variar a taxa de congelação na etapa de criopreservação do sêmen e adequá-la às condições específicas de cada protocolo, levando em consideração que a congelação deve ser lenta o suficiente para permitir que a água saia da célula por osmose, para evitar a formação de gelo intracelular, e deve ser rápida o suficiente para minimizar os danos causados pela exposição a altas concentrações de solutos (Watson, 2000).

Uma segunda estratégia tem sido testar diferentes diluidores. A gema de ovo (GO) é utilizada frequentemente como componente do diluidor fornecendo proteção aos espermatozoides, reduzindo o estresse provocado pelo choque térmico nas etapas de congelação (Moussa et al., 2002). Porém, por ser de origem animal, seu uso é limitado, visto que pode ser fonte potencial de doenças e de bactérias que podem gerar substâncias, a exemplo das endotoxinas (Bousseau et al., 1998) que provocam alterações funcionais reduzindo a respiração e a motilidade, assim como o incremento da apoptose dos espermatozoides (Peruma, 2018).

Em substituição à GO, podem ser utilizadas substâncias de origem vegetal como a lecitina de soja, já que possuem lipoproteínas e fosfolípidios como a fosfatidilcolina rica em ácido linoleico (ômega 6) que mostrou ser efetiva na proteção da membrana plasmática dos espermatozoides de carneiros

(Forouzanfar et al., 2010). Entretanto, não existe muito conhecimento de como a função e os efeitos da lecitina de soja adicionada aos diluidores de sêmen de carneiros podem ser alterados com as mudanças de temperatura nas etapas de criopreservação.

O presente trabalho teve como objetivo testar os efeitos da interação entre meios diluidores suplementados com diferentes concentrações de lecitina de soja e diferentes taxas de congelamento sobre as características cinéticas dos espermatozoides no processo de criopreservação do sêmen de carneiros.

Material e métodos

Foram utilizados 12 carneiros da raça Santa Inês, com idade entre 10 e 58 meses, previamente selecionados a partir de critérios para exame andrológico, segundo normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA - Henry et al., 2013). Os carneiros foram submetidos à colheita de sêmen por vagina artificial, sendo formados quatro pools de sêmen a partir da mistura de três ejaculados de três carneiros cada. A concentração espermática de cada pool foi mensurada adicionando-se uma alíquota de sêmen (10 μ L) à água destilada na proporção de (1:400), para em seguida realizar-se a contagem dos espermatozoides em câmara de Neubauer, em microscópio ótico com aumento de 400x. Os quatro pools foram fracionados e diluídos para uma concentração espermática de 600×10^6 espermatozoides/mL em meios diluidores padrões à base de Glicina-Leite com gema de ovo (GO) e com a adição de doses crescentes de lecitina de soja (LS), formando 4 tratamentos referentes ao Fator 1: diluidor controle com adição de 20% de GO (GO-20); e diluidores com adição de 0,5% (LS-0,5), 1,0% (LS-1,0) e 2,0% (LS-2,0) de LS, que corresponderam às quantidades de 0,54 g; 1,08 g e 2,16 g (W/V) para corrigir a concentração de 90% (Lecitina, 90%, Alfa Aesar, Índia).

As amostras de sêmen diluídas foram envasadas em palhetas francesas (0,25 mL), refrigeradas (5°C) por 1,5 h e submetidas a três diferentes taxas de congelamento (Fator 2: -60, -20 e -10 °C/min) configuradas a partir do posicionamento das palhetas por 11 minutos a três diferentes alturas (1,5; 4,5 e 7,5 cm respectivamente), acima da superfície do nitrogênio líquido (N²L) disposto em cubas de aço inox até sua total imersão e armazenamento em botijões criobiológicos.

As amostras de sêmen congeladas foram submetidas à análise computadorizada da cinética espermática (CASA), após descongelamento em banho-maria a 40°C por 20 segundos. Alíquotas de 5 μ L de sêmen descongelado foram diluídas em 150 μ L de uma solução avaliadora à base de X-Cell pré-aquecida a 37°C por 5 minutos. Em seguida, alíquotas de 2 μ L desta mistura foram pipetadas na câmara de Makler® (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel) pré-aquecida (37°C) para a captura e análise de imagens, por meio de uma câmera de vídeo conectada a um microscópio com contraste de fase (Nikon® 50i, Japão), sob aumento de 100 vezes. As imagens capturadas foram analisadas pelo Sperm Class Analyzer (Microptics, Espanha) tendo como padrão o setup de fábrica para a espécie ovina.

Foram analisados os parâmetros cinéticos motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL), velocidade do percurso médio (VAP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), índice de oscilação (WOB) e espermatozoides com hiperatividade (HYPER).

Para as análises dos dados, foram utilizados o programa computacional SAS® (SAS Institute Inc. 2018) e o software R. Os dados destinados à estatística paramétrica foram previamente submetidos à verificação dos pressupostos de heterogeneidade de variância e normalidade pelos testes de Hartley ($H_c > H$) e Shapiro–Wilk ($P > 0.05$), respectivamente. Dados que não cumpriram os pressupostos foram transformados pelo arco seno da raiz quadrada. Aqueles dados que mesmo assim não cumpriram as suposições da estatística paramétrica foram analisados usando estatística não paramétrica, por meio de transformação de postos alinhados de cada variável pelo pacote ARTool, e posteriormente foram submetidos à análise de variância (ANAVA) para determinar a significância dos fatores pelo teste F. As diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas pelo teste de Tukey (HSD) a 95% de confiança.

Resultados e discussão

Diante da impossibilidade de concluir as análises por consequência da pandemia de Covid-19, estão apresentados aqui resultados parciais referentes às análises espermáticas feitas nas amostras de

sêmen diluído nos quatro diluidores (Fator 1) submetidas a apenas uma taxa de congelamento (Fator 2) com velocidade de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Observando-se a tabela 1, pode-se verificar que os diluidores à base de lecitina de soja a 2% e à base de gema de ovo (controle) não diferiram entre si ($P>0,05$) e apresentaram as maiores médias ($P<0,05$) da maioria dos parâmetros cinéticos (MT, MP, VCL, VAP, VSL, STR, LIN, WOB e BCF). Em contrapartida, as menores médias ($P<0,05$) destes mesmos parâmetros foram observadas nos diluidores à base de lecitina de soja a 0,5% e 1,0% que também não apresentaram diferenças entre si ($P>0,05$). Os diluidores não diferiram quanto aos parâmetros ALH e HYPER ($P>0,05$).

Tabela 1. Características cinéticas dos espermatozoides (Média \pm erro padrão) após a descongelamento do sêmen de carneiros Santa Inês previamente submetido à diluição em diferentes meios diluidores e à criopreservação com uma taxa de congelamento lenta ($-10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$).

Parâmetros Espermáticos	Meios Diluidores			
	LS - 0,5	LS - 1,0	LS - 2,0	GO - 20
MP (%)	10,18 \pm 2,90 ^b	13,58 \pm 1,79 ^b	24,44 \pm 4,33 ^a	25,28 \pm 2,43 ^a
MT (%)	1,49 \pm 0,70 ^b	1,20 \pm 0,33 ^b	10,46 \pm 2,07 ^a	12,47 \pm 0,65 ^a
VCL ($\mu\text{m}/\text{s}$)	140,11 \pm 40,95 ^b	89,27 \pm 14,40 ^b	191,02 \pm 1,49 ^a	187,51 \pm 3,32 ^a
VAP ($\mu\text{m}/\text{s}$)	73,49 \pm 36,66 ^b	42,73 \pm 5,81 ^b	134,10 \pm 3,16 ^a	142,82 \pm 5,51 ^a
VSL ($\mu\text{m}/\text{s}$)	66,33 \pm 33,07 ^b	28,33 \pm 7,18 ^b	128,17 \pm 4,29 ^a	135,32 \pm 6,06 ^a
STR (%)	59,42 \pm 29,66 ^b	34,86 \pm 9,48 ^b	95,32 \pm 0,90 ^a	94,30 \pm 0,81 ^a
LIN (%)	34,81 \pm 17,31 ^b	34,43 \pm 10,57 ^b	69,15 \pm 1,26 ^a	72,78 \pm 2,33 ^a
WOB (%)	17,54 \pm 17,41 ^b	24,05 \pm 1,57 ^b	71,02 \pm 2,03 ^a	77,02 \pm 3,76 ^a
BCF (Hz)	10,32 \pm 10,19 ^b	9,49 \pm 3,40 ^b	31,82 \pm 0,34 ^a	29,93 \pm 1,40 ^a
ALH ($\mu\text{m}/\text{s}$)	1,66 \pm 1,41 ^a	2,20 \pm 0,50 ^a	2,75 \pm 0,04 ^a	2,64 \pm 0,09 ^a
HYPER (%)	0,54 \pm 0,27 ^a	0,41 \pm 0,11 ^a	0,42 \pm 0,25 ^a	0,94 \pm 0,37 ^a

MT = motilidade total; MP = motilidade progressiva; VCL = velocidade curvilínea; VAP = velocidade do percurso médio; VSL = velocidade em linha reta; STR = retilinearidade; LIN = linearidade; WOB = índice de oscilação ou wobble; BCF = frequência de batimento flagelar cruzado; ALH = amplitude do deslocamento lateral da cabeça; Hyper = espermatozoides com hiperatividade. Valores seguidos de letras diferentes na horizontal diferem significativamente ($P < 0,05$).

Um estudo realizado por Forouzanfar et al. (2010) em carneiros da raça Bakhtiari apresentou melhores valores de motilidade total dos espermatozoides no sêmen descongelado, quando diluído em diluidores à base de lecitina de soja a 1%, em comparação com a 2%. Por outro lado, Emamverdi et al. (2013), em estudos com carneiros da raça Zandi, obtiveram maiores valores de motilidade total dos espermatozoides descongelados, quando o sêmen antes de ser criopreservado foi diluído em diluidor à base de lecitina a 1,5%, em comparação com a 1 e 2%. As divergências entre nossos resultados e dos autores citados podem ter sido em consequência das diferenças entre as concentrações espermáticas, assim como das taxas de congelamento utilizadas, não sendo descartado também o fator genético representado pelas diferentes raças utilizadas. O comportamento destes diluidores à base de lecitina de soja poderá ser diferente em outras taxas de congelamento e considerando outras características espermáticas, o que poderá ser testado até a continuidade e conclusão deste estudo.

Conclusões

A lecitina de soja a 2% é capaz de substituir a gema de ovo a 20% na composição do diluidor para congelamento de sêmen de carneiros da raça Santa Inês submetido à taxa de congelamento lenta ($-10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$), por apresentar valores de cinética espermática semelhantes.

Agradecimento

À Embrapa, pelo apoio financeiro e de infraestrutura, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e à Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC/SE), pelas bolsas de estudo.

Referências

- BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J. P.; MARQUAN-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, n. 5, p. 699–706, jun. 1998.
- DEY, S.; BROTHAG, C.; VIJAYARAGHAVAN, S. Signaling enzymes required for sperm maturation and fertilization in mammals. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 7, n. 341, p. 1-5, dez. 2019.
- EMAMVERDI, M.; ZHANDI, M.; ZARE SHAHNEH, A.; SHARAFI, M.; AKBARI-SHARIF, A. Optimization of ram semen cryopreservation using a chemically defined soybean lecithin-based extender. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 48, n. 6, p. 899–904, dez. 2013.
- FOROUZANFAR, M.; SHARAFI, M.; HOSSEINI, SM.; OSTADHOSSEINI, S.; HAJIAN, M.; HOSSEINI, L.; ABEDI, P.; NILI, N.; RAHMANI, HR.; NASR- ESFAHANI, MH. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. **Theriogenology**, v. 73, n. 4, p. 480–487, out. 2010.
- HENRY, M.; NEVES, J. P.; JOBIM, M. I. M. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Ed.3. Belo Horizonte: CBRA, 2013.
- HINKOVSKA-GALCHEVA, V.; PETKOVA, D.; KOUMANOV, K. Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. **Cryobiology**, v. 26, n. 1, p. 70–75, 1989.
- IAMSAARD, S.; VANICHVIRIYAKIT, R.; HOMMALAI, G.; SAEWU, A.; SRAKAEW, N.; WITHYACHUMNARNKUL, B.; BASAK, A.; TANPHAICHITR, N. Enzymatic activity of sperm proprotein convertase is important for mammalian fertilization. **Journal of Cellular Physiology**, v. 226, n. 11, p. 2817–2826, jan. 2011.
- MARTI, E.; MARTI, JI.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, JA. Effect of the Cryopreservation Process on the Activity and Immunolocalization of Antioxidant Enzymes in Ram Spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 29, n. 4, p. 459–467, jul./ago. 2008.
- MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 57, n. 6, p. 1695–1706, out. 2002.
- 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, dez. 2007.
- PERUMA, P. Low density lipoprotein in cryopreservation of semen. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 7, n. 3, p. 103, mai. 2018.
- SIMON, L.; MURPHY, K.; SHAMSI, MB.; LIU, L.; EMERY, B.; ASTON, K. I. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. **Human Reproduction**, v. 29, n. 11, p. 2402–2412, set. 2014.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 481–492, jul. 2000.