

AVALIAÇÃO SEMINAL DE OVINOS SOBRE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MELATONINA DILUÍDA EM TRIS GEMA-OVO

VIVIANE PENTEADO ¹

Viviane Flores Penteado ²

Paola Tristão da Cunha ³

Joana Burch de Faria ⁴

Gabriel Ristow Vodzik ⁵

Sílvia Helena Pacheco Terra Ulguim ⁶

Adriana Pires Neves ⁷

Cristiano Feltrin ⁸

Resumo:

A inseminação artificial com uso do sêmen criopreservado é uma ferramenta valiosa em programas de melhoramento genético e conservação de raças ovinas. Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da adição da melatonina manipulada em diferentes concentrações, no sêmen de carneiros da raça Texel diluído em TRIS- Gema de Ovo, analisando após a criopreservação, se houve mudança nas características qualitativas do sêmen. Foram coletados dois eja-culados de quatro carneiros com idade de 8 meses a 2 anos, por meio de va-gina artificial adaptada para ovinos. Posteriormente, os ejaculados coletados foram divididos em três alíquotas iguais e diluídas uma em Tris-Gema de Ovo, e as demais em solução TRIS-Gema de Ovo adicionado de melatonina manipulada 2mMol e 4 mMol, para a concentração final de 100x10⁶ spz/mL, após mantidos em banho maria a 34°C. Então, as amostras foram resfriadas em câmara fria a 5°C por uma hora, envasadas em palhetas de 0,25 mL e lacradas com álcool polivinílico. Logo após, foram acondicionadas sob vapores do nitrogênio líquido, por 10 minutos, a 8cm da lâmina líquida e após congela-das com nitrogênio líquido -196°C. Após 40 dias de criopreservação as amostras foram analisadas no programa de software CASA quanto à motilidade espermática e integridade da membrana pelo teste hiposmótico, após o descongelamento. As amostras controle e dos tratamentos 1 e 2 obtiveram uma grande variabilidade entre valores explanados no presente trabalho. Não podendo assim ter uma veracidade nos valores obtidos, pois o N era muito pequeno e a variação dentre as amostras muito grande.

Palavras-chave: Carneiro, Reprodução, Congelação.

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

AVALIAÇÃO SEMINAL DE OVINOS SOBRE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MELATONINA DILUÍDA EM TRIS GEMA-OVO

¹ Aluno de graduação. vivianepenteado@gmail.com. Autor principal

² Aluno de graduação. vivianepenteado@gmail.com. Apresentador

³ Outro. paolatristaodacunha@yahoo.com.br. Co-autor

⁴ Aluno de graduação. jbfaria86@gmail.com. Co-autor

⁵ Aluno de graduação. vdz.gabriel@gmail.com. Co-autor

⁶ Aluno de graduação. ulg.farul@gmail.com. Co-autor

⁷ Docente. adriananeves@unipampa.edu.br. Orientador



AVALIAÇÃO DE SÊMEN OVINO TEXEL (*ovis aries*) CRIOPRESERVADO EM TRIS GEMA DE OVO (*Tris-hidróximetil-aminometano*) SOBRE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MELATONINA MANIPULADA

1. INTRODUÇÃO

O sucesso da criopreservação de sêmen é parcial, uma vez que o processo de congelação/descongelação danifica cerca de 50% das células. Isso ocorre porque os espermatozoides ovinos apresentam alta sensibilidade ao estresse oxidativo em função das espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas durante o processo de criopreservação, devido à baixa quantidade de antioxidantes e à alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados na membrana plasmática (Bucak et al. 2007). Os ácidos graxos são essenciais para a manutenção funcional das células espermáticas (Henkel 2005), mas as altas taxas de EROs podem afetar as funções mitocondriais e, conseqüentemente a motilidade espermática (Du 2009).

A adição ao sêmen, de antioxidante, seja ele lipossolúvel ou hidrossolúvel, aumenta a tolerância espermática ao dano oxidativo, após descongelação. Além disso, os antioxidantes ainda possuem a capacidade de neutralizar os radicais livres que causam a peroxidação lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides (Baumber et al. 2000). Sabe-se que os espermatozoides e o plasma seminal possuem enzimas e antioxidantes responsáveis pela remoção de quelante dos radicais livres. No entanto, isto não é suficiente para a proteção celular (Smith et al. 1996).

A melatonina é um antioxidante terminal, não enzimático e não pró-oxidativo (Tan et al. 2002), que possui a capacidade de detoxificação de radicais livres em concentrações fisiológicas e farmacológicas, sendo utilizada para prevenir as EROs (Reiter et al. 2007). A eficiência da função antioxidante da melatonina pode ser devido a sua capacidade quelante de radicais livres, ao estímulo sobre enzimas antioxidantes, à função da glutathione, que reduz a perda de elétrons de cadeia de transporte mitocondrial, e, finalmente, à ação sinérgica a outros antioxidantes (Reiter et al. 2007).

A adição de antioxidantes no meio de congelação protege os espermatozoides contra os danos causados pelos radicais livres (Maia et al. 2009), mas há poucos estudos que relatam o uso de melatonina no sêmen ovino. Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de melatonina manipulada no sêmen de carneiros diluído em TRIS- Gema de ovo após criopreservação.

2. METODOLOGIA

Quatro animais foram selecionados através de exame andrológico, onde todos apresentaram características espermáticas acima dos padrões mínimos, conforme estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA 1998). Os animais foram submetidos a um manejo de semi-confinamento, recebendo água e sal mineral ad libitum, e alimentação à base de campo nativo, adicionado a 1,5 kg de farelo de milho e soja, duas vezes ao dia.

Foram utilizados quatro machos ovinos da raça Texel, com idade entre 8 a 2 anos, criados na Cabanha Feltrin localizada no município de Guaíba/RS, com localização geográfica a Latitude: 30° 06' 50" S Longitude: 51° 19' 30" W.

Foram coletados dois ejaculados de quatro carneiros com idade de 8 meses a 2 anos, por meio de vagina artificial adaptada para ovinos. Posteriormente, os ejaculados coletados foram divididos em três alíquotas iguais e diluídas uma em Tris-Gema de Ovo, e as demais em solução TRIS-Gema de Ovo adicionado de melatonina manipulada 2 mMol e 4 mMol, para a concentração final de 100×10^6 espermatozoides/mL, após mantidos em banho maria a 34°C. Então, as amostras foram resfriadas em câmara fria a 5°C por uma hora, envasadas em palhetas de 0,25 mL e lacradas com álcool polivinílico. Logo após, foram acondicionadas sob vapores do nitrogênio líquido, por 10 minutos, a 8 cm da lâmina líquida e após congeladas com nitrogênio líquido -196°C. Após 40 dias de criopreservação as amostras foram analisadas no programa de software CASA® quanto à motilidade espermática e integridade da membrana pelo teste hiposmótico, após o descongelamento.

Após o congelamento, foi descongelado uma amostra de cada controle, em banho-maria a 37°C durante 30 segundos e avaliado subjetivamente o vigor e a motilidade espermática, ainda no Laboratório de Reprodução Biotech, para que estas características estejam dentro dos padrões exigidos pelo CBRA para a espécie ovina. As amostras analisadas no laboratório Reprolab, realizando os mesmos procedimentos de descongelamento e o sêmen testado para, teste hiposmótico e analisado no Programa de Software CASA®.

Após o descongelamento das palhetas (controle, tratamento 1 e tratamento 2) por 30 segundos em banho maria a 37°C, o sêmen foi retirado da paleta e acondicionado em um eppendorf, deixado sobre a placa aquecida a 37°C e posteriormente divididos em 2 alíquotas de 10µl de sêmen, uma alíquota usada para fazer o Teste hiposmótico (host) a esta foi adicionada 1 ml de solução hiposmótica de 150mOsmol/l feita no laboratório (0,735g de citrato de sódio, 1,351g de frutose em 100ml de água, e colocada na estufa por 30 minutos e posteriormente analisada em microscópio ótico. E a outra alíquota usada para análise no software CASA®, foi usada 10µl de sêmen e adicionada 90µl de leite desnatado UHT (1:9) e analisado imediatamente.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

A queda de temperatura de 20°C até 5°C é o momento onde ocorre o maior impacto e ocorre um estresse inicial, devido à mudança de fase da membrana plasmática, e essa alteração de fase dificulta a permeabilidade dos crioprotetores no meio. Fator que pode ter contribuído para esta grande variabilidade de valores nas amostras. As amostras com os tratamentos 1 com 2mMol e tratamento 2 de 4mMol de melatonina manipulada, analisadas no CASA®, obtiveram grande variabilidade entre as amostras. O processo de congelação e descongelação do sêmen provoca alterações estruturais, bioquímicas e funcionais, resultando numa redução da motilidade, vitalidade e viabilidade, independentemente dos diluidores utilizados. Mesmo sendo uma avaliação objetiva, o sistema CASA® apresenta variação nos resultados entre 11 e 23%, o que pode ser atribuída a fatores como preparação da amostra incluindo técnica de fixação e técnica de coloração, bem como fatores como correta iluminação, foco, aumento, sistema de classificação, interpretação e experiência do profissional.

O teste hiposmótico avalia a habilidade da membrana do espermatozóide ao atravessar os diferentes gradientes de concentração ao qual ele é exposto. Caso o HOST seja negativo, a membrana é quimicamente inativa, e não tem função no processo de fertilização. A membrana é importante não apenas na motilidade do espermatozoide, mas também na reação acrossômica (entrada do espermatozoide no óvulo).

RESULTADO DO HIPOSMÓTICO

TESTE HIPOSMÓTICO	%	
CONTROLE	ENROLADOS	RETOS
AMOSTRA 1	30	70
AMOSTRA2	8	92
AMOSTRA 3	8	92
AMOSTRA 4	34	66
TRATAMENTO 1 (2 μ Mol)		
AMOSTRA 1	19	81
AMOSTRA 2	16	84
AMOSTRA 3	10	90
TRATAMENTO 2 (4 μ Mol)		
AMOSTRA 1	24	76
AMOSTRA 2	8	92

Fonte Autora, 2017.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível observar que as células espermáticas ovinas submetidas a procedimentos de criopreservação, considerando-se sua maior sensibilidade ao processamento, apresentam alterações funcionais.

Igualmente, observou-se que a adição de antioxidantes que sejam capazes de minimizar os danos às células espermáticas durante a refrigeração e congelamento é um procedimento complexo, devido à variação nas características antioxidantes do ejaculado, entre reprodutores ou mesmo entre diferentes ejaculados de um mesmo carneiro, no qual a adição da melatonina manipulada ao meio diluente veio a mostrar significância, pois não há relato de publicações referente ao mesmo.

O projeto deveria ser executado novamente, com mais tempo e preparação do executor, com mais amostras para poder gerar um N maior, aumentando assim a acurácia do projeto.

5. REFERÊNCIAS

- BUCAK M.N., ATESSAHIN A., VARISLI O., YUCE A., TEKIN N., AKÇAY A. (2007). The influence of trealose, taurine cysteamine and hyaluronidase on ram semen parameters after freeze-thawing process. Theriogenology, 67: 1060-1067.
- DU PLESSIS, S. S., HAGENAAR, K., & LAMPIAO, F. (2010). The in vitro effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS. Andrologia, 42(2), 112-116.

MAIA M.S. Manual de inseminação artificial em caprinos e ovinos. Natal: SEBRAE/RN, EMPARN, 1997. 52p.

Tecnologia do sêmen e inseminação artificial em caprinos e ovinos. MARCIANE DA SILVA MAIA; REVISADO POR MARIA DE FÁTIMA PINTO BARRETO. Natal: EMPARN, 2010.

REITER R.J., TAN D.X., OSUNA C. & GITTO E. 2000. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress - A review. J. Biomed. Sci. 7(6):444-458.

REITER R.J., TAN D.X. & TERRON M.P. 2007. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. Acta Biochim. Pol. 54(1):1-9.

TAN, D. X., REITER, R. J., MANCHESTER, L. C., YAN, M. T., EL-SAWI, M., SAINZ, R. M., ET AL. (2002). Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad-spectrum antioxidant and free radical scavenger. Curr Top Med Chem, 2(2), 181-197.

SMITH, J. F.; MURRAY, G. R. Evaluation of different techniques for determination of membrane saturation in spermatozoa. Staining techniques in spermatozoa. Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod., v.57, p.246-250, 1996.