

UTILIZAÇÃO DE SONDAS FLORESCENTES PARA AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA ESPERMÁTICA DO SÊMEN DE CARNEIROS DAS RAÇAS DORPER, SANTA INÊS E MORADA NOVA

Dâmaris Amaral do Nascimento (Bolsista PIBIC/CNPq), Marlon de Araújo Castelo Branco (Colaborador, UFPI), José Adalmir Torres de Souza (Orientador, DCCV/CCA-UFPI).

Introdução

O espermatozóide é uma composição de diferentes estruturas que são necessárias para seu perfeito funcionamento. Sabe-se que a célula espermática pode ser móvel, mas apresentar lesões em diferentes compartimentos estruturais, como membranas do acrossoma, plasmática e mitocondrial (SILVA et al., 2009b). Para a avaliação da integridade destas membranas, diferentes métodos foram desenvolvidos visando determinar suas funções ou preservação estrutural.

Segundo Rodriguez-Martinez et al. (1997), o desenvolvimento de técnicas de coloração celular utilizando a fluorescência como sondas para DNA, enzimas intracitoplasmáticas, lectinas ou potencial de membrana tem sido apontado como nova ferramenta para a avaliação da funcionalidade do espermatozóide, após a prática de congelação-descongelação. Celeghini et al. (2007) relatam que as sondas fluorescentes ou fluoróforos monitoram a funcionalidade e/ou a integridade das estruturas espermáticas, as quais possuem a capacidade de ligar-se a pontos específicos das células, permitindo diagnóstico prático e direto. Assim, técnicas de fluorescência têm sido utilizadas com sucesso em diferentes espécies e em diferentes estruturas da célula espermática, podendo também ser utilizadas de forma isolada ou em associações nas espécies bovina (GARNER et al., 1997), equina (GRAVANCE et al., 2000), caprina (BATISTA et al., 2009) e ovina (SILVA et al., 2009b).

Diante do exposto este trabalho visa avaliar a estrutura espermática, por meio de sondas fluorescentes, de carneiros das raças Dorper, Santa Inês e Morada Nova.

Metodologia

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Foram utilizados 18 animais ovinos, sendo 6 da raça Morada Nova, 6 Santa Inês e 6 Dorper, com idade média de 24 meses, submetidos a regime semi-intensivo, com pastejo em capim Tifiton 85 (*Cynodon dactylon*). O sêmen foi obtido por meio de vagina artificial e avaliado quanto aos aspectos macroscópicos (volume e aspecto) e microscópicos (turbilhonamento, motilidade e vigor), sendo retirada uma alíquota de 10ul e diluída em 2 mL de formol salina para posterior avaliação morfologia e concentração espermática. O sêmen foi diluído em Tris-Gema, envasado em palhetas de 0,25 mL, congelado em máquina automatizada (TK3000) e armazenadas em botijão criogênico (-196 °C). Após descongelação (37°C / 30 segundos) as amostras foram avaliadas quanto à motilidade e vigor, e, uma vez consideradas viáveis, foram avaliadas a integridade do acrossoma (sonda fluorescentes FITC-PNA), membrana plasmática (associação de Diacetato de Carboxifluoresceína e Iodeto de Propídio) e função mitocondrial (sonda JC-1), todas através de sondas sob microscopia de epifluorescência.

Resultados e Discussão

Os resultados observados referentes aos aspectos físicos do sêmen fresco estão dispostos na tabela 1. A raça Morada Nova apresentou volume superior as demais raças, sendo estatisticamente diferente somente da raça Dorper, este volume superior as demais raças pode ser explicado pelo fato do sêmen ter sido coletado pelo método de eletroejaculador, proporcionando um maior volume seminal em decorrência da estimulação mecânica das glândulas anexas.

Tabela 1. Médias e desvios-padrão para volume, turbilhonamento, motilidade e vigor do sêmen fresco de ovinos Dorper, Santa Inês e Morada Nova dos 8 aos 18 meses de idade.

Raças	Volume(mL)	Turbilhonamento(0-5)	Motilidade0-110(%)	Vigor(0-5)
Dorper	1,15±0,4 ^b	3,01±0,1 ^a	77,65±4,1 ^a	3,25±0,1 ^a
Santa Inês	1,39±0,1 ^{ba}	3,32±0,4 ^a	82,57±3,3 ^a	3,46±0,4 ^a
Morada Nova	1,47±0,3 ^a	2,85±0,1 ^a	73,00±2,9 ^a	3,17±0,1 ^a

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Como pode ser verificado na tabela 1, o volume espermático obtido para as três raças estudadas, está dentro dos padrões indicados por GONÇALVES *et al* (2001), que é de 0,5 a 2mL por ejaculado. Já em relação ao turbilhonamento os valores apresentados foram inferiores aos 3,6 verificados por SOUZA *et al*. (2003), em carneiros da raça Santa Inês, com 32 semanas de idade.

A motilidade individual progressiva na raça Morada nova (73,00%) foi inferior às apresentadas pelas raças Santa Inês (82,57%) e Dorper (77,65%), estas últimas concordantes com os índices de 70 e 80% obtidos por GONZALES *et al*,(2002), para reprodutores ovinos das mesmas raças.

Na tabela 2 é possível observar os valores médios para os parâmetros estruturais de espermatozoides ovinos das raças Dorper, Santa Inês e Morada Nova, ao fazer a comparação entre as médias é possível observar que não existe diferença estatística entre as raças para integridade da membrana plasmática, porém ao se comparar as médias para integridade das mitocôndrias e acrossoma observa-se diferença estatística entre as raças, sendo a raça Dorper com melhor integridade de mitocôndrias (40,38±10,9%) em comparação as raças Santa Inês (39,19±8,5%) e Morada Nova (38,78±7,0%), o mesmo não foi observado para integridade do acrossoma, sendo a raça Dorper a apresentar menor valor (18,40±7,8%) em comparação as raças Santa Inês (24,20±5,6%) e Morada Nova (24,80±6,4%).

Tabela 2. Médias e desvios-padrão para integridade da membrana plasmática, integridade mitocondrial e integridade do acrossoma pós-descongelamento de espermatozoides ovinos das raças Dorper, Santa Inês e Morada Nova dos 8 aos 18 meses de idade.

Parâmetros	Raças		
	Dorper	Santa Inês	Morada nova
Membrana Plasmática (%)	44,34±8,3 ^a	42,65±6,9 ^a	44,28±8,7 ^a
Mitocôndrias (%)	40,38±10,9 ^a	39,19±8,5 ^{ab}	38,78±7,0 ^b
Acrossoma (%)	18,40±7,8 ^a	24,20±5,6 ^b	24,80±6,4 ^b

*Médias seguidas de mesma letra nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

A redução da temperatura durante o processo de congelamento do sêmen afeta a bomba de Na⁺/K⁺, provocando despolarizações parciais das membranas, tornando-as permeáveis ao cálcio. Isto induz a uma vesiculação prematura da membrana acrossomal (Bicudo *et al.*, 2007). Esta afirmação foi confirmada por Azevedo (2006) quando ao avaliar o sêmen ovino em todas as fases do

processamento, concluiu que a congelação/descongelação causa mais danos do que a refrigeração e, constatou ainda haver diferenças entre indivíduos relacionadas à crioresistência e criocapacitação espermática.

Apoio: Universidade Federal do Piauí - UFPI

Referências

AZEVEDO, H.C. **Integridade e funcionalidade dos espermatozoides ovinos submetidos à criopreservação após a incorporação de colesterol, desmosterol, ácido oleico-linoleico e alfalactoalbumina.** 2006. 218f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C.; MAIA S.M. et al. Avanços na criopreservação do sêmen ovino visando sua aplicação em programas de inseminação artificial e em biotecnologias com embriões. **Acta Science Veterinary**, v.35, supl., p.787-798, 2007.

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e estrutura de cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; JOERG, H. W.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biol. Reprod.** v. 57, p. 1401-1406, 1997.

GONÇALVES, Paulo B. Dias; FIGUEIREDO, José Ricardo; FREITAS, Vicente José de F. **Biotécnica aplicada à reprodução animal.** São Paulo: Varela, 2001, p. 15-23; 57-65; 111-23, cap. 2, 4 e 7.

GONZALES, Iara M.; SOARES, Adriana T.; GOMES, Maria das Graças G.; SOUSA, Wandrick H. de. **Reprodução assistida em caprinos.** Paraíba, Set. 2002., p. 11-42.

GRAVANCE, C. G.; GARNER, D.L. ET AL. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v.53, n.9, 2000.

SOUSA, C.E.A. Estudos sobre o desenvolvimento sexual de carneiros Santa Inês durante o primeiro ano de vida: morfologia testicular, produção espermática, secreção de testosterona, proteínas seminais e aspectos quantitativos da espermatogênese. **Ver. Cient. Prod. Anim.**, v.5, n.1, 2003.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ZHANG, B.R.; LARSSON, B. Bovine semen quality and the ability to produce embryos in vivo and in vitro. **Arq Fac Vet UFRGS**, v.25, supl, p.108-126, 1997.

SILVA, S.V.; BATISTA, A.M.; COLETO, Z.F.; GUERRA, M.M.P. **Diferentes métodos e técnicas na avaliação espermática: um breve revisão.** Ciênc. Vet. Tróp., Recife, v.12, p.1-15, 2009.

SOUSA, C.E.A. Estudos sobre o desenvolvimento sexual de carneiros Santa Inês durante o primeiro ano de vida: morfologia testicular, produção espermática, secreção de testosterona, proteínas seminais e aspectos quantitativos da espermatogênese. **Ver. Cient. Prod. Anim.**, v.5, n.1, 2003.

Palavras-chave: Membranas. Espermatozoides. Sondas.