

## EFEITO DA CONCENTRAÇÃO E TEMPERATURA DE ADIÇÃO DE TREALOSE EM DILUENTES PARA A CONGELAÇÃO DE SÊMEN OVINO EM PALHETAS<sup>1</sup>

### EFFECT OF THE CONCENTRATION AND ADDITION TEMPERATURE OF TREHALOSE IN EXTENDERS ON FREEZING RAM SEMEN IN STRAWS

Adilson Moura<sup>2</sup>    João Carlos Deschamps<sup>3</sup>    José Carlos Ferrugem Moraes<sup>4</sup>

#### RESUMO

A trealose é um dissacarídeo com potencial emprego como crioprotetor quando adicionada aos meios para congelamento de sêmen ovino. Este experimento foi realizado para verificar os efeitos da temperatura de adição (30°C e 4°C) e da concentração de trealose (2%, 4% e 6%) sobre o sêmen ovino congelado em palhetas, utilizando como base as formulações INRA e TRIS/FRUTOSE. Os efeitos estudados em ambos experimentos foram medidos através da avaliação da motilidade espermática (MOT) e da integridade de acrossomas (INTA) em diferentes momentos após o descongelamento (0h, 2h e 5h). Os presentes resultados não recomendam a inclusão da trealose visando incrementar a qualidade *in vitro* do sêmen ovino congelado em palhetas nas concentrações e diluentes testados, porém, sugerem maiores estudos quanto a sua toxicidade e possíveis interações com outros constituintes dos diluentes já formulados para o congelamento de sêmen ovino.

**Palavras-chave:** congelamento de sêmen, diluentes, trealose, ovinos

#### SUMMARY

This study was aimed to evaluate the possible effects of the addition of trehalose to extenders developed for freezing ram semen in straws. The effects of addition temperature (30°C and 4°C) and concentration of trehalose (2, 4 and 6%) on INRA and TRIS/FRUTOSE diluents was evaluated. Their effects were studied through motility rate and by acrosome integrity at different incubation times after thawing (0, 2 and 5h). The results do not recommend the inclusion of trehalose in these diluents. However, it would be interesting to learn more about toxicity and interactions between the components of the extenders and trehalose in ram sperm frozen in straws.

<sup>1</sup>Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor, apresentada ao Curso de Pós-graduação em Sanidade Animal, Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

<sup>2</sup>Médico Veterinário, MSc, Merck Sharp & Dohme, Rua Cristóvão Colombo, 3870, apto. 304, 90560-005, Porto Alegre, RS.

<sup>3</sup>Médico Veterinário, PhD, Professor Adjunto, Centro de Biotecnologia, Faculdade de Veterinária, UFPel, 96100-900, Pelotas, RS. Autor para correspondência.

<sup>4</sup>Médico Veterinário, Doutor, Pesquisador, Centro de Pesquisa de Pecuária dos Campos Sulbrasilieiros, Embrapa, Caixa Postal 242, 96400-970, Bagé, RS.

**Key words:** frozen semen, semen extenders, trehalose, sheep

## INTRODUÇÃO

Nos últimos 50 anos houve a geração de um apreciável volume de conhecimento científico e desenvolvimento tecnológico sobre a congelação de sêmen ovino. Considerando aspectos relativos a embalagem, concentração, metodologia de uso e/ou via de inseminação e composição dos diluentes (EVANS & MAXWELL, 1987). A despeito do conhecimento acumulado há necessidade de maiores estudos nos aspectos mencionados anteriormente em função de taxas de prenhez obtidas pela inseminação com sêmen congelado via cervical não satisfatórias nem repetitivas e de que as taxas de prenhez pela inseminação intrauterina apresentam alta variabilidade (EVANS, 1991).

No que concerne a possibilidade de aprimorar os diluentes, a função e o metabolismo dos crioprotetores nos diluidores para congelação de sêmen ovino, ainda não estão adequadamente investigados (SANCHEZ-PARTIDA et al., 1992). A trealose é um dissacarídeo encontrado nas espécies animais e vegetais capazes de manterem íntegras suas membranas em condições extremas de temperatura, envolvendo a perda de água (CROWE et al., 1987). Estes mesmos pesquisadores apresentaram evidências que a trealose pode contribuir na estabilização das membranas durante o processo de congelamento (CROWE et al., 1990).

A trealose foi utilizada como crioprotetor adicional no processo de congelação de embriões de camundongos (HONADEL & KILLIAN, 1988), refrigeração e congelação de sêmen suíno (REVELL & GLOSSOP, 1989; BORDIGNON, 1993) e de sêmen ovino em peletes (OLIVEIRA & MORAES, 1991/1993).

O objetivo deste estudo é de investigar os efeitos da adição da trealose em diluidores desenvolvidos para a congelação de sêmen ovino em palhetas sobre a motilidade espermática e integridade acrossomática, após os procedimentos de congelação e descongelação.

## MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de sêmen foram obtidas com vagina artificial de três carneiros das raças Texel (2) e Corriedale (1). O sêmen até os procedimentos de diluição foi incubado a 30°C. Foram utilizadas amostras com motilidade progressiva superior a 70% na formação de "pools" para congelação, sempre contendo três ejaculados de pelo menos dois carneiros. A concentração espermática de cada "pool" foi estimada em câmara hematimétrica, sendo ajustada a uma concentração final de 100 milhões de espermatozoides por ml em todos os tratamentos.

Os diferentes "pools" sequencialmente foram diluídos e processados seguindo os protocolos descritos por COLAS (1975) e FISER et al. (1982), respectivamente, diluidores INRA e TRIS/FRUTOSE, sendo acondicionados em palhetas de 0,5ml.

A descongelação das palhetas foi em banho-maria a 37°C por 20 segundos. As avaliações procedidas foram: a motilidade espermática (MOT) em microscopia de contraste de fase logo após a descongelação, duas e cinco horas após; a integridade acrossomática (INTA) logo após a descongelação e após cinco horas de incubação a 37°C em microscopia de contraste de fase em amostras fixadas em formol salino tamponado (HANCOCK, 1957). Foram avaliadas três palhetas em cada tratamento e os valores de MOT e INTA em cada tempo de incubação após a descongelação submetidos a análise de variância (SNEDECOR & COCHRAN, 1967).

No delineamento experimental foram ajustados dois modelos estatísticos. No modelo 1 foram considerados além do tempo de incubação os efeitos principais da adição da trealose (g/100ml) em diferentes concentrações (0; 2; 4; 6%), a formulação original do diluente (INRA; TRIS/FRUTOSE), a repetição/bloco (1; 2; 3) em função do dia da congelação e as interações de primeira ordem significativas ( $P < 0,05$ ) sobre a motilidade espermática e a integridade dos acrossomas. No modelo 2 foram incluídos os efeitos do tempo de incubação (0; 2; 5h), da quantidade de trealose (2; 4; 6%), da temperatura de sua adição ao diluente (4°C; 30°C), da fórmula do diluente (INRA; TRIS/FRUTOSE), da repetição/bloco (1; 2; 3) e das interações de primeira ordem significativas sobre ambas as variáveis medidas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentados os quadrados médios e níveis de significância para os efeitos principais e interações, considerando o modelo 1. O alvo desta análise foi de verificar como se comportavam os dois diluidores testados com a adição de trealose. De um modo geral a adição de trealose não resultou em benefício para a motilidade espermática. Embora tenha sido verificada diferença ( $P < 0,05$ ), houve redução progressiva na motilidade a medida que aumentava a concentração de trealose. No que diz respeito a integridade acrossomática também não houve benefício com a adição de trealose nos dois diluentes. Os efeitos óbvios como o tempo de incubação e bloco foram significativos tanto para MOT quanto para INTA. Pode ser constatada diferença ( $P < 0,01$ ) para MOT entre os diluidores, facilmente explicável pelos seus constituintes, com uma superioridade em torno de 25% para o TRIS/FRUTOSE, que apresenta composição mais completa, incluindo tampões e diversos açúcares (FISER et al., 1982).

As respostas diferenciais na motilidade espermática entre diluidores podem ser visualizadas mais adequadamente através das interações "diluyente x adição/concentração" e "diluyente x tempo de incubação" (Figuras 1 e 2). Estes resultados indicam que efetivamente a composição dos diluentes é um tema muito complexo, requerendo inúmeros experimentos fatoriais para sua formulação e não a simples adição de uma nova substâncias com propriedades crioprotetoras.

Tabela 1. Resultados da análise de variância dos efeitos relativos a adição de trealose a diluentes de sêmen ovino sobre a motilidade espermática (MOT) e integridade acrossomática (INTA; Modelo 1).

Fonte de variação	MOT		INTA	
	QM	GL	QM	GL
Tempo de incubação	3345,06***	2	3219,05***	1
Adição/concent. trealose	137,67*	3	84,30ns	3
Diluyente	3075,20***	1	55,05ns	1
Bloco	1194,87***	2	257,61**	2
Diluyente x Adição conc. trealose	225,53**	3	-----	-
Diluyente x bloco	884,39***	2	-----	-
Diluyente x Tempo de incubação	300,39**	2	-----	-
Erro	46,44	110	51,72	76

ns P > 0,05; \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001

A despeito dos resultados negativos da adição da trealose nos diluentes testados, o objetivo do modelo 2 foi de verificar se a temperatura em que a trealose foi adicionada nas formulações com 2%, 4% e 6% afetaria a MOT e a INTA. Os resultados da análise da variância (Tabela 2) indicam que a temperatura de adição afeta significativamente a MOT, com uma superioridade em torno de 8% quando o dissacarídeo foi adicionado na temperatura de 30°C. O efeito diferencial sobre a MOT em função do diluyente é também importante apenas no diluidor INRA, também culminando com maior % de células móveis quando adicionada a 30°C. Um aspecto interessante é que tanto a MOT quanto a INTA são afetadas diferentemente pela temperatura de adição e concentração da trealose adicionada (Figura 3).

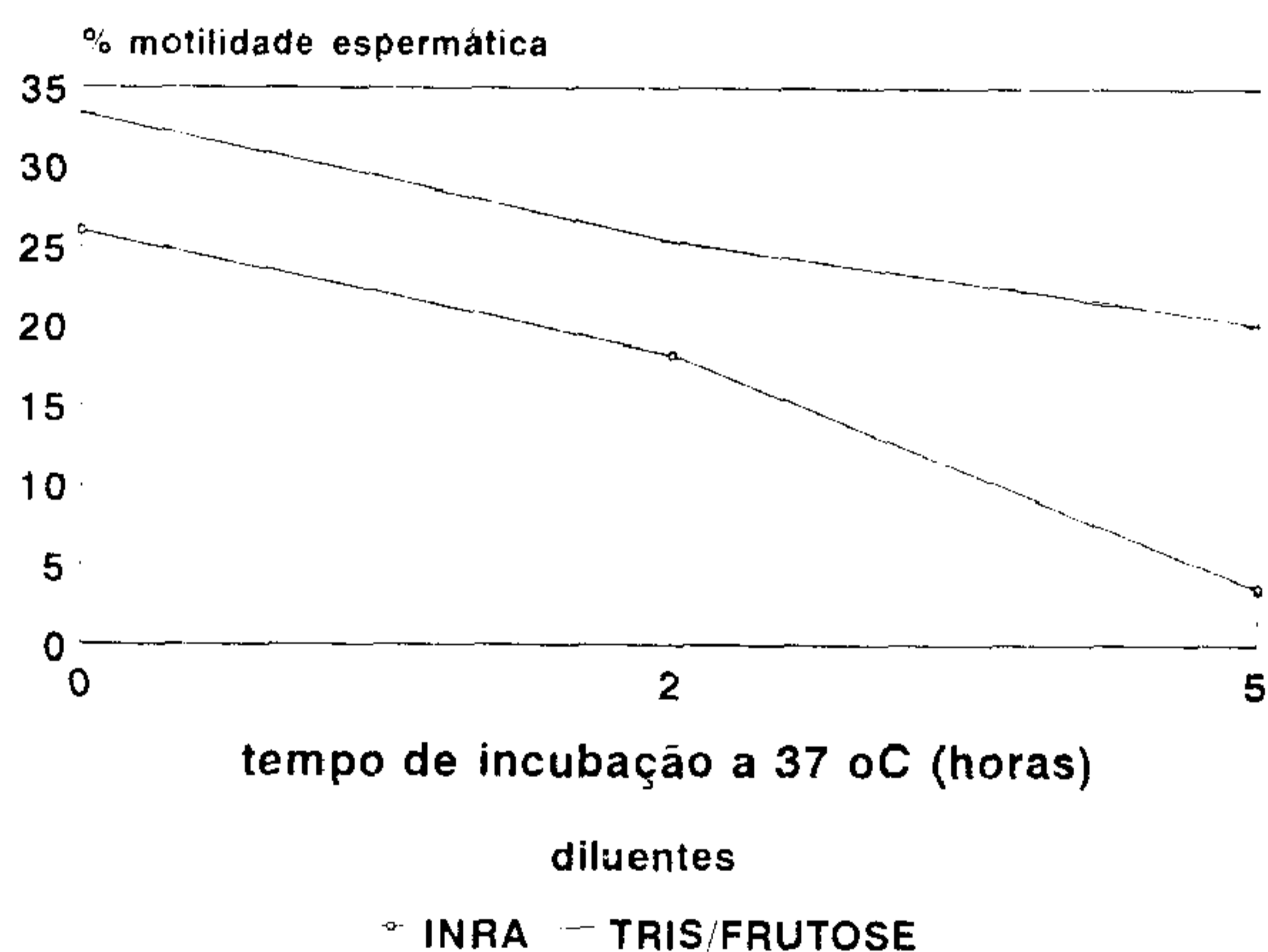


Figura 2. Motilidade espermática (médias ajustadas) para os dois diluentes em cada tempo de incubação após descongelação.

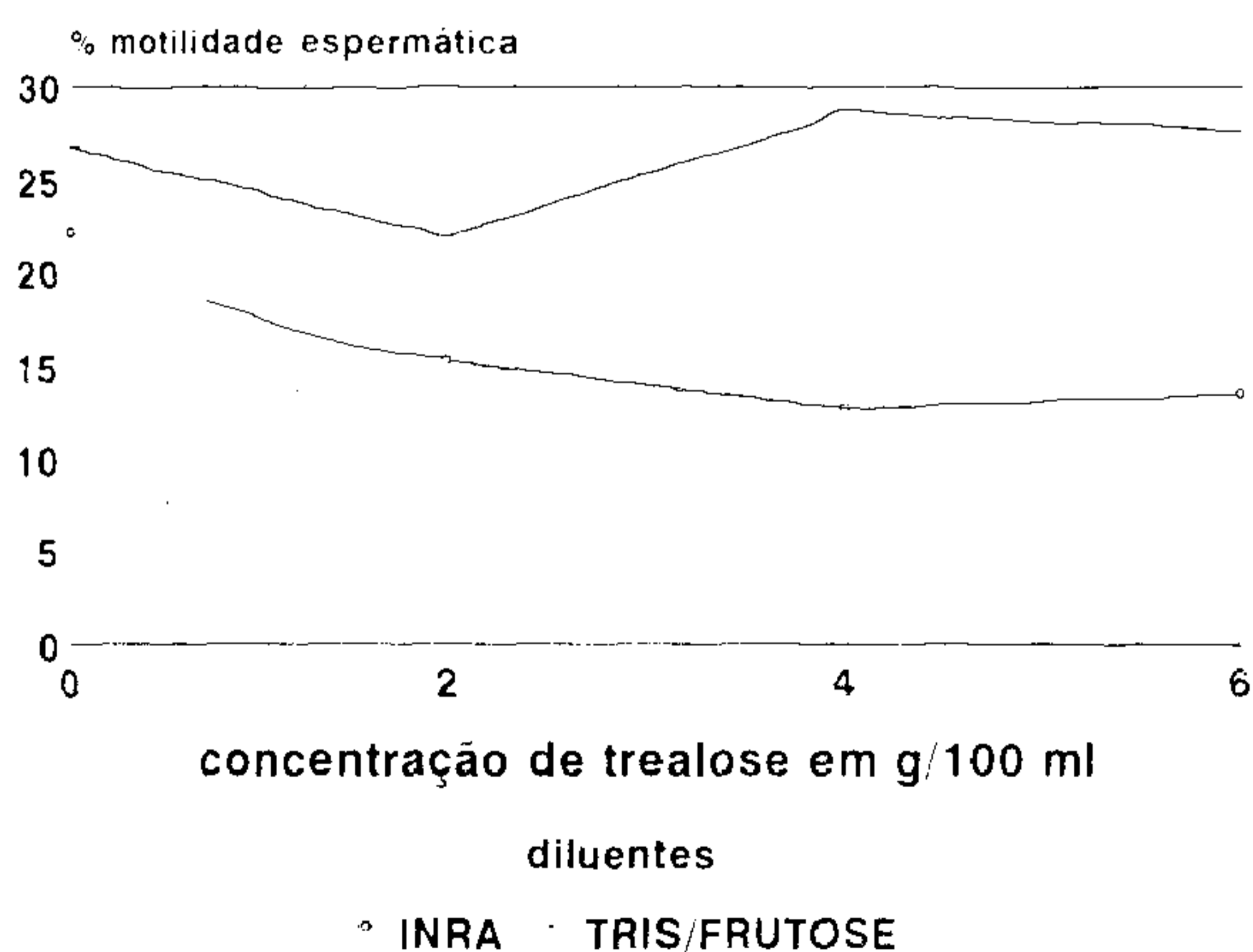


Figura 1. Motilidade espermática (médias ajustadas) para os dois diluentes em cada concentração de trealose testada.

Os padrões de variação observados sugerem que a trealose em concentrações crescentes a partir de 2g/100ml pode ser detrimental tanto à motilidade espermática quanto a integridade acrossomática, porém depende do diluyente a que foi adicionada. De um modo geral estes resultados são similares aos obtidos pela adição de trealose até 0,3% ao diluidor BTS desenvolvido para o congelamento de sêmen suíno em macrotubos (BORDIGNON, 1993), porém contrastam com os de OLIVEIRA & MORAES (1991; 1993), que evidenciaram incremento na MOT com uma concentração de 0,2% de trealose adicionada ao sêmen ovino congelado em peletes com o diluidor desenvolvido por SALAMON (1970).

Tabela 2. Resultados da análise de variância dos efeitos relativos a temperatura de adição de trealose a diluentes de sêmen ovino sobre a motilidade espermática (MOT) e integridade acrossomática (INTA; Modelo 2).

Fonte de variação	MOT		INTA	
	QM	GL	QM	GL
Tempo de incubação	2771,12***	2	2688,89***	1
Concentração trealose	49,01ns	2	61,43ns	2
Temperatura de adição	249,04*	1	2,72ns	1
Diluyente	4057,81***	1	16,06ns	1
Bloco	962,73***	2	163,72*	2
Diluyente x conc. trealose	233,84***	2	-----	-
Diluyente x bloco	1061,29***	2	-----	-
Diluyente x Tempo de Incub.	249,73***	2	-----	-
Diluyente x temp. de adição	213,93*	1	-----	-
Temperatura x conc. trealose	164,56*	2	315,26*	2
Temperatura x bloco	130,45*	2	-----	-
Bloco x tempo de incubação	70,44*	4	-----	-
Bloco x conc. trealose	140,79**	4	-----	-
Erro	27,28	80	44,42	62

ns P > 0,05; \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001.

Os presentes resultados não recomendam a inclusão da trealose visando incrementar a qualidade *in vitro* do sêmen ovino congelado em palhetas nas concentrações e diluentes testados, no entanto, sugerem maiores estudos quanto a um possível efeito tóxico da trealose e possíveis interações com outros constituintes dos diluentes já formulados para o congelamento de sêmen ovino.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORDIGNON, V. Efeito da trealose sobre a motilidade, acrossoma e fertilidade do sêmen congelado de suínos. Pelotas, 1993. 57 p., Tese (Mestrado em Sanidade) - Curso de Pós-graduação em Sanidade, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 1993.
- COLAS, G. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *J Reprod Fert*, Cambridge, v. 42, p. 277-285, 1975.
- CROWE, J.H., CROWE, L.M., CARPENTER, J.F., et al. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem J*, v. 242, p. 1-10, 1987.
- CROWE, J.H., CARPENTER, J.F., CROWE, L.M., et al. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology*, v. 27, p. 219-231, 1990.
- EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. *Salamon's artificial insemination of sheep and goat*. Sydney: Butterworths, 1987. 194 p.
- EVANS, G. Application of reproductive technology to the Australian livestock industries. *Reprod Fert Dev*, v. 3, p. 627-650, 1991.
- FISER, P.S., AINSWORTH, L., FAIRFULL, R.W. Cryosurvival of ram spermatozoa in hypertonic and isotonic diluents. *Can J Anim Sci*, v. 62, p. 425-428, 1982.
- HANCOCK, J.L. The morphology of boar spermatozoa. *J Microsc Soc*, v. 76, p. 84-97, 1957.
- HONADEL, T.E., KILLIAN, G.J. Cryopreservation of murine embryos with trehalose and glycerol. *Cryobiology*, v. 25, p. 331-337, 1988.
- OLIVEIRA, J.F.C., MORAES, J.C.F. Efeito da concentração de trealose num diluyente para o congelamento do sêmen ovino em pellets. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, Belo Horizonte. Anais..., Belo Horizonte, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1991, 470 p. p.439.

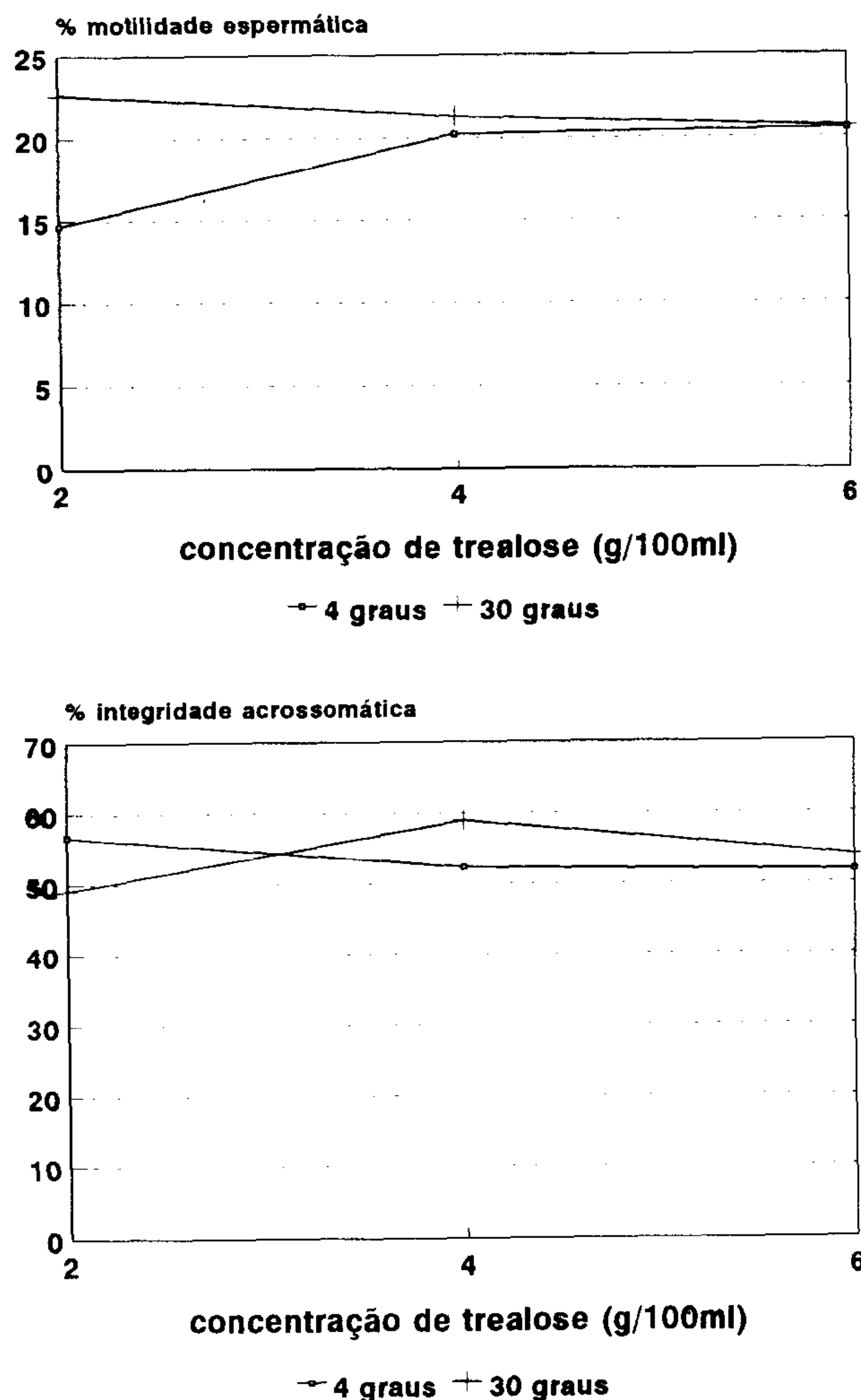


Figura 3. Motilidade espermática (médias ajustadas) para os dois diluentes em cada concentração de trealose testada.

OLIVEIRA, J.F.C., MORAES, J.C.F. Efeito da adição de trealose e sua interação com outros constituintes do diluente para congelamento de sêmen ovino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1993, Belo Horizonte, MG. Anais..., Belo Horizonte, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1993, 380 p. p. 273.

REVELL, S.G., GLOSSOP, C.E. A long life ambient temperature diluent for boar semen. *Anim Prod*, v. 48, p. 579-584, 1989.

SALAMON, S. The survival of ram spermatozoa following pellet freezing below  $-79^{\circ}\text{C}$ . *Aust J Biol Sci*, v. 23, p. 459-468, 1970.

SANCHEZ-PARTIDA, L.G., MAXWELL, W.M.C., PALEG, L.G., et al. Proline and glycine betaine are cryoprotective for ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*, v. 4, p. 113-118, 1992.

SNEDECOR, G.W., COCHRAN, W.G. *Statistical Methods*. 6. ed., Ames Iowa State Univ. Press, 1967, 593 p.