

# EFEITO DO ACONDICIONAMENTO A 5°C DE SÊMEN OVINO EM GELATINA

**GHELLER, Stela Mari Meneghelo<sup>1</sup> ; CORCINI, Carine Dahl<sup>1</sup>; VARELA JUNIOR, Antonio Sergio<sup>2</sup>; LUCIA, Thomaz Jr.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Reprodução Animal - Faculdade de Veterinária – UFPel

<sup>2</sup>Instituto de Ciências Biológicas – FURG

Campus Universitário s/n – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900

Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS. [stelameneghelo@yahoo.com.br](mailto:stelameneghelo@yahoo.com.br)

## Introdução

O uso do sêmen ovino resfriado pode ser uma alternativa na inseminação artificial cervical em ovinos (Yániz,2005) devido sua praticidade e por ser vantajoso economicamente. Porém é necessária a busca de um diluente que possa permitir que a qualidade seminal não seja alterada pela temperatura e tempo de estocagem.

Trabalhos realizados com sêmen de coelhos (Lopes-Gatius et al, 2005) e ovinos (Yániz et al., 2005) na busca de um diluente para conservação da célula espermática a 15°C e que melhorasse a qualidade seminal adicionaram gelatina ao diluente e verificaram que o mesmo reduziu o gasto de energia pelo espermatozóide, estendendo a viabilidade espermática por mais tempo, quando comparado com o diluente líquido. Permitindo aos espermatozoides se manterem em contato com os substratos energéticos e crioprotetor. O diluente com gelatina em temperaturas acima de 20° fica no estado líquido. É importante salientar que na formulação do diluente deve-se considerar componentes que permitam que a célula espermática mantenha sua viabilidade com o objetivo da fertilização.

Este trabalho objetivou analisar o efeito da adição de gelatina ao diluente para sêmen ovino acondicionado a 5°C na qualidade seminal.

## Metodologia

Foram utilizados 8 carneiros com fertilidade conhecida, realizando 4 coletas, totalizando 32 ejaculados. As coletas de sêmen foram feitas utilizando vagina artificial. Foram avaliados para integridade de membrana e DNA durante 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento a 5°C. Os diluentes utilizados foram diluente 1 (D1) era constituído de leite integral a 10%; 0,2g D-glucose; 50 mg estreptomicina em aproximadamente 100mL de água millique e o diluente 2 (D2) é a mesma constituição do D1 acrescido de 1,5% de gelatina.

Antes das análises todas as amostras acondicionadas foram aquecidas (5 min por 37°C). A integridade de membrana, foi avaliada através de microscopia de fluorescência com o uso das sondas iodeto de propídio e diacetato de carboxifluoresceína, conforme descrito por Harrison & Vickers (1990) ,onde as membranas danificadas tornam-se permeável ao corante iodeto de propidio. A avaliação foi realizada sob aumento de 400x, em microscópio de epifluorescência.

O grau de desnaturação do DNA foi avaliado pela exposição ao corante Acridine Orange, quando exposto ao corante, a dupla hélice do DNA espermático apresenta coloração verde sendo viável, enquanto o DNA da hélice simples, por estar danificado, apresenta coloração vermelha ( Galli et al.1998), amostras foram avaliadas sob aumento de 1000x, em microscópio de epifluorescência. Todas as análises estatísticas foram conduzidas através do *software* Statistix 8.0<sup>®</sup> (2003).

## Resultados e Discussão

Nas variáveis integridade de membrana e DNA em relação ao diluente utilizado não apresentou diferença em relação ao tempo de armazenamento (Tabela 1 e 2 ). Os valores encontrados neste trabalho para integridade de membrana foi inferior ao relatado por (Yániz et al, 2005) que acondicionou o sêmen a uma temperatura de 15°C para o diluente adicionado de gelatina, porém para o controle foi observados os mesmos valores.

**Tabela 1.** Média ( $\pm$  erro padrão da média da) variável integridade de membrana (%) no sêmen ovino durante o período de acondicionamento a 5° C.

| Diluente | Período de acondicionamento |                 |                 |                 |
|----------|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|          | 0h                          | 24h             | 48h             | 72h             |
| D1       | 68,7 $\pm$ 14,2             | 65,9 $\pm$ 8,4  | 57,5 $\pm$ 19,7 | 55,7 $\pm$ 11,7 |
| D2       | 72,0 $\pm$ 12,4             | 68,0 $\pm$ 17,2 | 57,7 $\pm$ 21,3 | 56,0 $\pm$ 14,8 |

D1= 10% de leite integral, 0,2g D-glucose, 50 mg estreptomicina 100mL de água millique; D2 = D1 acrescido de 1,5% de gelatina. (P>0,05)

**Tabela 2.** Média ( $\pm$  erro padrão da média da) variável integridade de DNA (%) no sêmen ovino durante o período de acondicionamento a 5° C.

| Diluente | Período de Armazenamento |                 |                 |                 |
|----------|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|          | 0h                       | 24h             | 48h             | 72h             |
| D1       | 94,5 $\pm$ 8,4           | 68,4 $\pm$ 27,4 | 64,3 $\pm$ 21,4 | 73,8 $\pm$ 19,4 |
| D2       | 96,4 $\pm$ 5,5           | 78,4 $\pm$ 26,2 | 65,2 $\pm$ 24,8 | 63,5 $\pm$ 18,7 |

D1= 10% de leite integral, 0,2g D-glucose, 50 mg estreptomicina 100mL de água millique; D2 = D1 acrescido de 1,5% de gelatina. (P>0,05)

A ausência de diferença na integridade de membrana e acrossoma entre os diluentes, faz com que o fato da adição de gelatina ao diluente possa constituir uma alternativa viável para evitar a necessidade de homogenização das doses. Segundo Yániz et al. (2005) e López-Gatius et al. (2005), que verificaram que o acondicionamento no diluente líquido geralmente causa sedimentação, além de provocar flutuação no pH e na produção de metabólitos devido esta sedimentação. Por este motivo a gelatina poderia ser um componente importante uma vez que ela não permite a sedimentação e permite uma maior imobilização do espermatozóide reduzindo sua motilidade.

### Conclusão

Portanto a adição da gelatina não traz prejuízos a qualidade seminal, e evita a sedimentação espermática facilitando a manutenção das doses.

### Referência

HARRISON, R.A.P.;VICKERS,S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal Reproduction and Fertility*.v.88,p 343-352.1990.

YÁNIZ,J., MARTÍ,J.I., SILVESTRE,M.A., FOLCH,J., SANTOLARIA,P.,ALABART,J.L., LÓPEZ-GATIUS,F. 2005.Effects of solid storage os sheep spermatozoa at 15°C on their survival and penetrating capacity. *Theriogenology* 64, 1844-1851.

LÓPEZ-GAUTIUS, F.; SANCHES, G.; SANCHO, M.. Effect of solid storage at 15°C on subsequent motility and fertility of rabbit semen. *Theriogenology*, v.64, p. 252-260, 2005.

GALLI,A.;BALDUZZI,D.;SIGNORI,T.Semen analysis by flow cytometry:an useful tool to evaluate fertility(M.I.V.Melo,M.Henry,A.R.C.L Becker, Arq Bras.Med. Vet. Zootec, v57, n6,p.757-763,2005, teste hiposmotico para avaliação da viabilidade do sêmen eqüino resfriado com diferentes diluidores)capacities.1998.