

UTILIZAÇÃO DE UM DILUIDOR À BASE DE LECITINA DE SOJA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES PARA CRIOPRESERVAÇÃO DO SEMÊN OVINO

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da utilização de um diluidor à base de lecitina de soja [1% (LS1), 2% (LS2) e 3% (LS3)] no sêmen congelado ovino em diferentes concentrações (100×10^6 e 200×10^6). Para tanto, foram utilizados quatro ovinos em idade reprodutiva, dos quais o sêmen foi obtido com vagina artificial. Após análise e aprovação do sêmen acima de 70% de motilidade, foi constituído o *pool* seminal, o qual foi utilizado no processamento. Cada *pool* foi submetido a quatro tratamentos, de acordo com diferentes concentrações de lecitina e concentrações espermáticas: Gema de ovo (G100 e G200); Lecitina de soja a 1% (LS1 100 e LS1 200); Lecitina de Soja a 2% (LS2 100 e LS2 200) e Lecitina de Soja a 3% (LS3 100 e LS3 200). Para congelação, as palhetas (0,25 mL) foram congeladas em máquina de congelação, na curva de congelação $-0,25$ °C/min até atingir 5 °C, seguida por estabilização de 2h e nova curva de congelação de -15 °C/min até -120 °C. Imediatamente após a congelação, as palhetas foram transferidas para o nitrogênio líquido (-196 °C) e armazenadas em botijão criobiológico. Após descongelação, procedeu-se à análise computadorizada da cinética espermática (CASA), assim como à avaliação da integridade de membrana plasmática (iMP) e acrossomal (iAC), e do potencial de membrana mitocondrial (PMM) por meio de microscopia de fluorescência, utilizando os fluoróforos diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio, isotiocianato de fluoresceína conjugado a Peanut agglutinin (FITC-PNA) e JC-1, respectivamente. A análise computadorizada da cinética espermática (CASA) e a avaliação da integridade de membrana plasmática (iMP) e acrossomal (iAC) e do potencial de membrana mitocondrial (PMM) foram determinadas após o descongelamento das palhetas. Foi observado que o grupo gema apresentou motilidade total (MT) superior ($p < 0,05$) aos grupos de lecitina numa concentração espermática de 100×10^6 . Com relação aos parâmetros de: motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN) e retilinearidade (STR), tanto na concentração de 100×10^6 quanto na de 200×10^6 , o grupo gema obteve resultados superiores ($p < 0,05$) aos grupos tratados com LS. Com relação a WOB, os grupos LS1 e LS2 apresentaram valores significativa ($p < 0,05$) menores. Na concentração de 200×10^6 , todos os grupos apresentaram resultados menores, em relação à concentração de 100×10^6 . Na VCL, os três grupos tratados com LS foram significativamente ($p < 0,05$) melhores do que o grupo gema, nas duas concentrações (100 e 200×10^6). Os tratamentos com a gema não diferiram ($p > 0,05$) dos tratados com LS nos valores de VSL, VAP e BCF, nas diferentes concentrações. Já no ALH o grupo gema foi inferior ($p < 0,05$) aos tratados com LS, em ambas as concentrações espermáticas. Na análise da integridade das membranas plasmática e acrossomal (IMPA) e do potencial de membrana mitocondrial (PMM), foi observado que no tratamento com LS1 foi significativamente superior ($p < 0,05$) ao grupo gema na concentração de 200×10^6 na IMPA. Também foi observada que o PMM sofreu influência apenas de um tipo de diluidor, a LS1, que foi superior ($p < 0,05$) na concentração do grupo de 200×10^6 . Portanto, pode-se concluir que a lecitina de soja 1% pode ser utilizada como possível substituto à gema de ovo na criopreservação do sêmen ovino.

Palavras-chave: lecitina de soja, criopreservação, sêmen, ovino.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of using an extender soy lecithin-based [1% (LS1), 2% (LS2) and 3% (LS3)] in frozen ram semen in different concentrations (100×10^6 and 200×10^6). To this end, four rams were used in reproductive age and semen samples were collected by artificial vagina. Upon review and approval of semen above 70% motility, it was formed the seminal pool and this used in processing. Each pool was subjected to four treatments, accordance with different lecithin concentrations and sperm concentration: Egg yolk (G100 and G200); Soy lecithin 1% (LS1 100 and 200); Lecithin 2% (LS2 100 and 200) and Soya Lecithin 3% (LS3 100 and 200). For freezing, the straws (0.25 ml) were frozen in freezing machine and were used the freezing curve of $-0.25 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ until reaching $5 \text{ }^\circ\text{C}$, followed by 2h stabilization and freezing new curve $-15 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ to $-120 \text{ }^\circ\text{C}$. Immediately after freezing, the straws were transferred to liquid nitrogen ($-196 \text{ }^\circ\text{C}$) and stored. After thawing, it was proceeded the computerized analysis of sperm kinetics (CASA), as well as assessment of the plasma membrane integrity (iMP) and acrosome (iAC), and mitochondrial membrane potential (MMP) by fluorescence microscopy, using the fluorophores carboxyfluorescein diacetate and propidium iodide, fluorescein isothiocyanate conjugated Peanut agglutinin (PNA-FITC) and JC-1, respectively. Computer analysis of sperm kinetics (CASA) and the evaluation of plasma membrane integrity (iMP) and acrosomal (iAC) and mitochondrial membrane potential (MMP) were determined after thawing of straws. It has been observed that the yolk group showed total motility (TM) higher ($p < 0.05$) than lecithin groups to sperm concentration of 100×10^6 . Regarding parameters: progressive motility (MP), linearity (LIN) and straightness (STR), both at concentration of 100×10^6 and 200×10^6 , showed superior results obtained with yolk group ($p < 0.05$) than those groups treated with LS. Regarding the WOB, LS1 and LS2 groups showed significant reduction ($p < 0.05$) of results. At concentration of 200×10^6 , all groups showed worse results than those with concentration of 100×10^6 . VCL in the three groups treated with SL were significantly ($p < 0.05$) better than the yolk group at both concentrations (100 and 200×10^6). The treatments with egg-yolk did not differ ($p > 0.05$) to those treated with lecithin in VSL, VAP and BCF values, in different concentrations. In ALH, yolk group was lower ($p < 0.05$) to those treated with LS, in both sperm concentrations. In the analysis of the integrity of the plasma and acrosomal membranes (IMPA) and mitochondrial membrane potential (MMP), it was observed that the treatment LS1 was significantly higher ($p < 0.05$) in the yolk group at concentration of 200×10^6 in IMPA. It was also observed that PMM was influenced only by one type of extender, LS1, which was greater ($p < 0.05$) in concentration of 200×10^6 . Therefore, it was concluded that soy lecithin 1% can be used as a possible replacement for egg yolk in ram semen cryopreservation.

Keywords: soy lecithin, cryopreservation, semen, sheep.