

## **USO DE TREALOSE E PLASMA SEMINAL EQUINO PARA MELHORAR VIABILIDADE DO SÊMEN OVINO CONGELADO**

Alceu Mezzalira<sup>1</sup>, Luana Zanferari<sup>2</sup>, Renata Casali<sup>3</sup>, Guilherme dos Santos<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Orientador, Departamento de Medicina Veterinária, CAV - alceu.mezzalira@udesc.br

<sup>2</sup>Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, CAV – bolsista PIVIC/UDESC

<sup>3</sup>Doutoranda em Ciência Animal, CAV.

<sup>4</sup>Acadêmico Medicina Veterinária, CAV

Palavras chave: congelamento, plasma liofilizado, criopreservação, aditivos.

Estudos *in vivo* demonstraram que o tempo de manutenção da viabilidade no sêmen ovino criopreservado é três vezes menor que o sêmen fresco. A baixa fertilidade do sêmen congelado se deve as alterações físicas e químicas ocorridas durante o processo de criopreservação, que promove a prematura capacitação e a redução da motilidade e da viabilidade espermática. Portanto, são necessárias estratégias que possibilitem o prolongamento da viabilidade do sêmen congelado e que otimize o transporte espermático, aumentando as taxas de prenhez. Dentre as estratégias pesquisadas, o uso de trealose e de plasma seminal liofilizado, tem se mostrado muito promissoras. O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização da trealose e da associação de trealose e plasma seminal equino liofilizado (PSE) ao diluente de congelamento, sobre as características do sêmen ovino após o descongelamento. O plasma seminal equino foi obtido de um *pool* de ejaculados coletados por vagina artificial de garanhões saudáveis. O plasma seminal obtido após centrifugações sucessivas dos ejaculados constituiu um pool que foi liofilizado. Após a liofilização uma amostra foi submetida à dosagem proteica em nanodrop por espectrofotometria. O sêmen ovino para congelamento foi obtido através de vagina artificial de 2 carneiros da raça Lacaune, sexualmente maduros. Depois de avaliados, os ejaculados constituíram um *pool*, que foi fracionado em 3 grupos e diluídos com Tris-gema glicerolado. Foram constituídos os seguintes tratamentos: Controle: constituído do pool de sêmen coletado + diluente. Trealose: adição de 100 mM de trealose ao pool de sêmen coletado + diluente. Trealose + Plasma seminal equino: adição de 100 mM de trealose e plasma seminal equino liofilizado (PSE) equivalente a 600 µg de proteína + diluente. As doses foram envasadas em palhetas 0,25mL com uma concentração espermática de 100 milhões de espermatozoides por palheta. O resfriamento e congelamento foram realizados no equipamento TK3000, sendo as doses foram armazenadas em botijão criogênico. Foram realizadas dez repetições. Para análise da viabilidade, o sêmen foi descongelado a 36° por 20 segundos e em seguida submetido às avaliações *in vitro*. As avaliações consistiram em Teste de Termo resistência (TTR), Teste Hiposmótico (HOST), Teste de migração ascendente “Swim Up” e Morfologia Espermática. Foi observado um efeito positivo da com a adição de Trealose ou Trealose + plasma seminal na motilidade espermática do sêmen descongelado. A adição de Trealose se mostrou como o tratamento mais efetivo,

permitindo maior motilidade progressiva em todos os tempos testados (Tabela 1). Também no vigor, observou-se um efeito positivo da adição de Trealose em todos os tempos avaliados.

**Tab. 1** Percentual de motilidade progressiva e vigor (escala de 1-5) de sêmen ovino congelado em Tris gema glicerolado (Controle) e adicionado de Trealose + plasma seminal equino liofilizado (PSE) ou Trealose. As avaliações foram realizadas logo após o descongelamento (Tempo zero) ou com 1, 2 e 3 horas do teste de termo resistência (TTR).

Tratamentos	Tempo Zero.	TTR 1h	TTR 2h	TTR 3h
<b>MOTILIDADE</b>				
Controle	36,5 <sup>b</sup>	34,0 <sup>c</sup>	30,5 <sup>b</sup>	27,0 <sup>b</sup>
Trealose+PSE	42,0 <sup>a</sup>	37,5 <sup>b</sup>	31,5 <sup>b</sup>	25,0 <sup>b</sup>
Trealose	43,5 <sup>a</sup>	42,0 <sup>a</sup>	38,5 <sup>a</sup>	34,0 <sup>a</sup>
<b>VIGOR</b>				
Controle	3,0 <sup>b</sup>	3,0 <sup>a</sup>	2,7 <sup>b</sup>	2,7 <sup>ab</sup>
Trealose+PSE	3,3 <sup>a</sup>	3,0 <sup>a</sup>	2,7 <sup>b</sup>	2,5 <sup>b</sup>
Trealose	3,3 <sup>a</sup>	3,1 <sup>a</sup>	3,0 <sup>a</sup>	2,8 <sup>a</sup>

<sup>abc</sup> Letras diferentes na mesma coluna de motilidade ou vigor indicam diferença pelo teste T (P<0,05).

Já no teste hipoosmótico observou-se maior taxa de integridade de membrana nos espermatozoides tratados com Trealose + PSE (38,6%), que foram superiores ao controle (25,8%), porém não diferiram do grupo tratado com Trealose (32,7%). Em relação à morfologia espermática (espermatozoides normais), não houve diferença entre os grupos controle (90,2%), Trealose+plasma (94,0%) e Trealose (91,1%). A maior migração dos espermatozoides após Swim Up foi obtida no grupo Trealose + PSE (4.225.000 espermatozoides/mL), que foi superior ao grupo Trealose (3.225.000 espermatozoides/mL), sendo ambos superiores ao grupo controle (1.887.500 espermatozoides/mL). Nas avaliações realizadas após a submissão ao Swim Up, observou-se maior motilidade progressiva nos grupos Trealose (85%) e Trealose+PSE (83,5%) que não diferiram entre si e foram superiores ao controle (78%). Também foi observado maior vigor no grupo Trealose (3,4) que não diferiu do grupo Trealose + PSE (3,3), mas foi superior ao grupo controle (3,2). A adição de 100 mM de trealose, ou de 100 mM de trealose + 600 µg de proteína de plasma seminal equino liofilizado, adicionados ao meio de congelamento, melhoram as características funcionais do sêmen ovino após o descongelamento. O tratamento com adição de 100 mM de trealose proporcionou a maior viabilidade ao sêmen após o descongelamento.