

COMPARAÇÃO ENTRE DOIS DILUENTES NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMEN BOVINO

Gabryela Rodrigues Diniz¹
Bárbara de carvalho Fernandes¹
Vanessa Lopes Dias Queiros De Castro²

vanessalopq@gmail.com

ÁREA DE CONHECIMENTO: Ciências Agrárias

PALAVRAS - CHAVE: criopreservação, diluente, sêmen, touro.

INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen visa a produção de um banco de células espermáticas utilizadas para técnicas da reprodução, fundamental ferramenta para potencializar o melhoramento genético (SILVA, *et al.*, 2011). Esta técnica tem sido amplamente utilizada para elevar o potencial reprodutivo bovino permitindo a escolha de reprodutores que melhor atendam às necessidades de produção sendo ferramenta imprescindível em programas de inseminação artificial e produção *in vitro* de embriões (LEITE, *et al.*, 2011). A relação da qualidade do sêmen com a fertilidade é um ponto crucial para a reprodução. Embora o processo de criopreservação do sêmen bovino seja um procedimento rotineiro, um número considerável de espermatozoides não resiste ao processo, devido às várias alterações bioquímicas e estruturais sofridas pelas células espermáticas (NAGY *et al.*, 2004). A criopreservação ocasiona perda irreversível na viabilidade espermática. A redução da temperatura impacta, principalmente, sobre a membrana celular, razão pela qual é submetida a rearranjos estruturais envolvendo lipídeos e proteínas. Há grande perda da estrutura funcional das membranas espermáticas e o metabolismo celular reduzindo o potencial fecundante quando comparada àquelas células oriundas de sêmen fresco (CELEGHINI *et al.*, 2008). Esta técnica acarreta o possível surgimento de motilidade anormal em que as células espermáticas passam a se movimentarem de forma circular ou retrógrada. Ademais, também há redução da taxa de glicólise, da respiração celular e da frutólise, além de aumentar os danos ao DNA e liberação de material intracelular (WATSON, 1995). Na tentativa de aprimorar, diferentes cientistas vêm desenvolvendo estudos com diversos diluidores com o intuito de minimizar as perdas durante o processo de congelação e descongelação do sêmen canino (MADEIRA, 2010). A gema de ovo é utilizada como ingrediente essencial na elaboração de meios de diluidores. Estudos demonstram que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) interagem com os fosfolipídios da membrana espermática conferindo resistência ao choque térmico (NEVES, 2008). Outro componente fulcral no processo de criopreservação são os crioprotetores intracelulares, sendo o glicerol o mais utilizado em diferentes espécies por reduzirem a concentração de eletrólitos do meio extracelular, permitindo a saída

¹ Acadêmicas do 9º período do curso de Medicina Veterinária da Faculdade Vértice – UNIVÉRTIX–Matipó.

² Professora do curso de Medicina Veterinária da Faculdade Vértice – UNIVÉRTIX – Matipó

de forma gradual de água do meio intracelular, contribuindo para a não formação de grandes cristais de gelo no interior das células espermáticas (SILVA, 2005). Dessa forma, o objetivo deste trabalho é avaliar os parâmetros seminais de sêmen bovino criopreservado com dois diluidores, a fim de verificar qual apresenta menores perdas celulares durante o processo de congelação.

METODOLOGIA

O experimento será conduzido em no Hospital Veterinário da Univértix. Os animais serão mantidos em pastagem de *Brachiaria brizantha*, água e mistura mineral em cocho foi disponibilizada “*ad libidum*”. Três touros com aproximadamente 3 anos de idade e peso médio de 550 kg serão submetidos ao exame andrológico completo. Todos os parâmetros físicos e morfológicos serão avaliados conforme os padrões de julgamento de sêmen para espécie, segundo o manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Imediatamente após a coleta do sêmen será realizado os exames físicos macroscópicos (odor, volume, cor e aspecto) e microscópicos (turbilhonamento, vigor e motilidade espermática), além da retirada das amostras para a concentração espermática (20 µL de sêmen em 4,0 mL de solução formol-salina tamponada) e para o espermograma (sêmen diluído em 1 mL de formol salina tamponado até turvar). Cada ejaculado será dividido e acrescido de dois diferentes diluentes constituindo dois tratamentos para cada animal. O tratamento 1 (T1) corresponderá ao diluente comercial BotuBOV® e o tratamento 2 (T2) será o diluente à base de Citrato-gema utilizado tradicionalmente para sêmen bovino. A diluição inicial foi realizada com o diluente previamente aquecido em banho-maria a 37°C, utilizando uma proporção de 1:1 (sêmen: diluente). Após a diluição do sêmen, o mesmo será acondicionado em caixa de isopor contendo gelo, adaptada e ajustada de maneira que ocorra o resfriamento de 37°C para 4°C em duas horas (tempo de resfriamento). Uma fração de diluente também será acondicionada nesta mesma caixa de isopor, a qual será utilizada para a diluição final. Após as duas horas de resfriamento, o sêmen será mantido a 4°C por mais quatro horas para o equilíbrio evitando choque térmico. Posteriormente, as amostras de espermograma e concentração espermática serão avaliadas e se aprovado o sêmen será novamente diluído de acordo com a sua concentração para que a concentração final atinja 30×10^6 espermatozoides por palheta (0,5 mL). Em seguida, as palhetas são congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas em água aquecida a uma temperatura de 37°C durante 30 segundos para serem avaliadas quanto à motilidade espermática e vigor de cada diluidor, de cada partida de sêmen diluído em T1 e T2. Os padrões mínimos adotados para sêmen pós-descongelamento para a espécie bovina deverá estar de acordo com o manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Motilidade espermática: $\geq 30\%$ e vigor: ≥ 3 . Os resultados como variáveis quantitativas: motilidade espermática e vigor serão submetidas ao teste não paramétrico de Wilcoxon (SAEG, 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Trata-se de uma pesquisa em andamento, até o presente momento o trabalho está baseado em uma revisão bibliográfica.

REFERÊNCIAS

CELEGHINI ECC, ARRUDA RP, ANDRADE AFC, NASCIMENTO J, RAPHAEL CF, RODRIGUES PHM. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Anim Reprod Sci**, v.104, p.119-131, 2008.

LEITE, A. P. *et al.* Criopreservação do Sêmen Bovino. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 13, n. 4, p. 279-286, 2011.

MADEIRA, V.L.H. *et al.* Efeito de diferentes protocolos de descongelção sobre o sêmen canino criopreservação em diluidor à base água de coco em pó (ACP-106). **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 4, p. 845-852, 2010.

NAGY, S.; HALLAP, T.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Alterações na integridade da membrana plasmática e acrossoma de espermatozoides bovinos congelados descongelados durante uma incubação de 4h, medida por citometria de fluxo multicolorida. **Ciência da Reprodução Animal**, v. 80, n. 3-4, p. 225-235, 2004.

NEVES, M.M. **Extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de *Gallusdomesticus* e sua aplicação na criopreservação do sêmen canino.** 2008. 116f. Tese (doutorado em Ciências Animal) Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/SSLA-7UEHL3>. Acesso em: 7 abr. 2021.

SILVA, S. V.; GUERRA M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 370-384, 2011.

WATSON P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of their post-thawing function. **Reproduction and Fertility Development**, v.7, p.871-891, 1995.