



AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CRIOPROTETOR DE MEIO DE ORIGEM VEGETAL NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO: ANÁLISE DE DADOS

Vitor Hugo Alves Ribeiro¹ – Unifesspa
e-mail: 123vitorribeiro@gmail.com
Lucas J. Abud² - Unifesspa
e-mail: lucas.abud@unifesspa.edu.br

Agência Financiadora: UNIFESSPA/PNAES, FAPESPA ou CNPq

Eixo Temático/Área de Conhecimento: Reprodução Animal

1. INTRODUÇÃO

Com o crescimento da IATF é necessário aprimorar as técnicas de criopreservação para manter a qualidade e fertilidade espermática, possibilitando a exportação para outros países. Assim, é de grande importância o estudo de agentes crioprotetores e moléculas que atuem protegendo a célula espermática para se obter melhor fertilidade reduzir custos e tornar a pecuária mais eficiente (LEMMA., 2011).

A taxa de fertilidade é reduzida com a criopreservação, há células que sofrem decréscimo de 50% na motilidade e 60% na integridade de membrana (CELEGHINI *et al.*, 2017). Os crioprotetores adicionados aos diluentes são fundamentais para minimizar o criodano, porém o uso de compostos de origem animal trás riscos biológicos que restringe a comercialização com alguns países, assim agentes alternativos de origem vegetal tem potencial de mercado, portanto é necessário pesquisas de crioprotetores sem compostos de origem animal e que garanta proteção as células. Onde destaca-se a lecitina de soja, resultante da extração do óleo de soja que contém características químicas favoráveis a criopreservação.

Objetivou-se com este projeto analisar dados para obtenção de resultados sobre a viabilidade de espermatozoides bovinos criopreservados em diferentes meios crioprotetores.

2. MATERIAS E MÉTODOS

Foram analisados dados referente á qualidade espermática de sêmen bovino criopreservado em diferentes meios crioprotetores. Usando meios a base de elementos biológicos Comercial(T1), um a base de elementos biológicos (TRIS- gema de ovo-T2), e um sem elementos biológicos produzido em laboratório a base de lecitina de soja (T3). Para verificar a eficácia dos meios foi feito exames detalhados pós-criopreservação da integridade da membrana plasmática, acrossoma e cinética de movimento pelo sistema computadorizado (CASA). As amostras foram oriundas de um projeto no qual coletou sêmen de animais para testar diferentes meios crioprotetores. Assim, para concretização das análises do sêmen após a criopreservação foram a cinética do movimento pelo sistema computadorizado (CASA), integridade das membranas plasmática, integridade acrossomal por microscopia de epifluorescência (AxiophotZeiss) na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A análise computadorizada da motilidade (CASA) foi realizada nas amostras após o descongelamento em banho maria a 37°C/ 30 segundos, transferida para um microtubo de 1,5 ml, mantido na mesma temperatura para posteriores avaliações. 2µL da amostra foi colocada na lâmina de leitura (Makler) previamente aquecida a 37°C. Utilizou-se o aparelho modelo Ivos-Ultimate 12 da Hamilton Thorne Biosciences, ajustado para análise de sêmen bovino. As características de movimento espermático analisadas foram: Motilidade Total (MT, %), Motilidade progressiva (MP, %), velocidade do trajeto (VAP µm/s), velocidade progressiva (VSL µm/s), velocidade curvilínea (VCL µm/s),

¹Graduando em Medicina Veterinária - Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará

²Doutor em Ciência Animal - Professor Titular Adjunto da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (Unifesspa). Coordenador do projeto.



deslocamento lateral da cabeça (ALH μm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %). Para avaliação da integridade da membrana plasmática utilizou-se o diacetato de 6 carboxifluoresceína (C-FDA) e iodeto de Propídio (IP) conforme descrição de HARRISON & VICKERS (1990). Uma amostra de sêmen (10 μl) foi adicionada a 40 μl de solução de corante e incubadas por 10 minutos em microtubos protegidos da luz. Uma alíquota de 7 μl de solução corante com o sêmen foi colocada em uma lâmina e coberta por uma lamínula e observada em microscópio de epifluorescência (AxiophotZeiss: filtro de comprimento de onda de 395/420 nm de excitação/emissão). Foram contadas 200 células espermáticas, sendo classificadas de acordo com a coloração das células em: Membrana íntegra (coloração verde) e membrana lesada (as células com coloração vermelha e as que coravam de verde e vermelho). A avaliação da integridade do acrossoma utilizou-se uma conjugação de isotiocianato de Fluoresceína – FITC (sonda fluorescente) com lecitina de amendoim (peanutaglutinin – PNA) e IP, como descrito por KLINC & RATH (2007). Amostra de sêmen (10 μL) foi diluída em uma solução de corante (30 μL) e incubada por 10 minutos. Uma alíquota de 7 μl de solução corante com o sêmen foi colocada em uma lâmina e coberta por uma lamínula e observada em microscópio de epifluorescência (AxiophotZeiss: filtro de comprimento de onda de 494/517 nm de excitação/emissão). Foram contadas 200 células espermáticas, sendo classificados em duas categorias: espermatozoides inviáveis (morto com acrossoma íntegro - coloração vermelha na cabeça e ausência de coloração no acrossoma; morto com acrossoma reagido - coloração vermelha na cabeça e verde na região acrossomal); vivo com acrossoma reagido - ausência de coloração na cabeça e presença de coloração verde na região acrossomal) e espermatozoides viáveis (vivo com acrossoma íntegro - ausência de coloração na cabeça e acrossoma; Os dados foram analisados em delineamento de blocos ao acaso, com três tratamentos e cinco blocos (bovinos), utilizou-se para a análise estatística o programa Bio Estat versão 5.0. O efeito dos tratamentos sobre os parâmetros da motilidade espermática, integridade de membranas plasmática e acrossomal foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias pelo teste de Tukey com nível de significância $p>0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados não diferiram significativamente ($p>0,05$) para os três meios crioprotetores avaliados nas variáveis de motilidade total (T1- 61,40 \pm 17,10; T2-53,80 \pm 1,79; T3-52,60 \pm 18,58), motilidade progressiva (T1-40,60 \pm 15,39; T2-24,80 \pm 15,39; T3- 25,20 \pm 9,20), velocidade do trajeto (T1-73,48 \pm 5,83; T2-67,36 \pm 8,89; T3-71,40 \pm 6,99), velocidade progressiva(T1-64,50 \pm 7,10; T2-50,98 \pm 7,23; T3-53,98 \pm 4,51), deslocamento lateral da cabeça (T1-127,32 \pm 17,31; T2-121,28 \pm 15,48; T3-134,86 \pm 19,37) , batimento cruzado (T1-33,04 \pm 6,81; T2-26,12 \pm 3,77; T3-30,18 \pm 5,45) e retilinearidade (T1-84,00 \pm 5,66; T2-77,20 \pm 6,50; T3-75,20 \pm 4,97) avaliado pelo sistema CASA, resultados semelhantes foram descritos por CAVALCANTE et al. (2014) comparando TRIS-gema de ovo e água de coco em pó, para variável motilidade total, ADEYANJU et al. (2018) observou a equivalência do diluidor a base de gema de ovo em comparação a lecitina de girassol e FARIAS et al. (2019) encontrou divergência entre o meio TRIS - gema de ovo comparado com extrato de *aloe vera*. Os trabalhos que tiveram similaridade podem ser justificado devido á proteção semelhante proporcionada pelos meios crioprotetores que favoreceram as células espermáticas.

Para velocidade progressiva (T1-40,60 \pm 15,39; T2-24,80 \pm 15,39; T3-25,20 \pm 9,20) houve diferença entre os meios avaliados, em que o diluidor comercial promoveu melhor proteção que o meio TRIS-gema de ovo e Lecitina de soja, estes não diferiram. Na variável linearidade (T1-53,40 \pm 8,14; T2-45,00 \pm 6,44, T3-41,20 \pm 5,07) o meio a base de Lecitina teve resultado inferior ao meio comercial e o meio TRIS- gema de ovo, estes não tiveram diferença. MURPHY et al., 2018 avaliando três meios comerciais, sendo um de origem vegetal, obtiveram resultados diverso para velocidade progressiva nos meios a base de gema de ovo, enquanto para linearidade não houve diferença significativa ($p>0,05$). A possível explicação para redução da velocidade progressiva é o estresse causado pelo processo de congelamento e descongelamento que influenciam a atividade dos espermatozóides.



Nas variáveis de motilidade rápido (T1-48,60±15,90; T2-38,00±6,16; T3-39,20±16,27); médio (T1-12,80±4,76; T2-15,60±6,47; T3-13,40±4,72); baixo (T1- 4,00±1,00; T2-3,00±1,58; T3-4,00±1,58); parado (T1-34,80±17,63; T2-43,20±1,92; T3-43,40±19,71) os resultados não diferiram estatisticamente ($p>0,05$) para os três diluidores em todas as variáveis, mostrando a eficiência crioprotetora dos três meios para tal característica. Resultado semelhante descrito por SISY et al. (2018) comparando o meio TRIS-citrato-frutose e concentrações de lecitina de soja.

Nos resultados da integridade de membrana plasmática e integridade do acrossoma (T1-30,80±10,08; T2-18,00±7,14; T3-14,60±6,58) houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os diluidores comercial e Lecitina, entretanto, TRIS – Gema de ovo não diferiu dos demais. O diluidor comercial ofereceu melhor proteção contra o criodano em relação a Lecitina de soja, resultados semelhantes descritos por (ADEYANJU., et al., 2018). A integridade da membrana plasmática e acrossomal teve melhor resultado em meios a base de elementos biológicos por ter maior concentração de lipídeos, benéficas às membranas.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A lecitina de soja comprovou eficiência considerável na criopreservação por apresentar poucas divergências nas variáveis avaliadas em comparação com os meios contendo gema de ovo.

Os meios de origem vegetal são potenciais agentes contra o criodano, portanto mais estudos na busca de novas alternativas em substituição aos meios de origem animal devem ocorrer.

REFERÊNCIAS (Conforme ABNT)

- A. LEMMA, Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility, Artificial Insemination in Farm Animals, 2011.
- C. F. A. FARIAS, A. L. P. TORK, A. S. RIQUE, A. F. QUEIRÓS, S. V. SILVA, Estudo da eficácia da Aloe vera como crioprotetor vegetal na refrigeração de espermatozoides epididimários de bovinos, Rev Bras Reprod Anim v.43, n.3, p.787-794, jul./set. 2019.
- DR. G. SISY, W. S. EL-NATTAT, R. I. EL-SHESHTAWY, A. M. A. EL-MAATY, Substitution of egg yolk with different concentrations of soybean lecithin in tris-based extender during bulls' semen preservability, Asian Pacific Journal of Reproduction, 2016
- E.M. MURPHY, C. O'MEAR , B. EIVERS , P. LONERGAN, S. FAIR, Comparison of plant- and egg yolk-based semen diluents on in vitro sperm kinematics and in vivo fertility of frozen-thawed bull semen, Animal Reproduction Science, 2018
- J. M. M. CAVALCANTE , O. O. BRASIL, C. C. M. SALGUEIRO, C. S. B. S.VANDERLEY , J. F. NUNES, CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN OVINO EM MEIO DILUENTE À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP-102c), Cienc. anim. bras., Goiânia, v.15, n.3, p. 344-353, jul./set. 2014
- S. O. ADEYANJU, J. O. DARAMOLA , J. A. OLANITE , O. S. AWOKOLA, Effect of sunflower lecithin on Kalahari Red goat semen during cryopreservation, AGRICULTURA TROPICA ET SUBTROPICA, 51/1,21-28, 2018