

ANÁLISE COMPUTADORIZADA DE SÊMEN EQUINO RESFRIADO DURANTE 48H COM UTILIZAÇÃO DE 2 CRIOPROTETORES

NICOLE FREITAS GONÇALVES¹; IZANI ACOSTA BONEL²; CAROLINE VIÉGAS PINTO³; CARINE DAHL CORCINI⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – nicolefreitasg@outlook.com

² Universidade Federal de Pelotas – izanibonel@hotmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – carolineviegas18@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – corcinicd@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia reprodutiva inclui todos os métodos utilizados como meio de melhorar a eficiência reprodutiva. Entre elas está a utilização de sêmen refrigerado, que segundo a literatura pode permanecer viável por 24 a 72 horas. Esta preservação é conseguida através da utilização de diluentes e crioprotetores que mantêm a integridade das membranas celulares e evitam a formação de cristais de gelo.

Desde a descoberta da de gema de ovo como protetor para criopreservação de espermatozoides, tem sido amplamente usado para criopreservar esperma. Como a gema de ovo apresenta risco de contaminação com patógenos e varia em composição, há um desejo de substituí-lo por outros componentes. Baseando-se na investigação das porções lipídicas e lipoprotéicas da gema de ovo, foi descoberto que é a porção fosfolipídica que confere proteção ao esperma durante o resfriamento (RÖPKEA et al., 2011).

A criopreservação visa manter a funcionalidade e viabilidade espermática através de processos sequenciais de redução da temperatura. Possibilita a utilização de ejaculados por períodos relativamente longos (refrigeração), reduzindo riscos e custos, além de facilitar o transporte de material genético (CASTELO et al., 2008). No entanto, o processo expõe os espermatozoides ao choque térmico e crioinjúrias, danos estruturais e funcionais devido à redução da temperatura, além de estresse químico e oxidativo (WATSON; MORRIS, 1987). Esses danos diminuem a qualidade e capacidade fertilizante dos gametas.

Estudos tem salientado que a manipulação de agentes estabilizadores de membrana, com o implemento de antioxidantes, como carotenoides, que visão minimizar o estresse oxidativo. Com intuito da introdução de um estabilizador de membrana de origem vegetal, lecitinas de soja comerciais em diferentes apresentações e métodos de adição aos diluentes têm sido utilizadas em estudos na criopreservação de seminal. A lecitina de soja é uma mistura natural de fosfatidilcolina e vários ácidos graxos, como esteárico, oleico e palmítico, que confere estabilidade estrutural às membranas celulares (OKE et al., 2010).

Este estudo objetivou avaliar a cinética espermática de sêmen equino fresco e resfriado a 5°C por 48h, utilizando 2 diferentes crioprotetores contendo 45% (S45) e 75% (S75) de fosfatidilcolina de soja na concentração de 20mm, respectivamente, em um diluente comercial (BotuFlex®).

2. METODOLOGIA

Previamente a chegada das amostras, a caixa térmica já era ligada para que reduzisse a temperatura, os lipossomas eram retirados da geladeira, as raques e microtubos identificados.

Foram recebidas 5 amostras de sêmen equino, já diluídas com BotuFlex®, dentro de caixa isotérmica com auxílio de gelos reutilizáveis. Após a chegada das amostras utilizamos uma pipeta de 5mL para quantificar as doses e depois foi feita a divisão em 3 microtubos e adicionados os lipossomas S45 e S75, das seguintes concentrações: T1: é o controle, T2: 4uL de S45 de 20mm e T2: 4uL de S75 de 20mm; na sequência colocamos os microtubos previamente identificamos nas raques e os inserimos na caixa térmica há 5°C.

As avaliações da cinética espermática foram realizadas após 48h de refrigeração. Os parâmetros de cinética espermática foram analisados com o sistema automatizado Computer Assisted Sperm Analysis (Sperm Vision® 3.5, Minitub, Tiefenbach, Germany), em microscópio de contraste de fase 200 X (AxioScope A1®, Zeiss, Germany). Uma alíquota de 3µL de cada amostra foi colocada entre uma lâmina microscópica e uma lamínula; a avaliação celular consistia em 150 células por campo, sendo avaliados 10 campos aleatórios. Os parâmetros avaliados neste estudo foram: motilidade total (MT); motilidade progressiva (MP); velocidade curvilínea (VCL); velocidade linear progressiva (VSL); velocidade média da trajetória (VAP); distância linear progressiva (DSL); distância média da trajetória (DAP); retilineariedade (STR); lineariedade (LIN).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos últimos anos, diversos foram os estudos comparando a qualidade seminal após o uso de diluidores com e sem produtos de origem animal e a maioria dos resultados encontrados foram a favor dos diluidores compostos por proteína animal (Rodrigues, 2014). Sabe-se que os danos causados para processo de criopreservação alteram diversas características do espermatozóide, contudo o diluidor e o crioprotetor podem reduzir tais danos celulares.

Na tabela abaixo temos os dados das avaliações de cinética de acordo com o tratamento e os parâmetros analisados.

Tabela 1 – valores das análises cinéticas dos 5 machos com 2 criopreservadores.

| Parâmetro | S45 | S75 |
|--------------------------------|-------|--------|
| Motilidade total | 25,75 | 55,57 |
| Motilidade progressiva | 18,51 | 45,68 |
| Distância média da trajetória | 18,43 | 27,45 |
| Distância linear progressiva | 12,61 | 18,18 |
| Velocidade média da trajetória | 40,48 | 60,19 |
| Velocidade curvilínea | 77,18 | 120,62 |
| Velocidade linear progressiva | 27,74 | 40,02 |
| Retilineariedade | 59 | 66 |
| Lineariedade | 33 | 35 |

Lipo: 4uL de S45 de 20mm e 4uL de S75 de 20mm

Nosso estudo assim como o de Zaffalon (2009), utilizou um diluente e o crioprotetor à base de fosfatidilcolina de soja (não descrito as concentrações utilizadas neste experimento), diferindo que no estudo em questão foram

comparados dois diluentes diferentes à base de fosfatidilcolina, com isso seus resultados perante as análises da utilização deste crio foram similares aos nossos dados nos parâmetros de Motilidade total 20,08% e 19,90% e motilidade progressiva 17,47% e 16,06%, resultados similares ao S45 com 25,75% e 18,51%, respectivamente.

Felício (2008) obteve resultados semelhantes nos parâmetros de Motilidade total 61,4%, Velocidade curvilínea 176,3% e retilineariedade 77% quando comparado com os dados do S75 que foram 55,57%, 120,62% e 66%, respectivamente. De todos os parâmetros avaliados apenas distância linear progressiva e lineariedade não apresentam diferenças tão significativas, porém os outros parâmetros avaliados possuem grandes diferenças.

Com relação aos baixos resultados encontrados no S45 em relação ao S75, pode ser relacionado segundo De Leeuw et. al. (1993) por uma maciça aderência de lipídeos de lecitina de soja (fosfatidilcolina de soja) na superfície da membrana plasmática devido a alta concentração da substância, bem como as modificações da composição da própria membrana ou mesmo uma forte interação dos lipídios presentes na lecitina de soja com a membrana espermática.

Em relação ao S75 podemos afirmar que a concentração utilizada teve ação crioprotetora na membrana espermática apesar destes lipídeos promoverem uma barreira física contra crioinjúrias, visto que esses lipídeos do diluente, segundo Rickers et. al. (2006), apresentaram a capacidade de revestirem a membrana plasmática, sem contudo haver uma interação destes com os lipídeos da membrana plasmática.

4. CONCLUSÕES

Concluimos que o S75 possui propriedade superior ao S45, preservando a integridade celular e agindo como um excelente crioprotetor para o sêmen equino resfriado por 48 horas. Contudo ainda deve-se pesquisando outras concentrações e tempos de refrigeração.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CASTELO, T DE S.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, 2, n. 3, p. 67-75, 2008.

DE LEEUW. F.E.; DE LEEUW, A. M.; DEN DAAS, J.H.G.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJA, A. J. Effects of various cryoprotective agents and membrana-stabilizing compounds on bull sperm membrana integraty alter cooling and freezing. **Cryobiology**, v30, pg 32-44, 1993.

FELÍCIO, G. B. **Efeito da substituição da gema de ovo pela lecitina de soja na criopreservação de sêmen equino**. 2008. Dissertação (Mestrado em reprodução animal) - Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade do Estado de São Paulo.

RODRIGUES, M. de P. **Novas percepções sobre o uso de lectina de soja na criopreservação e fertilidade de espermatozoide bovino**. 2014. Dissertação (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo.

MEDINA-LEÓNA, A. Z.; DOMÍNGUEZ-MANCERAA, B.; CAZALEZ-PENINOB, N.; CERVANTES-ACOSTAA, P.; JÁCOME-SOSAA, E.; ROMERO-SALASA, D.; Barrientos-Moralesa, M. Cryopreservation of horse semen with a liposome and trehalose added extender. **Austral J Vet Sci.** V51, p119-123, 2019.

PILLET E.; LABBE C.; BATELLIER F.; DUCHAMP G.; BEAUMAL V. Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. **Theriogenology.** 77, p268-279, 2012.

RICKER, J. V.; LINFOR, J. J.; DELFINO, W. J.; KYSAR, P.; SCHOLTZ, E. L.; TABLIN, F.; CROWE, J. H.; BALL, B. A.; MEYERS, S. A. Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. **Biology of Reproduction,** v74, pg 359-365, 2006.

RÖPKEA, T.; OLDENHOFB, H.; LEIDINGC, C.; SIEMEB, H.; BOLLWEINA, H.; WOLKERSD, W.F. Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. **Theriogenology.** 76, p1465–1472, 2011.

WATSON, P. F.; MORRIS, G. J. Cold shock injury in animal cells. **Symp Soc Exp Biol.** 41, p311-340, 1987.

ZAFFALON, F. G. **Alterações semelhantes à capacitação no sêmen bovino após a criopreservação utilizando diluidores a base de gema de ovo ou lecitina de soja.** 2009. Dissertação (Mestrado em ciências) - Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo.