

MORFOLOGIA E INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS COM ADIÇÃO DE UM EXTRATO NATURAL (NP)

JACQUELINE ZANELLA ^{1,2}, CAMILA KETERINE GORZELANSKI TRENKEL ³,
MATHEUS RAMOS ROSIN ³, MARIA EDUARDA POGORZELSKI ⁴, MARIANA VALENTINI CASAGRANDE ⁴, ISADORA CORAZZA CASTAGNARO ⁴, ADALGIZA PINTO NETO ^{2,5}

1 Introdução

A utilização de biotécnicas reprodutivas, como a inseminação artificial (IA) tem ganhado destaque nos sistemas de criação de bovinos, por apresentar inúmeras vantagens, como a utilização de animais de alto padrão genético, selecionando características desejáveis, melhorando o rebanho, e uniformizando os plantéis (SILVA *et al.*, 2013).

Os avanços na reprodução animal, associados à utilização de sêmen criopreservado nas técnicas de inseminação artificial, vem se destacando por proporcionar a preservação do material genético dos animais (SOUZA *et al.*, 2019). A técnica de criopreservação consiste em diluição, resfriamento, congelação, armazenamento e descongelação do sêmen. Os processos de diluição culminam na redução da concentração e disponibilidade de antioxidantes, resultando em desequilíbrio na proporção oxidantes/antioxidantes, gerando consequentemente, quadros de estresse oxidativo (GUERRA *et al.*, 2012).

Essas técnicas de criopreservação estão sendo aprimoradas, com o intuito de reduzir as perdas de espermatozoides viáveis durante todo processo (SILVA *et al.*, 2013). Diversas pesquisas estão sendo realizadas, com o intuito de mitigar os efeitos adversos da criopreservação, empregando crioprotetores e aditivos no sêmen. Como exemplo, a adição de compostos antioxidantes tem sido investigada por sua capacidade em reduzir os danos causados pelo estresse oxidativo (GUERRA *et al.*, 2012).

1 Bolsista IC Fundação Araucária. Acadêmica Medicina Veterinária. Campus Realeza. Universidade Federal da Fronteira Sul. Contato: jacqueline.zanella@uffs.edu.br

2 Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal da Fronteira Sul, LABRA.

3 Programa de Pós-Graduação em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul. Universidade Federal da Fronteira Sul. Campus Realeza.

4 Acadêmica de Medicina Veterinária. Universidade Federal da Fronteira Sul. Campus Realeza

5 Docente do curso de Medicina Veterinária. Universidade Federal da Fronteira Sul. **Orientador(a).**

Os antioxidantes são substâncias como vitaminas, minerais, aminoácidos, ácidos graxos e outros compostos vegetais, que combatem e neutralizam os efeitos deletérios causados pelos radicais livres no sêmen criopreservado, por serem substâncias que protegem a membrana plasmática dos espermatozoides, garantindo sua viabilidade e atividade metabólica, bloqueando a peroxidação lipídica que desencadeia danos irreversíveis à célula (SILVA *et al.*, 2018).

É sabido que as biotecnologias reprodutivas, como a criopreservação espermática, podem desencadear alterações funcionais e morfológicas no sêmen, resultando em menores taxas de fertilização. A partir disso, se faz necessária a adoção de medidas preventivas que visem minimizar tais efeitos deletérios, objetivando preservar o maior número possível de células viáveis, e para tanto, a utilização de compostos antioxidantes apresenta papel relevante na manutenção da viabilidade dos espermatozoides (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

2 Objetivos

Avaliar os efeitos de diferentes concentrações de um extrato natural antioxidante (NP) na morfologia e integridade da membrana espermática, porcentagem de espermatozoides vivos e mortos, porcentagem de defeitos maiores e menores nos espermatozoides de bovinos após descongelação.

3 Metodologia

Este estudo foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal, da Superintendência Unidade Hospitalar Veterinária Universitária - SUHVVU, da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Realeza*, Paraná. Para tanto, foram analisadas doses de sêmen já criopreservadas de um bovino reprodutor, hígado, da raça Braford.

As palhetas de sêmen foram descongeladas em banho-maria (37°C, por 30 segundos) e homogeneizadas em tubos eppendorf. Foram descongeladas duas palhetas de sêmen de cada grupo experimental, como se segue:

- Grupo 1: Controle, sêmen diluído;
- Grupo 2: Sêmen diluído, acrescido de 0,5% de extrato natural – NP
- Grupo 3: Sêmen diluído, acrescido de 0,75% de extrato natural – NP
- Grupo 4: Sêmen diluído, acrescido de 1% de extrato natural – NP

Para avaliação da morfologia e integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, foram utilizadas duas colorações: Eosina/Nigrosina e Vermelho Congo (CBRA, 2013).

Para a preparação do corante vermelho congo, foi utilizado 100mL de solução aquosa saturada de vermelho congo e 100mL de solução aquosa 0,5% de violeta genciana. Após preparo do corante, foi realizado esfregaço delgado de sêmen, em lâmina pré-aquecida. Na sequência, a mesma foi imersa em solução de vermelho congo por um minuto e lavada suavemente em água corrente e seca ao ar. Posteriormente, a lâmina foi imersa em solução violeta genciana por 30 segundos, lavada suavemente em água corrente e seca ao ar (CBRA, 2013).

Para o preparo da coloração Eosina/Nigrosina foi utilizada a seguinte formulação: 3,3 gramas de Eosina Y, 20,0 gramas de Nigrosina e 1,5 gramas de Citrato de sódio, e utilizada uma balança de precisão para a pesagem dos componentes que posteriormente foram dissolvidos em 300mL de água destilada (CBRA, 2013). Para realização do esfregaço foi utilizada a proporção de 1:1 sendo uma gota de sêmen e uma gota de corante, respectivamente (CBRA, 2013).

Para cada grupo experimental e método de coloração foram preparados esfregaços do sêmen descongelado em duas lâminas. Avaliadas 200 células espermáticas, a contagem e avaliação dos espermatozoides foi realizada por três avaliadores, com auxílio de microscopia por contraste de fase em aumento de 400x e 1000x. Para as alterações espermáticas, foi considerada a classificação de Barth e Oko (1989), que as divide em defeitos maiores, menores e totais. Ademais, foi determinada a porcentagem de espermatozoides vivos e mortos, pela coloração Eosina/Nigrosina (CBRA, 2013).

Os dados obtidos foram coletados, organizados em planilha, tabulados e submetidos a análise estatística, e as diferenças comparadas pelo Teste Tukey, considerando 5% como nível de significância ($p < 0,05$).

4 Resultados e Discussão

Na análise da morfologia a Tabela 1, presente a porcentagem de defeitos espermáticos do sêmen bovino acrescido de diferentes concentrações de NP, após congelação e descongelação.

Tabela 1: Morfologia de espermatozoides bovinos após processo de congelação e descongelação.

Grupos experimentais	Morfologia espermática											
	Defeitos Maiores (%)							Defeitos Menores (%)				
	Acrossoma	Cabeça	Cauda	PI	GCP	TER	TOTAL	Cabeça	Cauda	PI	GCD	TOTAL
Controle descongelado	0,66	2,03	1,92	0,88	0,22	0,01	5,72	5,00	8,51	1,72	0,14	15,37
NP 0,5% descongelado	0,32	2,15	1,44	0,75	0,15	0,03	4,84	4,28	9,73	1,28	0,19	15,48
NP 0,75% descongelado	0,37	2,16	1,83	1,06	0,22	0,02	5,66	4,27	8,20	1,29	0,22	13,98
NP 1,0% descongelado	0,29	2,14	2,62	0,70	0,18	0,01	5,94	4,29	7,03	1,53	0,09	12,94

Legenda: **PI:** Peça Intermediária; **GCP:** Gota Citoplasmática Proximal; **TER:** Teratológicos e **GCD:** Gota Citoplasmática Distal.

Observou-se que não houve diferença na porcentagem de defeitos individuais e totais nos grupos experimentais avaliados nesse estudo ($p > 0,05$). Ao avaliar o percentual de defeitos de acrossoma, houve uma redução numérica na ocorrência dessas alterações, à medida que se aumentou a concentração de NP quando comparada ao grupo controle descongelado. É coerente sugerir que o extrato natural possa ter exercido seu efeito antioxidante sob a morfologia espermática, com redução das EROs e, conseqüentemente, menor lesão a membrana acrossomal, resultando em menor percentual de defeitos de acrossoma após descongelação.

A Tabela 2 apresenta os resultados da avaliação de integridade de membrana dos espermatozoides após congelação e descongelação.

Tabela 2: Integridade da membrana de espermatozoides no sêmen bovino após descongelação, utilizando-se um extrato natural (NP) em diferentes concentrações no meio diluidor.

Grupos experimentais	Integridade de membrana plasmática (%)	
	Lesados	Íntegros
Controle descongelado	1,44	74,50
NP 0,5% descongelado	3,61	72,27
NP 0,75% descongelado	3,55	67,88
NP 1,0% descongelado	1,55	77,33

Não se evidenciou diferença entre o percentual de espermatozoides íntegros (vivos) e lesados (mortos) entre grupos experimentais inseridos nesse estudo ($p>0,05$).

5 Conclusão

Conclui-se que a adição do estrato natural (NP), nas diferentes concentrações apresentadas no estudo, não influenciou na morfologia e na integridade da membrana plasmática dos espermatozoides analisados.

Referências Bibliográficas

CBRA. Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. 2ª ed. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, MG. 45p, 2013.

GUERRA, P. M. M. *et al.* Uso de antioxidantes no sêmen ovino. **Ciência Animal**, Fortaleza, p. 1-11, 2012.

OLIVEIRA, W. *et al.* Criopreservação de sêmen e emprego de vitaminas no meio diluidor: Revisão de Literatura. **Scientific Electronic Archives**, v. 11, n.6, p. 1-8, 2018.

SILVA, C. N. *et al.* Ação de antioxidantes na manutenção da viabilidade espermática de sêmen bovino criopreservado. **Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 9, n. 17, p. 1-17, 2013.

SILVA, A. F. *et al.* Efeito da adição de antioxidantes sobre a viabilidade do sêmen bovino. **Arquivo Ciência Veterinária Zoologia UNIPAR**, Umuarama, v. 21, n. 4, p. 145-146, 2018.

SOUZA, S. E. *et al.* Adição de vitaminas ao meio de criopreservação de sêmen de bovinos pantaneiros. **Investigação**, Cuiabá, v. 18, n. 1, 2019.

Palavras-chave: Viabilidade seminal; antioxidante; congelção.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2024-0305

Financiamento

