



## VIABILIDADE *IN VITRO* DO SÊMEN BOVINO CONGELADO COM DIFERENTES ANTIOXIDANTES NO CRIOPROTETOR. RESULTADOS PARCIAIS.

MATHEUS RAMOS ROSIN<sup>1</sup>, WILLIAM DE OLIVEIRA<sup>2</sup>, MARCELO FALCI MOTA<sup>3</sup>,  
JONATAS CATTELAM<sup>3</sup>, ADALGIZA PINTO NETO<sup>4</sup>

### 1 Introdução

O Brasil é um país que atualmente mais se destaca no mundo na bovinocultura, na busca e avanço de tecnologias para melhoria tanto da reprodução quanto da produção dos animais, que levou a constante evolução dos produtos brasileiros.

As biotecnologias utilizadas na reprodução são exemplos dessa situação, trazendo o incremento no desempenho reprodutivo dos rebanhos, pelo aumento da qualidade da carcaça, maior desenvolvimento ponderal, melhores índices reprodutivos, melhoramento na nutrição e utilização dos alimentos, levando-se em conta a qualidade e a segurança da produção com padrão internacional (MILAZZOTTO et al., 2008). Portanto, as várias formas de biotecnologias são inevitáveis no uso de sêmen congelado.

Muito se sabe que após a congelação do sêmen a qualidade fica inferior quando comparada ao sêmen fresco, uma vez que os antioxidantes naturais sofrem estresse oxidativo, ocasionando um desequilíbrio entre produção e neutralização dos radicais livres, resultando na diminuição da qualidade seminal comparada com o sêmen fresco (SAVI et al., 2012).

Na tentativa de minimizar esses prejuízos, antioxidantes vêm sendo utilizados nos meio de congelação de sêmen de várias espécies, inclusive na espécie bovina, com o objetivo de reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio, melhorando a qualidade e resistência da célula espermática ao processo de criopreservação (CASTELINI et al., 2003).

Apesar dos grandes avanços observados, é de suma importância a realização de estudos sobre crioprotetores e demais aditivos como os antioxidantes, a fim de melhorar a viabilidade espermática, visando aumentar o rendimento de doses por ejaculado e as taxas de

<sup>1</sup>Acadêmico de Medicina Veterinária. Universidade Federal da Fronteira Sul. Campus Realeza. Email: [raromatheus@hotmail.com](mailto:raromatheus@hotmail.com) (Bolsista de Iniciação Científica - Edital n° 459/gr/uffrs/2019/UFRS - edital n° 459 de fomento à pós-graduação)

<sup>2</sup> Mestre em Saúde, Bem estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul. Gerente Coopavel. Cascavel-PR. Email: [williamoliveira.vet@gmail.com](mailto:williamoliveira.vet@gmail.com)

<sup>3</sup>Docentes. Curso de Medicina Veterinária. Universidade Federal da Fronteira Sul. Campus Realeza. Email: [marcelo.mota@uffrs.edu.br](mailto:marcelo.mota@uffrs.edu.br) ; [jonatas.cattelam@uffrs.edu.br](mailto:jonatas.cattelam@uffrs.edu.br)

<sup>4</sup>Docente. Orientadora. Curso de Medicina Veterinária. Universidade Federal da Fronteira Sul. Campus Realeza. Email: [adalgiza.neto@uffrs.edu.br](mailto:adalgiza.neto@uffrs.edu.br)



gestação, pois até o momento não existe nada concreto sobre quais são as melhores substâncias e suas quantidades adicionadas aos meios de congelamento.

## 2 Objetivos

Avaliar os efeitos do uso da Vitamina C e/ou Trolox no meio de criopreservação do sêmen sobre a viabilidade de membrana do espermatozoide bovino após criopreservação.

## 3 Metodologia

O estudo foi aprovado para o Comitê de Ética no Uso de Animais, da Universidade Federal da Fronteira Sul – CEUA/UFS, sob protocolo 23205.001354/2018-16, e iniciado na *Alta Genetics* do Brasil Ltda, localizada na BR 050 Km 164, em Uberaba/MG, onde foram realizadas as coletas do sêmen dos animais, avaliações a fresco (Motilidade, Vigor e Concentração), criopreservação e análise HOST.

Após coleta, o sêmen fresco foi submetido a avaliação das condições mínimas necessárias para a criopreservação (CBRA, 2013), sendo que cada amostra seminal foi dividida em quatro tratamentos, acondicionados em criotubos de 5mL, como se segue:

- Grupo I (controle): sêmen diluído sem adição de antioxidante
- Grupo II: sêmen diluído acrescido de 250  $\mu$ M/mL de Vitamina E (Trolox)
- Grupo III: sêmen diluído acrescido de 0,60 mg/mL de Vitamina C
- Grupo IV: sêmen diluído acrescido de 250  $\mu$ M/mL Vitamina E (Trolox) e 0,60 mg/mL Vitamina C

Ainda com o sêmen a fresco foi realizado o Teste Hiposmótico (HOST) para avaliação da integridade funcional da membrana plasmática. Para tal, 20  $\mu$ L de sêmen foi acondicionado em *ependorf* com 250 $\mu$ L de solução hiposmótica (13,5g Frutose, 7,3g Citrato de Sódio em 1L de água destilada) encubado em banho maria a 37°C por 60 minutos. Após esse período, preparou-se uma lâmina com 10 $\mu$ L da solução hiposmótica sobreposta por lamínula, contando-se 200 espermatozoides em diversos quadrantes da lâmina. Espermatozoides com membrana intacta, quando incubados em solução hiposmótica, apresentam influxo de água até atingir o equilíbrio osmótico e, como consequência, a membrana se expande, causando o



enrolamento da cauda de maneira fisiológica. Em espermatozoides com membrana danificada, essa reação não ocorre (JEYENDRAN et al., 1984). Dessa forma, quantificou-se a porcentagem de espermatozoides intactos no sêmen fresco. De maneira semelhante, após descongelamento, o sêmen foi submetido a análise de resistência osmótica (HOST), sendo quantificados os espermatozoides normais, aqueles com cauda dobrada/enrolada.

A reação é baseada no princípio que o líquido flui através das membranas celulares, e em caso de exposição do espermatozóide a soluções hiposmóticas, os bioquimicamente ativos aumentam seu volume, a fim de estabelecer o equilíbrio entre o fluido do compartimento intracelular com o extracelular, culminando no dobramento da cauda, sendo os espermatozóides que reproduzem menos escores de enrolamento de cauda no HOST podem apresentar disfunções da cabeça, peça intermediária, proteínas da cauda e da motilidade, com queda na fertilidade (JAYENDRAN et al., 1984).

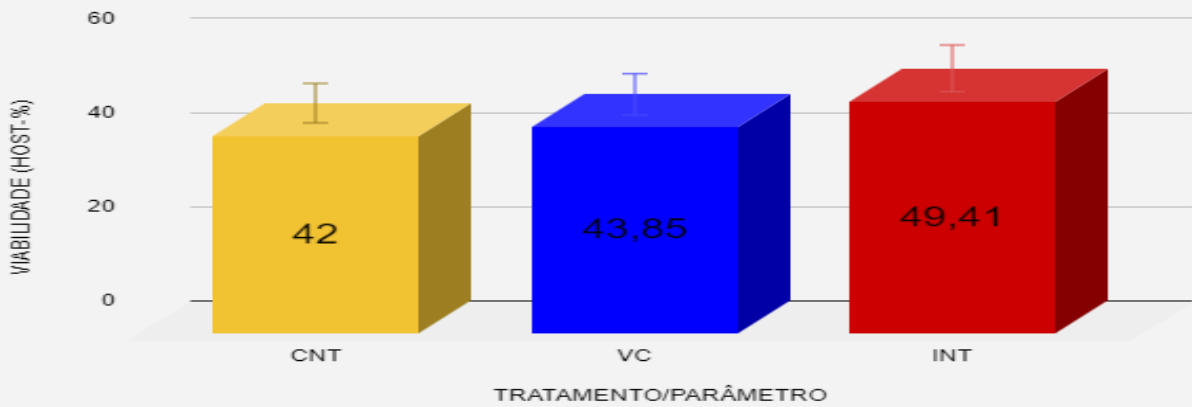
#### **4 Resultados e Discussão**

Na avaliação feita de viabilidade dos espermatozoides criopreservados, através da integridade da membrana plasmática pelo HOST, a combinação entre as Vitaminas C e Trolox apresentou resultado superior ( $p < 0,05$ ) em relação ao uso de vitamina C ou sem adição de antioxidante, que apresentaram desempenho semelhante, sendo de 49,41%, 43,85% e 42%, respectivamente (Gráfico 1). A adição de Vitamina C também não interferiu na viabilidade espermática quando comparada a adição de Trolox ( $p > 0,05$ ).

#### **5 Conclusão**

O uso das Vitaminas C e Trolox, associadas ao meio de criopreservação, levou a resultados significativos sobre a viabilidade espermática através da avaliação hiposmótica (HOST). No entanto, avaliações complementares e futuras serão desenvolvidas nesse estudo, capazes de subsidiar a recomendação concreta do acréscimo desses aditivos ao meio crioprotetor do sêmen bovino criopreservado na tentativa de aumentar a fertilidade após seu uso em biotécnicas de reprodução animal visando, aumentar o potencial produtivo do rebanho bovino.

Gráfico 1. Parâmetros seminais após criopreservação do sêmen de bovinos, avaliados pelo Teste Hiposmótico (HOST)



CNT: tratamento controle; VC: tratamento com adição de Vitamina C; INT: tratamento com adição de Vitaminas C e Trolox.

## Referências

CASTELLINI, C., LATTAIOLI, P., DAL BOSCO, A., MINELLI, A., MUGNAI, C. Oxidative status and semen characteristics of rabbit buck as affected by dietary vitamin E, C and n-3 fatty acids. **Reproduction Nutrition and Development**, v. 43, n. 1, p. 91-103, 2003.

MILAZZOTTO, P., VISINTIN, J. A., ASSUMPÇÃO, M. O. E. D. Biotecnologias da reprodução animal: biologia molecular aplicada à biotecnologia. **Ciências Veterinária nos trópicos**. v.11, p:145-148, 2008.

SAVI, P. A. P., VICENTE, W. R. R., BORGES, J. C., MARTINS, M. I. M. **Uso de antioxidantes no meio diluente Tris para refrigeração e congelação de células espermáticas provenientes de epidídimo de cães submetidos à orquiectomia eletiva**. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal. 78f. São Paulo, 2012.

MELO, M. I. V., HENRY, M., BEKER, A. R. C. L. Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen equino resfriado com diferentes diluidores. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. vol.57 no.6, 2005.

JEYENDRAN, R. S., VAN DER VEM, H. H., PEREZ-PELAEZ, M., CRABO, B. G., ZANEVELD, L. J. D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.70, p.219-228, 1984.

**Palavras-chave:** Espermatozoide. Vitamina. Estresse Oxidativo. Integridade de Membrana.

## Financiamento

Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação

Universidade Federal da Fronteira Sul