

AVALIAÇÃO DA FERTILIDADE DE SÊMEN FRESCO E CRIOPRESERVADO PARA A PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO*

Beatriz Barbosa Coutinho¹ (IC)*, Klayto Jose Gonçalves dos Santos ² (PQ), Aracele Pales do Santos ²(PQ), Pedro Henrique Souza Ramos ¹ (IC), Thaelly Nunes do Amaral ¹(IC), Lourrany Eduardo Souza ¹(IC), Jaqueline Ferreira Daniel Santos³ (IC), Joyce Caroliny dos Santos Lopes ³(IC)

¹Discente do curso de Zootecnia e bolsista PBIC- Universidade Estadual de Goiás, Câmpus São Luís de Montes Belos, Rua da Saudade, 56 - Vila Eduarda, São Luís de Montes Belos - GO, 76100-000.

²Docente do curso de Zootecnia- UEG - câmpus São Luís de Montes Belos

³Discente Pós-Graduação Stricto Senso Mestrado em Desenvolvimento Rural e Sustentável

* biiacoutinho@hotmail.com

Resumo: O desenvolvimento de biotecnologias da reprodução pode contribuir enormemente com os programas de melhoramento genético animal. O objetivo deste estudo foi avaliar e correlacionar através de análises *in vitro* características fisiológicas e estruturais dos espermatozoides frescos e criopreservados em diferentes meios diluentes, correlacionando os resultados das análises com touros de alta e baixa fertilidade *in vivo* e *in vitro*. Foram utilizados oito touros da raça Holandesa sexualmente maduros. Os ejaculados de cada touro foram coletados por eletroejaculação, utilizando apenas os ejaculados com motilidade >70% e anormalidades morfológicas <30%. Após a coleta, cada ejaculado foi dividido em duas frações. Uma fração, a fresco, utilizada para avaliação da cinética espermática e a outra fração foi congelada, sendo diluída 1:1 com a fração I (sem glicerol) dos diluentes TRIS-gema e BotuBov Egg Free®, sendo refrigeradas à 4°C por 90 min. Portanto pode -se concluir que o sêmen fresco apresenta melhor viabilidade que o sêmen congelado e o TRIS-gema apresentou melhor viabilidade que o BotuBov na diluição a fresco quanto na congelação de sêmen.

Palavras-chave: Congelamento Sêmen. Diluente. Motilidade espermática. Sêmen fresco.

Introdução

O desenvolvimento de biotecnologias da reprodução pode contribuir enormemente com os programas de melhoramento animal (FRANCO e MELO, 2006). Dentre estas, a inseminação artificial (IA) é de grande importância na agroindústria por ser de mais fácil acesso à maioria dos produtores, tendo como principal objetivo reproduzir uma genética mais valiosa, além de melhorar o desempenho reprodutivo do rebanho, diminuindo o intervalo entre partos (IEP).

Nota-se então, a importância da difusão desta e de outras biotecnologias

reprodutivas para a região, visto que o emprego da IA com sêmen de touros provados geneticamente tem o objetivo de melhorar a eficiência reprodutiva, com consequente aumento na produção de bezerros de qualidade e na rentabilidade da propriedade rural.

Entretanto, embora a técnica da IA tenha surgido na década de 70, ainda existem inúmeros estudos com a finalidade de aumentar sua eficiência. Entre estes estudos, podemos citar os relacionados à avaliação da qualidade seminal e a sua fertilidade pós-descongelamento, uma vez que os danos ocasionados pela criopreservação causam prejuízos das funções celulares, resultando em redução da fertilidade (ARRUDA et al., 2011).

Logo, a interação entre as células espermáticas e o meio diluidor representa um fator crucial para a preservação da integridade espermática e habilidade de fecundação (MANJUNATH et al., 2002). Portanto, um meio diluente eficaz tem como finalidade de proteger a célula espermática durante as alterações térmicas na congelação/descongelação.

Diante disto, os avanços em avaliações estruturais e funcionais dos espermatozoides têm tido grande utilidade para excluir amostras de sêmen de baixa qualidade, no entanto, apontar dentre os animais quais os mais aptos a proporcionar as maiores taxas de prenhez, ainda é um grande desafio (ARRUDA et al., 2010).

Portanto, obter resultados através de uma associação de diferentes avaliações espermáticas e desta forma utilizá-los na pré-seleção de animais de alta fertilidade *in vivo*, e assim possibilitar o uso destes animais na IA, possibilitaria obter melhores índices na taxa de prenhez, diminuindo o IEP. Isso causaria diminuição dos custos, popularizando o uso da IA aos produtores.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar e correlacionar através de análises *in vitro* características fisiológicas e estruturais dos espermatozoides frescos e criopreservados em diferentes meios diluentes, correlacionando os resultados das análises com touros de alta e baixa fertilidade *in vivo* e *in vitro*.

Material e Métodos

O estudo foi realizado no laboratório da Universidade Estadual de Goiás

localizado no município de São Luís de Montes Belos e em propriedades rurais do município. Foram utilizados oito touros da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*) sexualmente maduros.

Os ejaculados de cada touro foram coletados por eletroejaculação, utilizando apenas os ejaculados com motilidade >70% e anormalidades morfológicas <30%.

Após a coleta, cada ejaculado foi dividido em duas frações, uma fração, a fresco, utilizada para avaliação da cinética espermática e a outra fração foi congelada, sendo diluída 1:1 com a fração I (sem glicerol) dos diluentes TRIS-gema e BotuBov Egg Free® (constituído de lecitina de soja), sendo refrigeradas à 4°C por 90 min.

Para avaliar as diferenças entre os meios diluentes foi acrescidas nas amostras 50% do volume com as respectivas frações II dos diluentes (com 13% de glicerol) padronizando a concentração final em 30×10^6 espermatozóides viáveis (adotando a motilidade espermática como critério), envasadas em palhetas de 0,5mL devidamente identificados os grupos e lacradas com álcool polivinílico. Posteriormente congeladas em máquina de congelação TK 4000 compacta (TK, Uberaba, MG, Brasil). Ao final do programa de congelação, todas as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido.

Parte do ejaculado que foi congelado, foi descongelado para produção de embriões *in vitro*, outra parte foi avaliada quanto a cinética espermática pelo CASA, integridade das membranas espermáticas, capacitação e potencial de membrana mitocondrial por Citometria de fluxo, teste de termorresistência (TTR) e taxa de prenhez por inseminação artificial.

Resultados e Discussão

Os resultados referentes às análises de congelamento em comum para o experimento estão mostrados na TABELA 1. Houve perda da motilidade progressiva (MP) verificada imediatamente após a colheita e após congelação ($P < 0,05$).

Para os experimentos a adição do meio diluente utilizado após centrifugação resultou em perda da MP, diferindo entre os tratamentos ($P<0,05$).

O vigor não foi alterado nos tratamentos utilizando os meios diluentes após congelamento, mas sim comparado o sêmen fresco com congelado ($P<0,05$).

Verificou-se queda acentuada no percentual de células reativas ao teste hiposmótico (HO) entre as amostras avaliadas imediatamente após a colheita ou refrigeração passiva.

A redução do pH foi acentuada entre os tratamentos, tanto nas amostras processadas imediatamente após a colheita quanto aquelas congeladas ($P<0,05$).

TABELA 1 – Resultados das análises do sêmen utilizando TRIS-gema e BotuBov

	TTM	Mot (%)	Vigor	Vivos (%)
Sêmen Fresco		70,7 ± 5,9^a	4 ± 0,5^a	76,5 ± 7,8^a
	1	66,0 ± 5,5 ^A	4 ± 0,5 ^A	
	2	66,7 ± 5,8 ^A	4 ± 0,5 ^A	
	3	50,0 ± 8,2 ^B	3 ± 0,5 ^B	
Sêmen congelado		51,8 ± 4,0^b	3 ± 0,5^a	76,6 ± 8,1^a
	1	53,3 ± 11,5 ¹	3 ± 0,6 ^a	
	2	50,0 ± 17,3 ¹	3 ± 0,6 ^{ab}	
	3	40,0 ± 10,0 ¹²	3 ± 0,0 ^{ab}	

Letras minúsculas, maiúsculas e números diferentes na mesma coluna indicam diferenças ($P<0,05$).

Considerações Finais

Diante do presente estudo, conclui-se que o sêmen fresco apresenta melhor viabilidade que o sêmen congelado nas variáveis estudadas e TRIS-gema apresentou melhor desempenho principalmente na avaliação do vigor;

Agradecimentos

Agradecimento a Universidade Estadual de Goiás por ter disponibilizado a fazenda

escola para que fosse realizado o experimento e ao Professor Klayto pela oportunidade de participar do projeto contribuindo com meu crescimento profissional.

Referências

ARRUDA, R. L.; ORROS, I. R.; PASSOS, T. S.; COSTA E SILVA, E. V.; ZÚCARI, C. E. S. N. Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros. **Rev Bras Reprod Anim**, 34:168-184, 2010.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.; JAIMES, J. D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, 35: 145-151, 2011.

FRANCO, M. M.; MELO, E. O. Melhoramento animal: o uso de marcadores moleculares e da reprodução assistida. **Documentos Embrapa**, v. 188, 2006.

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biol Reprod** 67:1250-1258, 2002.