

UNIVERSIDADE DE UBERABA
JOÃO PEDRO BRANDÃO ZANDONAIDE

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE HIDROXIETILAMIDO EM DILUIDOR
COMERCIAL NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN BOVINO

UBERABA, MG

2018

JOÃO PEDRO BRANDÃO ZANDONAIDE

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE HIDROXIETILAMIDO EM DILUIDOR
COMERCIAL NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN BOVINO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Orientador: Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos.

UBERABA, MG

2018

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

Z15e	<p>Zandonaide, João Pedro Brandão. Efeito da suplementação de hidroxietilamido em diluidor comercial na criopreservação do sêmen bovino / João Pedro Brandão Zandonaide. – Uberaba, 2018. 49 f. : il. color.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária, concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação. Orientador: Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos.</p> <p>1. Inseminação artificial. 2. Espermatozoides. 3. Bovino. I. Vasconcelos, André Belico. II. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária. III. Título.</p> <p>CDD 636.08245</p>
------	--

JOÃO PEDRO BRANDÃO ZANDONAIDE

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE HIDROXIETILAMIDO EM DILUIDOR
COMERCIAL NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN BOVINO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Área de concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos

Aprovada em: 23/02/2018

BANCA EXAMINADORA:


Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos - Orientador
Universidade de Uberaba


Prof. Dr. Mauricio Scoton Igarasi
Universidade de Uberaba


Prof. Dr. André Luis Teixeira Fernandes
PPGEQ

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela minha vida e saúde.

Gostaria de agradecer aos meus pais Pedro e Ana Claudia que sempre estiveram presentes na minha educação e formação pessoal fazendo com que me tornasse um homem de bem, o que com certeza fez com que portas se abrissem em minha vida.

Aos meus avós Pedro, Olímpia, Lenine e Sônia.

Aos meus irmãos Ana Carolina, Ana Gabriela e Pedro Henrique, a minha namorada Mariana, por sempre me apoiarem e incentivarem.

A todos os meus amigos e em especial a Heber, que infelizmente não está mais conosco, mas com certeza olha por nós.

Ao meu orientador André Belico de Vasconcelos, por todos os anos em que trabalhamos juntos, pela amizade, convívio, ensinamentos, incentivos e por ter tido grande influencia nas decisões em que tomei e que me fizeram chegar até aqui.

A empresa Alta Genetics do Brasil, por fazer possível grande parte da experimentação com disponibilidade das instalações, equipamentos e a coleta de amostras. A todos os colaboradores da empresa que de alguma maneira me auxiliaram neste trabalho, em especial Dr. Luís Deragon, Dr. Neimar Correa Severo, Dra. Solange, Romulo Santos e Alexander Veludo.

Ao laboratório Biovitro e todos seus colaboradores que apoiaram e deram o suporte necessário para que este trabalho fosse realizado.

A Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa René Rachou e aos profissionais professores Olindo Assis Martins Filho e Marcio Sobreira Sílvia Araújo pelo apoio.

A Universidade de Uberaba pela minha formação profissional, e a todos os professores e funcionários que se fizeram presentes.

A fundação CAPES pela concessão de bolsa durante o programa de mestrado.

*Nada te perturbe, nada te amedronte.
Tudo passa, a paciência tudo alcança.
A quem tem Deus nada falta.
Só Deus basta!*

Santa Tereza D'Ávila

RESUMO

No intuito de melhorar os índices de viabilidade espermática e consequentemente os resultados da inseminação artificial, empresas e pesquisadores buscam por melhores protocolos de congelamento, meios de crioproteção e diluição. Devido a relatos da utilização do hidroxietilamido na criopreservação de outros tipos celulares, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito da adição do hidroxietilamido (HEA) em meio diluidor comercial, buscando maior eficiência da amostra espermática pós-descongelamento. Foram utilizados 3 ejaculados de 10 animais da raça nelore (n=30). Os ejaculados foram divididos em sete tratamentos para congelamento, que delimitaram-se em grupo controle 0% (apenas diluidor Tryladil) e as respectivas inclusões de 0,6%, 1,5%, 2%, 3%, 5% e 10% de hidroxietilamido, ao mesmo diluidor. O sêmen a fresco e o congelado com HEA foram avaliados quanto a motilidade, vigor, integridade de membrana (Eosina), funcionalidade de membrana (HOST). Para o sêmen congelado, o grupo controle e as três melhores inclusões de HEA foram avaliados quanto a taxa de clivagem (D3) e a taxa de embriões (D7), pós-fertilização *in vitro*. A média dos parâmetros do sêmen fresco versus o descongelado (controle) para motilidade (65,8±4,6; 47,5±7,2), integridade (87,2%; 67,8%) e funcionalidade de membrana (70,4%; 41,3%), utilizando somente o diluidor Tryladil, foram estatisticamente significativas. Quanto a avaliação entre o diluidor com Tryladil (controle) versus os tratamentos com inclusão de HEA (0,6%, 1,5% e 2%) não apresentaram diferença estatística, para os parâmetros motilidade (47,5±7,2; 42,5±6,5; 35,7±8,9; 41,3±6,7) e integridade de membrana (67,8±9,3; 66,4±9,8; 64,1±10,1; 66,4±10,6). Também não ocorreu diferença estatística na taxa de clivagem e de embriões para os tratamentos com inclusão de HEA (0,6%, 1,5% e 2%), quando comparado ao controle (Tryladil) (55,4%; 53,2% e 53,3% e 51,4%); (19,1%; 28,6%; 22,6% e 19,4%). Concluiu-se que a adição do HEA ao meio Tryladil não promoveu melhora nos parâmetros do sêmen descongelado, como também não alterou a taxa de clivagem e produção e embriões. Todavia em concentrações acima de 2% ocorre uma redução da viabilidade do sêmen congelado.

Palavras Chaves: Inseminação, espermatozoide, bovino.

ABSTRACT

In order to improve the rates of sperm viability and consequently the results of artificial insemination, companies and researchers are looking for better freezing protocols, cryoprotection and dilution media. Due to reports of the use of hydroxyethyl starch in the cryopreservation of other cell types, the objective of the study was to evaluate the effect of the addition of hydroxyethyl starch (HEA) in commercial diluent medium, seeking greater efficiency of the post-thaw sperm sample. Three ejaculates of 10 Nelore animals (n = 30) were used. The ejaculates were divided into seven treatments for freezing, which were delimited in the control group 0% (Tryladil diluent only) and the respective inclusions of 0.6%, 1.5%, 2%, 3%, 5% and 10% of hydroxyethyl starch, at the same diluent. Fresh and frozen semen with HEA were evaluated for motility, vigor, membrane integrity (Eosin), membrane functionality (HOST). For frozen semen, the control group and the three best HEA inclusions were evaluated for cleavage rate (D3) and embryo rate (D7), post-fertilization in vitro. The mean of the fresh versus thawed semen parameters (control) for motility (65.8 ± 4.6 , 47.5 ± 7.2), integrity (87.2%, 67.8%) and membrane functionality (70.4%, 41.3%), using only the diluent Tryladil, were statistically significant. As for the evaluation between the diluent with Tryladil (control) versus treatments with inclusion of HEA (0.6%, 1.5% and 2%) did not present statistical difference, for the parameters motility (47.5 ± 7.2 ; 42.5 ± 6.5 , 35.7 ± 8.9 , 41.3 ± 6.7) and membrane integrity (67.8 ± 9.3 , 66.4 ± 9.8 , 64.1 ± 10 , 1: 66.4 ± 10.6). There was also no statistical difference in the cleavage rate and embryos for treatments with HEA inclusion (0.6%, 1.5% and 2%) when compared to the control group (Tryladil) (55.4%, 53.2% and 53.3% and 51.4%); (19.1%, 28.6%, 22.6% and 19.4%). It was concluded that the addition of HEA to Tryladil did not improve the parameters of thawed semen, nor did it alter the rate of cleavage and production and embryos. However, in concentrations above 2%, a reduction in the viability of frozen semen occurs.

Key Words: Insemination, spermatozoa, bovine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Detalhamento do espermatozoide, cabeça, peça intermediária. Fonte [Modificado Andrologia Básica, (Henry, Echeverri, 2013)].----- 15
- Figura 2 - Fluxograma do Protocolo Experimental: coleta de sêmen com preparação dos tratamentos para congelamento, descongelamento a 37°C por 30 segundos para avaliações espermáticas e para a fertilização in vitro. ----- 27
- Figura 3 – Fluxograma da produção in vitro de embriões, com utilização de ~70 oócitos para cada tratamento e pool de 3 ejaculados do mesmo animal. ----- 31
- Figura 4 - Efeito da criopreservação na motilidade (A); vigor (B); Integridade de membrana Eosina (C) e funcionalidade de membrana Host (D). Descongelado foi definido como grupo controle. Os resultados são expressos pela média e desvio padrão. ----- 33
- Figura 5- Análise experimental dos testes de fertilização in vitro. A) porcentagem da taxa de clivagem D3; B) porcentagem de embrião em D7. ----- 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diluição da solução crioprotetora em função dos tratamentos estudados.---	28
Tabela 2 - Avaliação da motilidade e vigor do espermatozoide bovino, pós congelamento. -----	35
Tabela 3 - Avaliação da integridade (IM) e funcionalidade (FM) da membrana plasmática do espermatozoide Bovino, pós congelamento.-----	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

x	Vezes
%	Porcentagem
µl	Microlitros
°C	Graus Celsius
µm	Micrometro
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
CIV	Cultivo <i>In Vitro</i>
D3	Dia 3
D7	Dia 7
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FM	Funcionalidade de membrana
HEA	Hidroxietilamido
IM	Integridade de membrana
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MP	Membrana plasmática
mL	Mililitro
pH	Potencial Hidrogeniônico
RNA	Ácido Ribonucleico

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO-----	13
2.REVISÃO DE LITERATURA -----	15
2.1.Estrutura espermática -----	15
2.2.Criopreservação-----	17
2.3.Diluidores (Crioprotetor)-----	18
2.3.1.Hidroxietilamido -----	19
2.4.Curva de resfriamento e congelamento-----	20
2.5.Avaliações Espermáticas -----	20
2.5.1.Motilidade-----	20
2.5.2.Integridade de membrana -----	21
2.5.3.Funcionalidade de membrana -----	21
2.6.Fertilização in vitro (FIV)-----	22
3.OBJETIVO -----	24
3.1.Objetivo Geral -----	24
3.2.Objetivos Específicos -----	24
4.MATERIAIS E MÉTODOS -----	25
4.1.Declaração ética -----	25
4.2. Pré- Experimento -----	25
4.3.Reagentes -----	25
4.4.Número de animais e coleta das amostras -----	25
4.5.Sanidade animal -----	26
4.6.Parâmetros espermáticos analisados -----	26
4.7.Fluxograma do Experimento-----	27
4.8.Preparação espermática-----	28
4.8.1.Procedimento de congelamento-descongelamento -----	28
4.8.1.1.Do congelamento -----	28

4.8.1.2.Do descongelamento -----	29
4.9.Avaliações -----	29
4.9.1.Volume -----	29
4.9.2.Concentração-----	29
4.9.3.Motilidade e Vigor -----	29
4.9.4.Integridade de membrana (Eosina) -----	29
4.9.5.Funcionalidade de membrana (HOST)-----	30
4.9.6.Produção in vitro de embriões (PIV) -----	30
4.9.7 Fluxograma produção in vitro de embriões (PIV)-----	31
4. 10.Análise estatística -----	32
5.RESULTADO E DISCUSSÃO-----	33
5.1. Sêmen Fresco versus Sêmen Congelado (Tryladil)-----	33
5.2. Sêmen Congelado (Tryladil) versus Sêmen Congelado (Tryladil mais HEA)---	35
5.3. Avaliação da Taxa de clivagem e taxa de embriões -----	38
6.CONCLUSÃO -----	40
REFERÊNCIA -----	41
ANEXO I-----	47
ANEXO II-----	48
ANEXO III-----	49
ANEXO IV -----	50

1.INTRODUÇÃO

A inseminação artificial cresce e difunde-se de maneira progressiva no Brasil, o que leva ao crescimento do mercado de sêmen. De acordo com dados (2001 a 2014) da ASBIA (Associação Brasileira de Inseminação Artificial) foram comercializadas aproximadamente 13 milhões de doses em 2014, o que comparado ao ano de 1981 (1,5 milhões) representa um crescimento de 860%.

Este aumento na comercialização de sêmen deve-se as vantagens da utilização da inseminação artificial tais como: melhoramento genético, controle de doenças, controle zootécnico e padronização de rebanho, gerando maiores benefícios para cadeia produtiva de proteína animal.

Devido ao crescimento populacional, é necessário que a produção de proteína animal como fonte de alimento seja proporcional à demanda, e isso implica o aumento da comercialização de sêmen bovino trazendo perspectivas futuras positivas para este mercado (TILMAN et al., 2002).

Para atender às necessidades do mercado pecuário com qualidade, as empresas de produção e distribuição de sêmen juntamente com instituições de pesquisa, buscam o aprimoramento dos procedimentos envolvidos desde a coleta até a inseminação.

Dentro destas etapas, pode-se destacar o processo de criogenia que envolve a preservação do espermatozoide bovino. Mesmo apresentando grande complexidade, diversos grupos de pesquisa tem buscado aumentar a viabilidade espermática, alterando o meio de preservação e a curva de congelamento (SILVA et al., 2017; ABDUSSAMAD et al., 2015; DUARTE JUNIOR et al., 2016).

O congelamento de sêmen bovino já é bem estabelecido, porém como relatado por Watson (1985), há perdas de 40% a 50% da qualidade espermática, exigindo pesquisas voltadas para o aperfeiçoamento ou desenvolvimento de novos crioprotetores com intuito de aumentar a eficiência desta técnica.

O tema deste estudo é amplo e possui várias vertentes de pesquisas, o que pode ser explicado devido à grande quantidade de variáveis envolvidas. Estas variáveis constituem-se de eficiência de crioprotetores, diferença entre ejaculados (indivíduos), métodos de coleta, armazenagem, resfriamento, diluições, envase, entre outros.

Embora haja a presença de tantas variáveis, neste estudo destacou-se a importância do crioprotetor, o que não dispensa à importância das outras variáveis que são extremamente ligadas à eficiência do mesmo.

Apesar da existência de muitos crioprotetores e protocolos de congelamento, o estudo optou pela utilização do protocolo realizado pela empresa Alta Genetics do Brasil.

Autores relatam o uso desta substância para criopreservação de células e as possíveis interações que a mesma pode causar para promover um efeito positivo no congelamento, portanto o objetivo do projeto baseia-se em avaliar a capacidade crioprotetora do aditivo hidroxietilamido em diferentes concentrações, associado com o diluidor Tryladil®.

2.REVISÃO DE LITERATURA

2.1.Estrutura espermática

Os espermatozoides são formados dentro dos túbulos seminíferos dos testículos apresentando-se como células alongadas e haplóides. São constituídos de uma cabeça contendo o núcleo e uma estrutura chamada acrossoma e cauda (flagelo) que possui estruturas responsáveis pela motilidade celular (HAFEZ, 2004) (Figura 1).

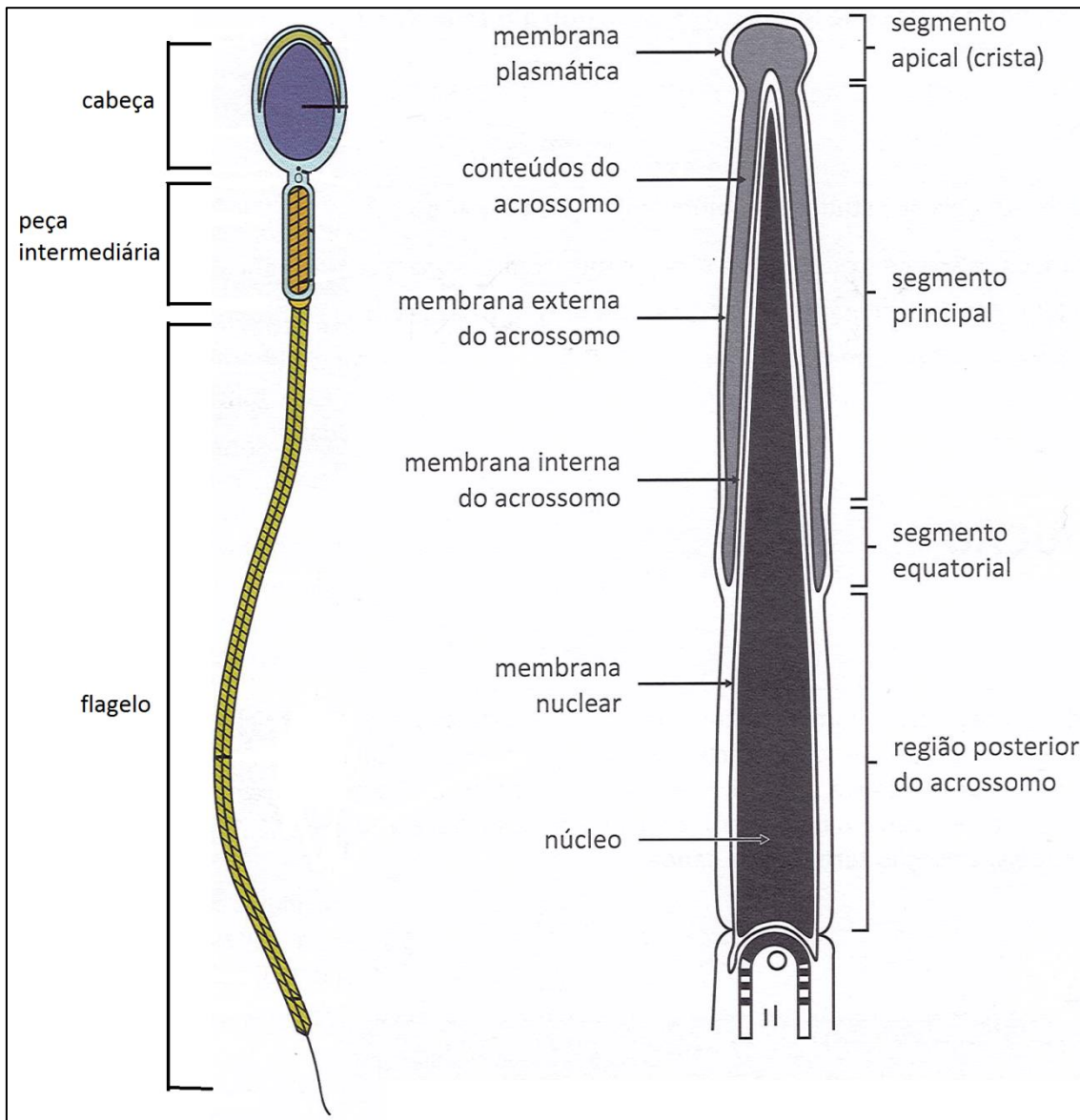


Figura 1 - Detalhamento do espermatozoide, cabeça, peça intermediária.Fonte [Modificado Andrologia Básica, Henry 2013].

O flagelo é composto pela peça intermediária, principal e terminal. Internamente é constituído pelo axonema, uma estrutura especializada do citoesqueleto, responsável

pela motilidade espermática. As mitocôndrias são os geradores de energia da célula espermática e se encontram na peça intermediária (HAFEZ, 2004).

A célula espermática é recoberta externamente, por toda sua extensão, por uma membrana plasmática (MP) (CELEGHINI, 2005), porém também é composta por outras membranas como a acrossomal, nuclear e mitocondrial que são compostas de agregados lipídicos e proteínas construídas durante a espermatogênese.

Durante o trânsito e armazenamento no epidídimo, essas sofrem modificações na qual é chamada maturação espermática. Estas mudanças funcionais implicam na maturação de organelas celulares, habilidade de movimentar-se e de se ligar a zona pelúcida (OLIVARES, 2013).

A membrana plasmática é organizada em um mosaico fluido no qual é formada por uma bicamada lipídica, proteínas integrais e periféricas. Estas proteínas são responsáveis pelo transporte de substratos energéticos como frutose e glicose essenciais para a produção de Adenosina Tri-Fosfato (ATP), na via glicolítica (SILVA, GADELLA, 2006).

O colesterol presente na membrana plasmática (MP) possui papel importante na estabilização e fluidez da bicamada lipídica, sendo influenciada pelas diferenças de temperaturas, nas quais determinam o grau de instabilidade ou não das camadas lipídicas (AMORIN, 2008).

A função das membranas está relacionada com seus vários componentes (proteínas, lipídeos), e com a interação entre eles, desse modo, alguns acontecimentos como variação de pH, formação de radicais livres, podem promover a modificação dessa relação e diminuir a capacidade fecundante do espermatozoide (HAFEZ, 2004; FLESCH, GADELLA, 2000).

O acrossomo está localizado na extremidade anterior da cabeça entre o lado interno da membrana plasmática e o núcleo. É composto de uma membrana externa e uma interna, e uma cavidade formada pelas mesmas que armazena enzimas e substâncias de grande importância no momento da fertilização (HENRY, ECHEVERRI, 2013).

A membrana nuclear ou envelope nuclear tem o papel de separar o material genético (DNA) do citoplasma celular e é composto por duas membranas, uma externa e

uma interna, onde estão presentes estruturas proteicas responsáveis pelo transporte de outras proteínas de expressão gênica (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2013).

Semelhante à constituição da membrana nuclear, a membrana mitocondrial também possui duas camadas, porém a camada interna possui vários dobramentos também conhecidos como as cristas mitocondriais, na qual possui substância rica em DNA, RNA, ribossomos e enzimas nas quais são responsáveis pela produção de ATP (ALBERTS et al., 2004).

2.2.Criopreservação

A criopreservação tem o intuito de manter as características naturais da célula espermática garantindo que a mesma permaneça com adequada capacidade de fecundação pós-descongelamento. Este processo permite que as biotecnologias da reprodução sejam amplamente utilizadas e aprimoradas, pois assegura um transporte facilitado e com validade prolongada quando armazenado corretamente (HOLT, 2000).

Os desafios da criopreservação de sêmen estão ligados a fatores como interação da célula espermática com o diluidor, promovendo o estresse osmótico, a formação de cristais de gelo, e a instabilidade das membranas, causada pelas curvas de resfriamento e congelamento, fatores estes que podem ser deletérios sobre as funções de produção de energia, movimentação flagelar e penetração do espermatozoide no oócito (CELEGHINI, 2005).

No resfriamento existem efeitos de mudança de fase dos lipídios de membrana, redução da atividade da bomba sódio e precipitação de substâncias, o que pode causar mudanças de pH, promovendo a diminuição da viabilidade celular (DE SANTIS, PRATA, 2009).

Outros efeitos causados na célula pelo congelamento estão diretamente ligados a composição das membranas, conteúdo celular de sais, interação osmótica entre célula e os meios que estão em seu contato, estas características determinam a permeabilidade da membrana e a entrada de água e eletrólitos (MERYMAN, 1971).

O controle de entrada e saída de água e eletrólitos são fundamentais para a viabilidade espermática, pois estas sofrem basicamente dois tipos de lesões: a desidratação e o dano mecânico pela formação de cristais de gelo intracelular. Essas lesões estão correlacionadas respectivamente por baixa e alta velocidade de

congelamento e ambas pela composição do soluto em que está presente no diluidor (DE SANTIS, PRATA, 2009).

2.3. Diluidores (Crioprotetor)

Uma das funções do diluidor é de retirar a água presente no compartimento intracelular por diferença de osmolaridade, pois ao congelar, em temperaturas entre -5° a -15°C , ocorre aumento da concentração de solutos do compartimento externo mobilizando a água do meio intra para o extracelular impedindo que, durante a fase de congelamento, haja formação de cristais de gelo intracelulares que lesionam a célula e provocam sua morte (ARRUDA et al., 2010).

Os constituintes básicos dos diluidores são substâncias energéticas, crioprotetoras, soluções tampões e antibióticos. Estes são classificados como crioprotetores penetrantes e não penetrantes que também são conhecidos como intracelulares e extracelulares, respectivamente. Dentre os crioprotetores mais utilizados na prática de conservação do sêmen durante o congelamento estão o glicerol, gema de ovo e leite (SILVA, GUERRA, 2011).

Um dos crioprotetores penetrantes de maior relevância é o glicerol, uma molécula pequena capaz de atravessar a membrana plasmática com ação solvente dentro da célula proporcionando a retirada de água intracelular e, por possuir ponto de congelamento mais baixo que a água, minimiza a formação de cristais de gelo intracelulares e conseqüentemente a morte da célula (CASTRO, CARVALHO, SILVA, 2011).

Já as macromoléculas por não conseguirem atravessar a membrana plasmática são chamadas de crioprotetores não penetrantes, e têm ação de soluto, pois atuam no meio extracelular efetuando mudanças osmóticas, o que afeta o movimento de água do meio intra para o extraelular. São exemplos de crioproterores não penetrantes a gema de ovo, leite desnatado e outros açúcares (CELEGHINI, 2005).

Outro fator a ser considerado para com os diluidores e suas moléculas constituintes é a toxicidade que essas podem causar ao espermatozoide, pois levam a danos bioquímicos sobre os componentes celulares, como a desnaturação de proteínas (RATES, 2015), o que pode impedir seu pleno funcionamento (WATSON, 2000).

O estresse osmótico também é um fator a ser considerado na criopreservação celular (MERYMAN, 1971), pois pode causar danos a motilidade e viabilidade espermática (MOSTEK et al., 2017).

Os diluidores possuem papel importantíssimo para que este fenômeno não prejudique a célula. Este estresse ocorre devido a um desequilíbrio osmótico em que a velocidade, e quantidade de reposição de volume se tornam inadequadas, causando um exagerado influxo de líquido extracelular promovendo o rompimento da membrana plasmática e por sua vez a morte celular (SOARES, 2010).

2.3.1.Hidroxiethylamido

O hidroxietilamido (HEA) é um polissacarídeo formado por cadeias ramificadas e esféricas de glicose o que o torna muito parecido com o glicogênio. É encontrado comercialmente apresentando diversos pesos moleculares estes que variam de 1-200 x 10⁴(DE SANTIS, PRATA, 2009).

Esta molécula é obtida da amilopectina de alto peso molecular extraída do milho. Conhecidas também como soluções coloides são amplamente utilizadas na medicina humana no tratamento e prevenção de hipovolemias, choques, lesões, infecções e queimaduras quando a expansão do volume plasmático é desejada (REGALIN et al., 2010).

Inicialmente descrito por Lioneti (1978), o uso da combinação do HEA 6% e DMSO (Dimetilsufóxido) 5% obteve sucesso na criopreservação de granulócitos chegando a resultados de recuperação de 72% a 101% destas células, e com viabilidade, utilizando azul de tripan, de 84% a 89%.

Posteriormente, Stiff (1987) confirmou a eficácia das duas substâncias misturadas com recuperação de célula pós-descongelamento de 102%±13% e viabilidade celular utilizando-se também o corante azul de tripan 70%±5% para células congeladas a – 80 °C de 12 a 16 meses.

De acordo com De Santis e Prata (2009), o HEA é denominado de crioprotetor não penetrante. Esta denominação dá-se devido ao tamanho de sua molécula que não consegue se difundir para o interior das células. Os efeitos crioprotetores do HEA não são elucidados por completo, mas a hipótese de que este juntamente com um crioprotetor penetrante (evitar a desidratação celular), tenha um efeito de vitrificação do

meio extracelular formando uma capa protetora contra as lesões que os cristais de gelo formados pelo congelamento podem causar.

2.4. Curva de resfriamento e congelamento

Logo após a adição do meio diluidor começa mais uma etapa do processo de criopreservação, o resfriamento. É neste momento que a atividade metabólica das células espermáticas diminui para se iniciar então o congelamento (CELEGHINI, 2005).

As células rapidamente resfriadas podem sofrer choque térmico, um conjunto de alterações que ocorrem em mudanças bruscas de temperatura. Este fenômeno tem efeito negativo sobre a célula espermática podendo causar redução da motilidade espermática, movimentos circulares, perda de conteúdo intracelular, danos ao acrossoma e membrana plasmática (GRAHAM, 1996).

Durante o congelamento realizado com nitrogênio líquido, a célula alcança a temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, até chegar a este limiar, a exposição a variações de temperatura entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ podem causar prejuízos irreversíveis e prejudicar a função celular no resultado final (MAZUR, 1984).

Segundo Oliveira et al. (2013) quando a temperatura alcança de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ inicia-se a formação de cristais de gelo no meio extracelular enquanto o meio intracelular se encontra super-refrigerado. É neste ponto que ocorre o efluxo do líquido intracelular o que promove a desidratação na qual possui papel importantíssimo prevenindo a formação dos cristais no interior da célula evitando lesões severas.

Faz-se necessário uma curva de congelamento suficientemente lenta para que este efeito ocorra, mas rápida o bastante para que não haja uma desidratação intensa causando o enrugamento extremo da célula e um colapso irreversível da membrana plasmática (ARRUDA, 2010).

2.5. Avaliações Espermáticas

2.5.1. Motilidade

A avaliação da motilidade mesmo que estimada é uma das variáveis mais importantes na predição da qualidade espermática e é utilizada para avaliar a eficiência de diferentes diluidores e os protocolos de congelamento, considerando que para que haja a fecundação a mesma se torna indispensável (KUMAR, 2000).

Mesmo tendo grande relevância para com a fertilidade, não é possível afirmar que células espermáticas mesmo possuindo bons parâmetros de motilidade, estejam livres de qualquer injúria celular em que possa causar um efeito negativo nos processos da fertilização (AMORIN, 2008).

Vários métodos para avaliação da motilidade foram realizados ao longo do tempo. Estes métodos variam de protocolos com análise subjetiva e análise objetiva (SILVA et al., 2009).

A análise subjetiva com a utilização de microscopia óptica com contraste de fase e placa aquecedora é aceitável segundo Varner, Vaughan, Johnson (1991) tendo como avaliadora pessoa experiente.

Já como métodos objetivos foram descritos a espectrofotometria e a análise computadorizada, no caso da última é também avaliada características específicas do movimento espermático (MEJIA-GALLEGO, 2010).

2.5.2.Integridade de membrana

Vários testes de integridade de membrana são citados na literatura e são realizados com diversos corantes como a eosina nigrosina (BLOM, 1950) e azul de tripan (DIDION et al., 1989) em que são facilmente usados juntamente com a microscopia óptica simples.

Estes funcionam basicamente corando as células que tem membrana plasmática lesada enquanto as células íntegras permanecem sem coloração (VASCONCELOS et al., 2017).

Por outro lado existem outras substâncias como o iodeto de propídeo uma sonda fluorescente que é utilizada em protocolos mais avançados associada com avaliações com o uso do citômetro de fluxo (BERGSTEIN, WEISS, BICUDO, 2014).

2.5.3.Funcionalidade de membrana

O teste de funcionalidade de membrana também conhecido como teste hiposmótico mostra a capacidade da célula espermática de permitir o transporte de moléculas seletivamente. Quando a célula é exposta a uma solução hipotônica há uma tentativa de se estabelecer o equilíbrio osmótico o que permite a entrada de solução na célula (MARTINS et al., 2011).

Este influxo osmótico causa o “edemaciamento” da célula o que é facilmente visível na cauda do espermatozoide que se enrola. Este enrolamento ou dobramento pode ser explicado devido a membrana plasmática na cauda parecer ser mais frouxa em relação a cabeça (AMORIM, 2008).

Como citado por Snoeck (2014), vários protocolos foram descritos e testados a fim de se encontrar condições mais precisas para que ocorra o efeito desejado, além de um diagnóstico, de funcionalidade de membrana, fidedigno. Assim, a solução em que o espermatozoide for exposto deve ter osmolaridade controlada, ser incubado em tempo e temperatura adequado.

Correa e Zavos (1994) definiram um padrão de solução para o sêmen bovino ao utilizar uma solução de frutose e citrato de sódio a 100 mOsmol/kg em que conseguiram visualizar o máximo de células enroladas comparadas as outras osmolaridades.

De acordo com estudos feitos Jeyendran et al.(1984) (desenvolvedor da técnica) houve uma alta correlação de caudas enroladas e penetração de espermatozoides nos oócitos.

2.6.Fertilização in vitro (FIV)

A fêmea bovina na puberdade tem aproximadamente 70.000 oócitos, mas ao longo da sua vida apenas uma pequena porção destes são recrutados e estão aptos para a fertilização. Com o advento da fertilização *in vitro* esses números de oócitos são aproveitados e chegam a gerar aproximadamente 50 produtos doadora/ano, ao contrário de vias naturais que gerariam em torno de 10 produtos na vida da fêmea doadora (VARAGO, MENDONÇAS, LAGARES, 2008).

A técnica inicia-se com a colheita de oócitos que pode ser realizada *in vitro* com a utilização de ovários de abatedouros, ou *in vivo* com a utilização da OPU (*ovumpickup*) técnica que utiliza a ultrassonografia via transvaginal (GONÇALVES et al., 2008).

Os próximos passos da FIV são todos realizados no laboratório e compreendem-se em três etapas: maturação oocitária *in vitro*, a fecundação dos oócitos *in vitro* e o cultivo embrionário *in vitro* (VARAGO et al., 2008).

Na maturação *in vitro* o oócito passa por transformações para que esteja apto a ser fecundado, estas são conhecidas como maturação nuclear e citoplasmática (CHAVES et al., 2010).

Antes da fecundação *in vitro*, é necessário retirar dos fatores incapacitantes presentes na amostra, tanto no plasma seminal quanto no diluidor, estes procedimentos fazem com que o espermatozoide sofra alterações (capacitação) e hiperativação da movimentação necessários para que haja a fecundação (VARAGO et al., 2008; CHAVES et al., 2010).

Posteriormente à fertilização, é necessário o cultivo embrionário no qual o zigoto sofre divisões celulares (clivagem), a formação da mórula até o estágio de blastocisto (GONÇALVES et al., 2008).

3.OBJETIVO

3.1.Objetivo Geral

Avaliar a capacidade crioprotetora do aditivo hidroxietilamido em diferentes concentrações, associado com o diluidor Tryladil®.

3.2.Objetivos Específicos

Avaliar a viabilidade espermática do espermatozoide bovino, após a criopreservação com o diluidor e as diversas concentrações de Hidroxietilamido (HEA);

Avaliar a integridade física e a funcionalidade, da membrana plasmática do espermatozoide bovino, pelo teste de Eosina e teste hiposmótico, após a criopreservação com o diluidor e as diversas concentrações de Hidroxietilamido (HEA);

Avaliar o efeito dos tratamentos de Hidroxietilamido (HEA), sob o espermatozoide bovino criopreservado, quanto a taxa de produção *in vitro* de embriões.

4.MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.Declaração ética

O Projeto foi submetido ao comitê de ética em experimentação Animal – Ofício CEEA-045/2017, sendo considerado aprovado (ANEXO I).

4.2. Pré- Experimento

Foram realizados dois pré-experimentos, o primeiro com objetivo de verificar o melhor diluidor em relação a curva de congelamento utilizada pela central. O segundo teve como objetivo avaliar o efeito direto das diversas concentrações de HEA sob a viabilidade espermática.

Para o primeiro pré-experimento foram utilizados os diluidores Botu-Bov ® , OptiXcell ® e Tryladil ®, este experimento fez parte do trabalho de conclusão de curso da Aluna *Monalyse Kevelyn Borges de Oliveira*, trabalho enviado para publicação na revista *Ciência Animal Brasileira (em prelo)*, com resultado favorável para o diluidor Tryladil ® (ANEXO II).

Quanto ao segundo pré-experimento foram calculados as concentrações de HEA, conforme o presente trabalho e testado as diferentes concentrações (6% e 20%) logo após a coleta do sêmen e cálculo de concentração celular (30 milhões de espermatozoides por palheta), assim foi retirada uma alíquota e avaliada quanto a motilidade e vigor espermático. Os resultados apresentados definiram o experimento. Uma vez que as avaliações foram nulas.

4.3.Reagentes

Os reagentes utilizados no projeto estão descritos no ANEXO III.

4.4.Número de animais e coleta das amostras

As amostras foram produzidas na Central de produção de sêmen Alta Genetics do Brasil situada no município de Uberaba – MG no segundo semestre de 2017. Foram coletadas amostras de sêmen de 10 touros da raça Nelore com um número de três ejaculados por animal, totalizando 30 ejaculados (n=30). Os ejaculados foram coletados com vaginas artificiais bovinas modelo IMV (IMV Technologies®) e estas por sua vez estavam devidamente aquecidas e lubrificadas.

Os ejaculados utilizados no experimento foram avaliados quanto à motilidade, vigor e concentração. O parâmetro mínimo para serem usadas, foi de motilidade maior ou igual 60%, vigor maior ou igual a três, e concentração maior ou igual a $600 \times 10^6/\text{ml}$.

4.5.Sanidade animal

Os animais estavam alocados em piquetes individuais, onde havia sombreamento natural e artificial. Piquetes eram dotados de cama de areia, área de pastagem, cocho e bebedouro. Eram fornecidos água e suplemento mineral à vontade e era passada uma dieta de concentrado e volumoso duas vezes ao dia, uma na parte da manhã e a outra na parte da tarde.

Todos os animais apresentavam escore corporal de 4 a 5, e estavam regularizados em relação aos exames sanitários necessários para a permanência na Central.

4.6.Parâmetros espermáticos analisados

Todas as amostras espermáticas frescas foram avaliadas quanto ao volume, concentração espermática, motilidade, vigor, integridade de membrana plasmática com Eosina 1% (p/v) e funcionalidade de membrana com a utilização de solução hiposmótica.

Para as amostras congeladas também foram avaliados os parâmetros de motilidade, vigor, integridade de membrana plasmática com Eosina 1% (p/v) e funcionalidade de membrana com a utilização de solução hiposmótica, além da taxa de clivagem (D3) e taxa de embriões (D7).

4.7. Fluxograma do Experimento

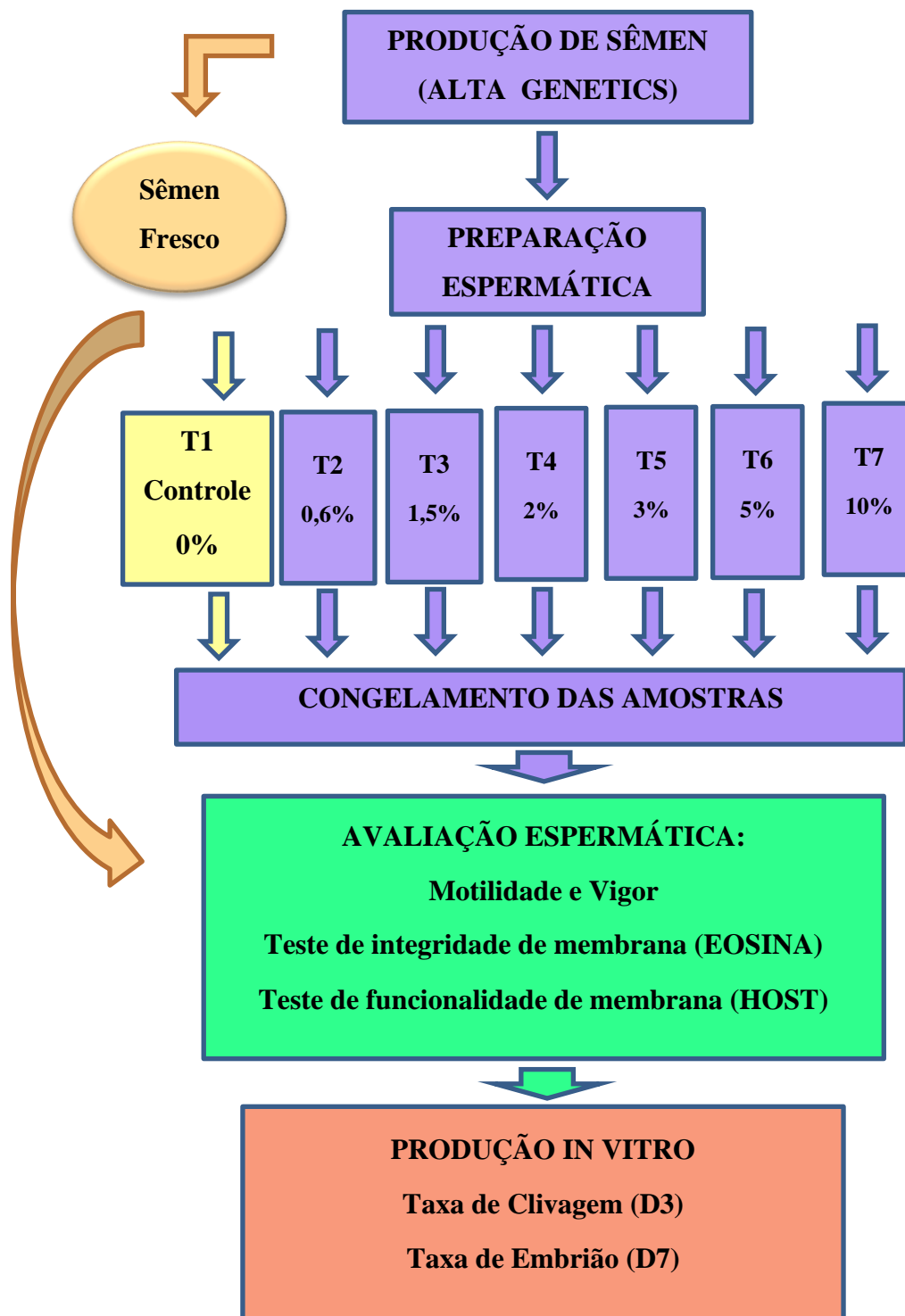


Figura 2 - Fluxograma do Protocolo Experimental: coleta de sêmen com preparação dos tratamentos para congelamento, descongelamento a 37°C por 30 segundos para avaliações espermáticas e para a fertilização in vitro.

4.8.Preparação espermática

Primeiramente todos os tratamentos foram aliquotados inclusive o controle, em tubo modelos Falcon (15ml), como Tabela 1:

Tabela 1 - Diluição da solução crioprotetora em função dos tratamentos estudados.

Tratamentos	Diluidor (Tryladil)	Solução crioprotetora		Concentração final HEA
		HEA 20%	HEA 6%	
1	2,16 ml	-	-	0%
2	1,90 ml	-	0,16 ml	0,6%
3	1,60 ml	-	0,54 ml	1,5%
4	1,90 ml	0,16 ml	-	2%
5	1,08 ml	-	1,08 ml	3%
6	1,60 ml	0,54 ml	-	5%
7	1,08 ml	1,08 ml	-	10%

Todos os tratamentos foram incubados a 37°C em banho-maria, com a devida concentração de Hidroxietilamido (HEA) além do controle sem inclusão da molécula (0%), até a chegada do ejaculado no laboratório.

A diluição foi realizada com o intuito de padronizar 30 milhões de espermatozoides por palheta (250µl).

4.8.1.Procedimento de congelamento-descongelamento

4.8.1.1.Do congelamento

O congelamento foi realizado segundo os protocolos da Alta Genetics do Brasil. Todas as amostras passaram pela mesma curva de congelamento e os tratamentos de cada ejaculado eram congelados simultaneamente*.

* Por questões éticas relacionadas ao sigilo empresarial, não será apresentada detalhes da curva de congelamento.

4.8.1.2.Do descongelamento

Todas as amostras foram descongeladas a 37°C por 30 segundos em descongelador de sêmen, e mantidas em tubo de ensaio previamente aquecidas a 37°C.

4.9.Avaliações

4.9.1.Volume

O volume foi aferido por balança digital de precisão, pesando-se o tubo mais ejaculado posteriormente a tara da mesma. A amostra era pesada e o valor em gramas é transformado em mililitros.

4.9.2.Concentração

Foram pipetados 50µl da amostra do ejaculado em cubeta preenchida com 7 ml de solução (solução fisiológica 0,9% e formol na concentração de 1%) e após a homogeneização realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Genesys 20®) resultando a análise em milhões de espermatozoides por ml (WILLET E BUCKNER, 1951).

4.9.3.Motilidade e Vigor

Pipetaram-se 8µl do ejaculado entre lamina e lamínula sobre o aumento de 100 x em microscopia óptica com contraste de fase.

Foram avaliados subjetivamente com nota de 0 % a 100 % os espermatozoides vivos na amostra. Para o vigor foram avaliados com escore de 1 a 5 perante a intensidade e a retilinearidade do movimento sendo o 1 mais lento e 5 o mais rápido e retilíneo (CBRA, 2013).

4.9.4.Integridade de membrana (Eosina)

Para o sêmen a fresco e congelado (descongelado a 37°C por 30 segundos em descongelador de sêmen) foram utilizados 8 µl do ejaculado mais 8 µl do corante Eosina 1% (p/v) pipetados em lâmina, posteriormente foi realizado o esfregaço, este realizado com outra lamina no ângulo de 45°, aguardou-se 30 segundos a temperatura de 37°C para iniciar as avaliações. Processo este realizado em mesa aquecedora a 37°C. Foram contadas 100 células.

As células apresentando coloração foram consideradas de membrana plasmática lesada e as que não apresentaram coloração do corante, definidas como integras (BLOM, 1950).

4.9.5. Funcionalidade de membrana (HOST)

A avaliação da funcionalidade de membrana consistiu em pipetar 20 µl da amostra fresca ou congelada (descongelado a 37°C por 30 segundos em descongelador de sêmen) em 500µl de solução hiposmótica incubadas a 37°C por 60 minutos, e outra alíquota de mesmo volume em solução de formol salino 1% sem incubação.

Foram contadas 100 células em microscopia óptica no aumento de 100 X verificando alterações de dobramento de cauda em ambas as amostragens das duas soluções.

Subtraiu-se a quantidade de células com alterações da amostra em solução hiposmótica com as células contadas na solução de formol salino chegando ao resultado final de células funcionais aquelas nas quais sofreram alteração de dobramento de cauda (CORREA; ZAVOS, 1994).

4.9.6. Produção in vitro de embriões (PIV)

Foi realizada produção *in vitro* no laboratório da Biovitro localizado em Uberaba - MG. Todos os protocolos realizados seguiram conforme determinação da própria empresa*. Para a realização da FIV (Fertilização *in vitro*) foram utilizados 70 oócitos para cada tratamento (Controle; 0,6%; 1,5% e 2%), estes selecionados após avaliação estatística.

Para cada tratamento foram feitos um pool dos 3 ejaculados de cada touro respectivamente. Foram avaliados nos dias de cultivo 3 e 7 representados por D3 (taxa de clivagem) e D7 (taxa de embriões).

* Por questões éticas relacionadas ao sigilo empresarial, não serão apresentados detalhes da produção *in vitro* de embriões.

4.9.7 Fluxograma produção in vitro de embriões (PIV)

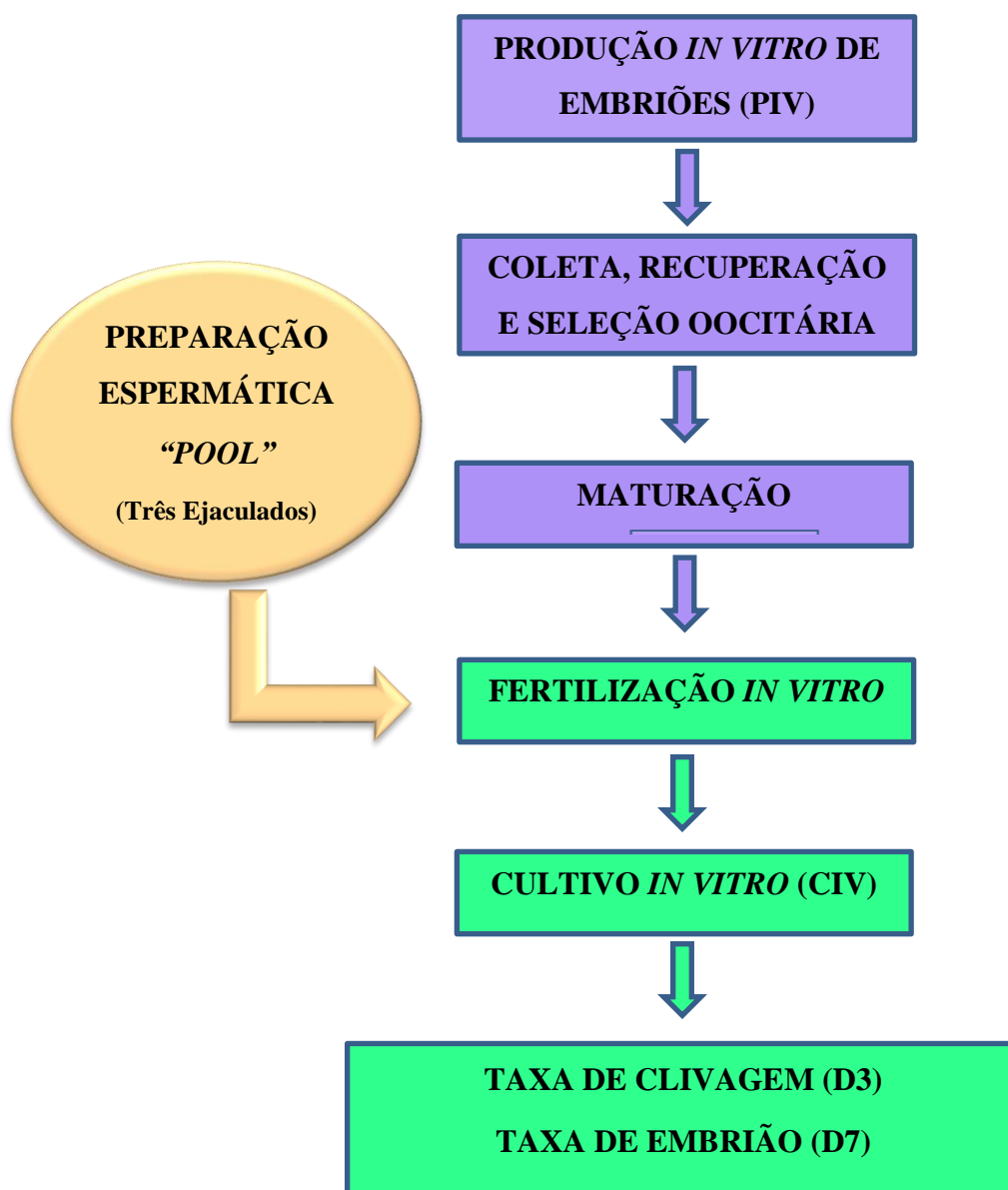


Figura 3 – Fluxograma da produção in vitro de embriões, com utilização de ~70 oócitos para cada tratamento e pool de 3 ejaculados do mesmo animal.

4. 10. Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o programa GraphPadPrism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Os dados foram expressos em média e desvio padrão (três repetições de cada 10 animais). Teste T pareado foi utilizado para comparar sêmen a fresco e após o descongelamento. A comparação de dados entre grupos controle e tratados foi realizada pela Análise de Variância. Para as avaliações de motilidade e vigor foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para as avaliações de Integridade e Funcionalidade de membrana, o teste paramétrico ANOVA, com pós teste Dunnett. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Para cada tratamento foram realizadas 30 repetições ($n=30$).

5.RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1. Sêmen Fresco *versus* Sêmen Congelado (Tryladil)

Os ejaculados apresentaram volume médio de 6,73 ml como também concentração espermática de $1794,6 \times 10^6/\text{ml}$ estando dentro dos padrões recomendados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013) que estipula valores médios entre 5-8 ml e no mínimo $365 \times 10^6/\text{ml}$, respectivamente.

A média da motilidade do sêmen fresco caiu de $65,8 \pm 4,6\%$ para $47,5 \pm 7,2\%$ após o descongelamento (Figura 4: A), essa queda de 28% na motilidade prova os efeitos deletérios que a criopreservação provoca, conforme citado por Watson (1995), porém com uma diminuição de qualidade de 40% a 50% do ejaculado.

Abdussamad et al., (2015) apresentaram resultados de 65% na motilidade do sêmen fresco e após criopreservação e descongelamento utilizando-se também o Tryladil ® obtiveram resultado de 49%, o que se assemelha aos dados do presente trabalho.

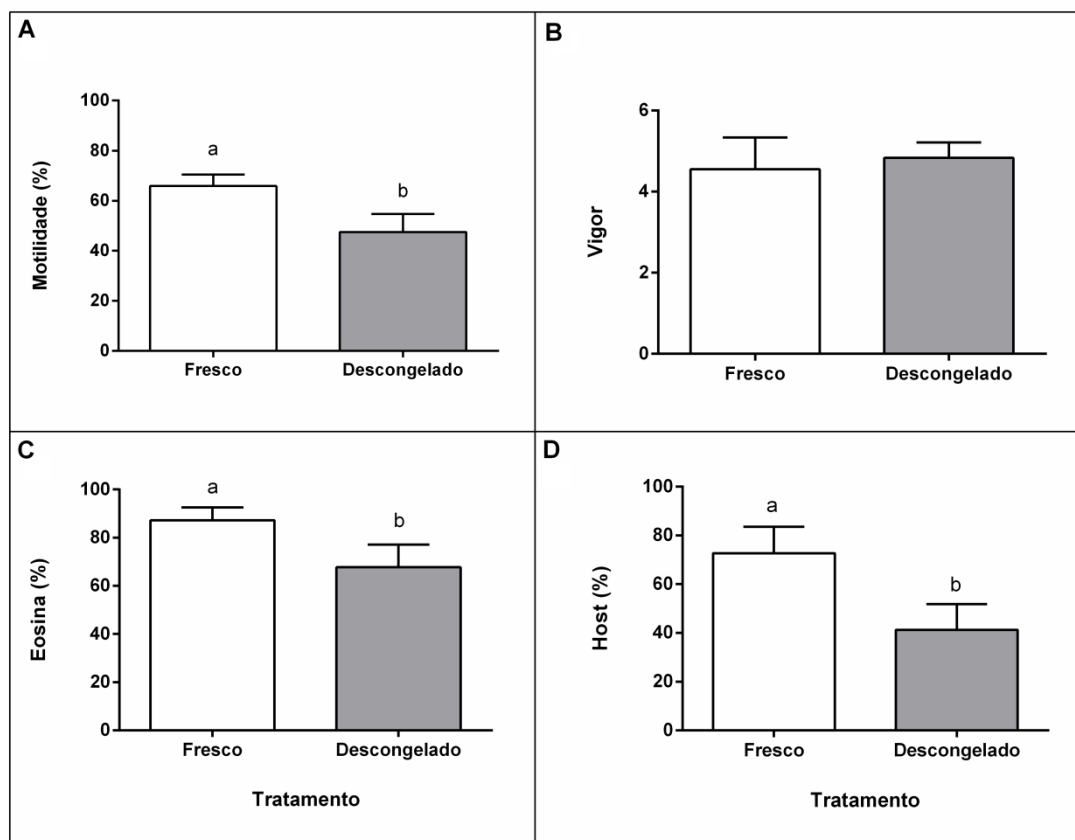


Figura 4 - Efeito da criopreservação na motilidade (A); vigor (B); Integridade de membrana Eosina (C) e funcionalidade de membrana Host (D). Descongelado foi definido como grupo controle. Os resultados são expressos pela média e desvio padrão.

Observa-se que não há uma diferença significativa quanto ao parâmetro vigor, uma vez que este define somente a intensidade e progressividade do espermatozoide (Figura 4: B).

De acordo com De Santis, Prata (2009), os efeitos deletérios na membrana plasmática podem acometer os espermatozoides após processos de criogenia, como visto na Figura 4 (C) uma queda de 87,2% (fresco) para 67,8% (descongelado) de células integras, este efeito possivelmente foi causado pela formação de cristais de gelo intracelular (GONZALEZ, 2004; SQUIRES et al., 1999; VASCONCELOS et al., 2017).

Este efeito deletério também é representado na avaliação da funcionalidade de membrana pelo teste hiposmótico (Figura 4: D). Uma vez que, o estresse osmótico está diretamente relacionado à interação entre a célula e o diluidor em que está em contato. O que pode causar a diminuição da viabilidade espermática (MERYMAN, 1971; DE SANTIS, 2009; MOSTEK et al., 2017).

Siqueira et al., (2007) encontraram resultados de 37,89% para o sêmen bovino congelado, resultado no qual o presente trabalho se assemelha com 41,3% de células reativas ao teste hiposmótico.

De acordo com Layek et al., (2016) o processo de criogenia causa uma translocação de lipídeos e a desestabilização de membrana o que pode levar a perda da integridade da membrana e também uma reação acrossomal prematura.

Para Vianna (2004) com a queda da temperatura os lipídeos passam do estado fluido para o estado gel onde as cadeias de ácidos graxos se desordenam. Posteriormente com a contínua diminuição da temperatura essas estruturas emparelham-se e se tornam rígidas e fracas sujeitas a danos. Estes efeitos podem ajudar a entender as quedas nas avaliações de integridade de membrana (Fresco 87,2% *Versus* Descongelado 67,8%) e funcionalidade de membrana (Fresco 70,4% *Versus* Descongelado 41,3%) (Figura 4).

Na avaliação estatística após o teste de dispersão dos dados (ANEXO IV), verificou-se que os valores referentes à motilidade, vigor, integridade de membrana e funcionalidade, apresentaram homogeneidade quanto ao grupo controle (descongelado)

e os tratamentos para os 30 ejaculados, o que indica um padrão metodológico para os procedimentos de avaliação.

5.2. Sêmen Congelado (Tryladil) *versus* Sêmen Congelado (Tryladil mais HEA)

A criopreservação causa uma diminuição na motilidade espermática, como explicado na figura 4. Ao se analisar o grupo controle (descongelado) *versus* os tratamentos com inclusões 0,6%, 1,5% e 2% de HEA, verifica-se que não há diferença estatística entre os resultados (Tabela 2).

Entretanto com a inclusão de 3%, 5% e 10% de HEA, quando relacionado à motilidade observa-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$). (Tabela 2).

Tabela 2 - Avaliação da motilidade e vigor do espermatozoide bovino, pós congelamento.

Parâmetros	Tratamento (Concentração HEA)						
	Controle	Baixas concentrações			Altas concentrações		
	0%	0,6%	1,5%	2%	3%	5%	10%
Motilidade (%)	47,5±7,2 ^a	42,5±6,5 ^a	35,7±8,9 ^a	41,3±6,7 ^a	18,8±10,6 ^b	25,2±8,4 ^b	14,3±6,8 ^b
Vigor (0-5)	4,8±0,4 ^a	4,2±0,6 ^a	3,6±0,8 ^b	4,1±0,7 ^a	2,5±0,9 ^b	2,7±0,7 ^b	2,0±0,5 ^b

Análise experimental das avaliações Motilidade e Vigor. A média e desvio padrão foram calculadas pelo testes de Kruskal-Wallis. Letras diferentes indicam significância em $p < 0,05$.

Possivelmente este efeito pode estar relacionado ao aumento da concentração de HEA. Assim, os parâmetros de motilidade e vigor seguiram uma similaridade quanto aos tratamentos em baixas concentrações. Entretanto na concentração 1,5% o vigor foi inferior, ao grupo controle.

Em trabalho realizado por Duarte et al.(2016), com objetivo semelhante ao presente trabalho de tentar aumentar a eficácia do diluidor com a inclusão de um aditivo (antioxidantes), obteve resultados inferiores a 10% para motilidade.

Segundo trabalho realizado por Silva et al. (2017) utilizando-se de diluidor tris-gema encontraram-se resultados de motilidade $28,33 \pm 1,66$ de média e vigor 2 ± 0 do sêmen pós descongelamento, já Abdussamad et al., (2015) encontrou motilidade média de 49%, semelhante aos resultados obtidos no presente trabalho.

Para a avaliação da integridade de membrana com uso da eosina, as baixas concentrações obtiveram resultados semelhantes estatisticamente com o controle ($67,8 \pm 9,3$), seguindo também o padrão encontrado para a motilidade. As baixas concentrações, 0,6%; 1,5% e 2% apresentaram integridade de membrana de $66,4 \pm 9,8$, $64,1 \pm 10,1$ e $66,4 \pm 10,6$ respectivamente (Tabela 3), diferentemente dos valores encontrados por Duarte Junior et al., (2016) que encontraram resultados abaixo de 30% para a integridade de membrana utilizando-se da adição de pentoxifilina e antioxidantes ao diluidor.

Tabela 3 - Avaliação da integridade (IM) e funcionalidade (FM) da membrana plasmática do espermatozoide Bovino, pós congelamento.

Parâmetros	Tratamento (Concentração HEA)						
	Controle	Baixas concentrações			Altas concentrações		
		0%	0,6%	1,5%	2%	3%	5%
IM (%)	$67,8 \pm 9,3^a$	$66,4 \pm 9,8^a$	$64,1 \pm 10,1^a$	$66,4 \pm 10,6^a$	$52,9 \pm 8,2^b$	$56,9 \pm 9,1^b$	$46,8 \pm 11,1^b$
FM (%)	$41,3 \pm 10,6^a$	$37,8 \pm 9,5^a$	$29,0 \pm 10,0^b$	$33,7 \pm 10,0^a$	$14,2 \pm 7,4^c$	$18,6 \pm 8,7^c$	$13,9 \pm 5,8^c$

Análise experimental dos testes de Viabilidade de membrana plasmática: Integridade de membrana-IM (Eosina)- células viáveis; Funcionalidade de membrana (HOST) – Células reativas. A média e desvio padrão foram calculadas pelo testes de Dunnet. Letras diferentes indicam significância em $p < 0,05$.

As altas concentrações 3%; 5% e 10% apresentaram resultado de $52,9 \pm 8,2$, $56,9 \pm 9,1$ e $46,8 \pm 11,1$ o que diferiram estatisticamente do controle. O que pode reforçar

o efeito da alta concentração de HEA, sugerido um efeito do soluto sobre a condição fisiológica da membrana plasmática.

Assim as altas concentrações de HEA possivelmente levariam a um processo de alteração do soluto na solução, e provavelmente promoveriam uma desidratação celular em que o líquido intracelular se dirige para o meio mais concentrado. Esta saída exacerbada de líquido intracelular causaria danos irreversíveis à célula espermática (DE SANTIS, PRATA, 2009).

Em estudos realizados por Lioneti et al. (1978) e Stiff et al. (1987) com granulócitos, utilizando HEA, observou-se uma taxa de viabilidade de aproximadamente 80%, resultados superiores aos alcançados no presente trabalho (60,2%). Possivelmente essa variação pode estar relacionada à estrutura de membrana como fosfolipídios e colesterol, uma vez que os tipos celulares se distinguem entre somática e germinativa.

A estrutura da membrana plasmática do espermatozoide bovino segue uma característica bioquímica peculiar como relatado por Vianna (2004) e Layek et al.,(2016) em que há uma razão singular entre fosfolipídios e colesterol.

Como já descrito por Arruda et al., (2010) uma das funções do diluidor é de retirar a água do meio intracelular impedindo a formação de cristais de gelo. Portanto, é necessário um diluidor em que sua concentração de soluto seja suficiente para promover a uma saída de água que não desidrate a célula completamente, e que também permita retirar a quantidade de água adequada para que não haja o congelamento do líquido intracelular dentro da célula, promovendo uma lesão mecânica pelos cristais formados.

Outra hipótese vai de encontro com os relatos de Taşdemir et al. (2013), em que a densidade da substância também poderia influenciar nesta diferença de resultados obtidos, uma vez que a relação da densidade é diretamente proporcional a massa do soluto, assim potencializando o efeito soluto sobre a membrana plasmática, o que promoveria injúrias durante o processo criogênico.

Também é possível observar a relação motilidade e integridade de membrana que expressaram mesmo padrão de resultados sendo estes bons para baixas concentrações e ruins para as altas concentrações de HEA. Segundo Paulenz (2002) estes dois parâmetros somados ao status do acrossoma são os mais confiáveis à predição da fertilidade (QUAN et al., 2016).

Há uma tendência ao se avaliar a integridade de membrana com a motilidade, ao contrário da funcionalidade de membrana que se mostrou inferior aos resultados encontrados para estas, o que indica uma ineficiência funcional da membrana, o que de acordo com Ntemka et al., (2016) tem papel essencial na fertilização.

Na tabela 3 a avaliação da funcionalidade de membrana indicam as altas concentrações e também as inclusões 1,5 e 2% (baixas concentrações) se diferenciando estatisticamente e negativamente do controle 0% ($41,3 \pm 10,6\%$). Apenas a inclusão de 0,6% não difere do controle.

Outro fator a ser considerado pode estar relacionado a toxicidade, o que pode promover danos bioquímicos irreversíveis a membrana da célula (WATSON, 2000).

Este efeito possivelmente possa ser traduzido nos resultados em que se utilizou concentrações acima de 1,5% de HEA. Desta forma, pode-se prever que haja uma relação de toxicidade da molécula de HEA para com a célula espermática, como relatado por Castro e colaboradores (2011), em que algumas substancias quando interagem com tipos celulares, possam promover um efeito citotóxico, conforme a concentração utilizada.

Este relato corrobora com os dados do pré-experimento, ao utilizar-se somente o HEA, como diluidor, tanto 6% quanto 20%, em que o parâmetro motilidade e vigor foram diminutos, após o descongelamento.

Pode-se observar que apenas a inclusão de 0,6% mostrou-se semelhante estatisticamente em todos os parâmetros avaliados, quando comparado ao grupo controle o que mostra quanto maior a concentração mais danos ocasionados, reforçando as ideias do efeito do soluto e toxicidade.

5.3. Avaliação da Taxa de clivagem e taxa de embriões

Devido aos resultados de motilidade e vigor, integridade de membrana e funcionalidade de membrana utilizando-se das altas concentrações de HEA (3%, 6% e 10%), não serem estatisticamente favoráveis, estas não foram testadas na taxa de clivagem e taxa de embriões. Portanto para a FIV utilizou-se o grupo controle e apenas os tratamentos 0,6%, 1,5% e 2%.

De acordo com a análise dos dados, observa-se que não ocorreu diferença estatística ($p > 0,05$), entre o controle e os tratamentos 0,6%, 1,5% e 2% quanto a

avaliação da taxa de clivagem, uma vez que os resultados para os tratamentos foram (55,4%; 53,2% e 53,3%), respectivamente, comparando-se com o grupo controle (51,4%) (Figura 5 A).

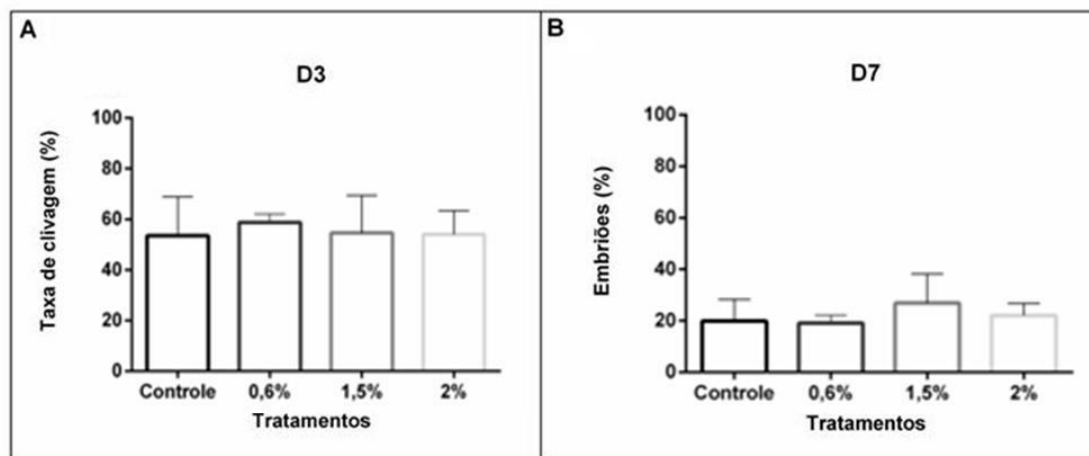


Figura 5- Análise experimental dos testes de fertilização *in vitro*. A) porcentagem da taxa de clivagem D3; B) porcentagem de embrião em D7.

Na avaliação da taxa de embriões produzidos no D7, observa-se que não há diferença estatística entre o grupo controle (19,4%) e os tratamentos 0,6%, 1,5% e 2% de HEA (19,1%; 28,6%; 22,6%), respectivamente (Figura 5: B).

Em trabalho realizado por Brum (2006), foram encontrados resultados com média de 80% para a taxa de clivagem e 20% para taxa de embriões, diferente do presente trabalho que alcançou médias de 53% e 22% respectivamente, indicando uma taxa de clivagem ineficiente, mas uma taxa embrionária semelhante.

Garcia et al. (2017) obtiveram resultados de 23% e 18% para taxa de embriões em vacas girolando o que se assemelha aos resultados obtidos no presente trabalho (19,1%; 28,6% e 22,6%) para as 3 concentrações de HEA, apesar de não terem o mesmo objetivo.

De acordo com Bruel et al. (2014), os parâmetros de qualidade espermática não estão diretamente relacionados a taxa de embriões, o que pode ser observado nos tratamentos utilizados para a produção *in vitro* de embriões, como o controle e as inclusões de 0,6%; 1,5% e 2% que obtiveram padrões de motilidade, integridade de membrana razoáveis, mas mesmo assim não foram eficazes na produção *in vitro* de embriões.

6.CONCLUSÃO

Concluiu-se que o uso de HEA não promoveu melhora nos parâmetros do sêmen descongelado em relação ao controle Tryladil®. Todavia em concentrações acima de 2% ocorre uma redução da viabilidade do sêmen congelado. As amostras de sêmen tratadas com HEA, também não apresentaram melhoria na taxa de clivagem e na taxa de embriões.

REFERÊNCIA

- ABDUSSAMAD A. M. et al. Comparison of various semen extenders and addition of prostaglandin F₂ α on pregnancy rate in cows. **The Animal Consortium**, n.10, n.4, p. 655–659, 2015.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- AMORIN, E. A. M. **Alteração da membrana espermática de suínos, bovinos e equinos na qualidade do sêmen**. 2008. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, abril de 2008.
- ARRUDA, R. L. et al. Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo Horizonte, v. 34, p. 168-184, jul./set. 2010.
- ASBIA. Relatório index, 2001. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/novo/relatorios/>. Acesso em: 16 de nov. 2016.
- ASBIA. Relatório index, 2014. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/novo/relatorios/>. Acesso em: 16 de nov. 2016.
- BERGSTEIN. T. G.; WEISS R.R.; , BICUDO. S. D. Técnicas de análise de sêmen. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 38, n. 4, p. 189-194, out./dez. 2014.
- BLOM, E. A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. **Fertily and Sterility**, v. 1, n. 2, p. 176-177, 1950.
- BRUEL N. L. et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos com reprodutores da raça Angus visando o cruzamento industrial **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.**, Curitiba, v. 12, Supl. 1, p. S22-23, jan./dez. 2014.
- BRUM, D. S. et al. Cultivo de embriões bovinos produzidos in vitro: efeito do número de embriões e da proporção de meio. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 145-151, 2006.
- CASTRO, S. V.; CARVALHO, A. A.; SILVA C.M.G.; Intracellular Cryoprotant Agents: Characteristics and Use of Ovarian Tissue and Oocyte Cryopreservation. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 39(2), p.957, 2011.
- CBRA, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, **Manual para exame andrológico e avaliação de semên animal**. 3 ed. Belo Horizonte, 2013.

CELEGHINI, E. C. C; **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estruturada cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes.** 2005. 186 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CHAVES R. N. et al. Sistemas de cultivo in vitro para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 34, n.1, p. 37-49, jan./mar. 2010.

CORREA, J.R.; ZAVOS, P.M. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. **Theriogenology**, v. 42, p. 351-360, 1994.

DE SANTIS, G. C; PRATA, K. L.; Criopreservação de células-progenitoras hematopoéticas. **Medicina** (Ribeirão Preto); v. 42(1), p. 36-47 <http://www.fmrp.usp.br/revista>, 2009.

DIDION, B. A. et al. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in sperm of various species. **Gamete research**. v. 22, p. 51-57, 1989.

DUARTE JUNIOR, M. F. et al. Utilização de pentoxifilina e antioxidantes na criopreservação do sêmen bovino: qualidade seminal e estresse oxidativo. **ARS VETERINARIA**, Jaboticabal, SP, v.32, n.2, p. 110-116, 2016.

FLESCHE, F.M., GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochim Biophys Acta**, v. 114, n. 3, p. 197-235, 2000.

GARCIA S. M. et al. Avaliação da taxa de blastocisto e prenhez de embriões produzidos in vitro em decorrência da contagem de folículos antrais em vacas da raça Girolando. **Rev. Acad. Ciênc. Anim.** v. 15(Supl.2): p. 67-67, 2017.

GONÇALVES, P. B. D. et al. Biotecnologias da reprodução animal Produção in vitro de embriões. **Ciências Veterinárias nos Trópicos**, v. 11, p. 135-138, 2008.

GONZALEZ, R. A. F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozoide bovino.** 2004. 92f. Tese (doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.

GRAHAM, J. K. Cryoservation of stallion spermatozoa. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.** v.12, p.131-147, 1996.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004.

HENRY, M.; ECHEVERRI, A. M. L. **Andrologia veterinária básica**. Belo Horizonte: CAED-UFMG, 2013.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **AnimReprodSci**, v.62, p.3-22, 2000.

JEYENDRAN, R. S. et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other characteristics. **Journal Reproduction Fertility**, 70:219-228, 1984.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KUMAR, S. Cellular damages during cryopreservation and assessment of in vitro fertilizing capacity of spermatozoa. **Indian Veterinary Medicine Journal**, Chennai, v. 24, p. 1-6, 2000.

LAYEK, S. S. et al. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders, **Animal Reproduction Science**, v. 172, p. 1–9, 2016.

LIONETTI, F. J. et al. In vitro studies of cryopreserved baboon granulocytes. **Transfusion**, v. 18, p. 685, 1978.

MARTINS, L. F. et al. Correlation between hypoosmotic swelling test and breeding soundness evaluation of adult Nelore bulls. **Italian Journal of Animal Science**, v. 41, p. 217-219, 2011.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanism and implications. **Am. J. Physiol**, v. 247, p. 125-142, 1984.

MEJIA-GALLEGO. A. Avaliação das características da motilidade (CASA), morfologia e funcionalidade da membrana plasmática (HOST) de espermatozoides bovinos sexados por citometria de fluxo. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MERYMAN, H. T. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. **Cryobiology**, v. 8, p. 489-500, 1971.

MOSTEK, A. et al. Cryopreservation of bull semen is associated with carbonylation of sperm proteins. **Theriogenology**, v. 92, p. 95-102, 2017.

NTEMKA, A. et al. Breed differences of bull frozen-thawed semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, p. 945-952, 2016.

OLIVARES, C. C. S. **Estabelecimento de protocolos para seleção e indução da capacitação espermática em caprinos**. 109 f. Dissertação (Mestrado em Clínica e Reprodução Animal) – Universidade Federal Fluminense, 2013.

OLIVEIRA, G.C. et al. Criopreservação do sêmen equino: uma revisão. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo Horizonte, v.37, n.1, p.23-28, jan./mar. 2013.

PAULENZ, H. et al. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. **Theriogenology**, v. 57, p. 823–836, 2002.

QUAN, B. G. et al. Effects of the Tris, Tes, or skim milk based extender on in vitro parameters of ram spermatozoa during liquid storage. **Small Ruminant Research**, v. 134, p. 14–21, 2016.

RATES, D. M. **Membrana plasmática: criopreservação e capacitação de espermatozoides equinos**. 106f, 2015. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2015.

REGALIN, D. et al. Efeitos cardiovascular e metabólico da reposição volêmica com solução salina hipertônica 7,5% associada ou não ao hidroxietilamido 130/0,4 em gatas com hipovolemia induzida. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 8, p. 1770-1778, ago, 2010.

SILVA, L. E. et al. Sazonalidade e qualidade do sêmen fresco e criopreservado de touros Pantaneiro e Nelore. **R. bras. Ci. Vet**, v. 24, n. 1, p. 104-107, abr./jun. 2017.

SILVA, S. V. et al. Diferentes métodos e técnicas na avaliação espermática: Uma breve revisão. **Ciênc. Vet. Tróp**, v. 12, p. 1-15, 2009.

SILVA S.V.; GUERRA M.M.P.; Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo Horizonte, v. 35, n. 4, p. 370-384, out./dez. 2011.

SILVA, P.F.N., GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenol.**, v. 65, p. 958-978, 2006.

SIQUEIRA, J. B. et al. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática in vitro. **R. Bras. Zootec.**, v. 36, n. 2, p. 387-395, 2007.

SNOECK, P. P. N. et al. Qual é o teste hiposmótico mais indicado para avaliar a integridade funcional de espermatozoides equino criopreservados? **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 36(4), p. 355-361, out/dez 2014.

SOARES, A. T. **Avaliação *in vitro* de espermatozoides caprinos criopreservados em diluente á base de leite desnatado acrescido de glutathione reduzida e trolox em diferentes concentrações.** Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2010.

SQUIRES E. L. et al. Cooled and frozen stallion semen. Colorado: Colorado State University. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**; Bulletin No. 9, 1999.

STIFF, P. J. et al. Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch without controlled-rate freezing. **Blood**, v. 70, p. 974-978, 1987.

TAŞDEMİR, U. et al. Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. **Cryobiology**. v. 66(1), p. 38-42, Feb, 2013.

TILMAN, D., K. G. et al. Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**, v. 418, p. 671-677, Aug, 2002.

VARAGO, F. B; MENDONÇAS, L. F; LAGARES, M de A; Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Ver. Bras. de Reprod. Anim.** Belo Horizonte, v.32, n.2, p. 100-109, 2008.

VARNER, D.D.; VAUGHAN, S.D.; JOHNSON, L. Use of a computerized system for evaluation of equine spermatozoal motility. **American Journal of Veterinary Research**, v.52, p.224-230, 1991.

VASCONCELOS, A. B. et al. A comparative study of three different dyes evaluating the physical integrity of the plasma membrane of cryopreserved bovine spermatozoa. **Veterinária Notícias**, v.23, n.1, p.13-22, jan./abr. 2017.

VIANNA, F. P.; **Eficiência dos testes de termoresistência (lento e rápido) em relação a fertilidade de sêmen congelado na espécie bovina.** 2004. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 2004.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post thawing function. **Reproduction Fertility and Development**, v .7, p. 871-891, 1995.

WATSON P,F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 60, p. 481-492, 2000.

WILLETT, E.L.; BUCKNER, P.J. The Determination of Number of Spermatozoa in Bull Semen by Measurement of Light Transmission. **J. Animal Sci.** v. 10, p. 219, 1951.

ANEXO I

Ofício CEEA-045/2017

Uberaba, 20 de abril de 2018

Ilma. Prof.

André Belico de Vasconcelos

Assunto: **Encaminha processo nº 017/2017, sobre o protocolo de pesquisa “Efeito do diluidor no congelamento de sêmen bovino”.**

Prezado(a) Professor(a),

Em resposta a sua solicitação, informo que o protocolo acima referido foi submetido avaliação do CEEA-UNIUBE, na reunião do dia 06/07/2017, sendo considerado **aprovado**.

Atenciosamente,

**Profa. Joely F. Figueiredo Bittar**

Coordenadora do CEEA-UNIUBE

ANEXO II



CAPA SOBRE PÁGINA DO USUÁRIO PESQUISA/SEARCH ATUAL ANTERIORES NOTÍCIAS ESTATÍSTICAS

[Capa](#) > [Usuário/User](#) > [Autor](#) > [Submissões](#) > [#49099](#) > [Avaliação](#)

#49099 AVALIAÇÃO

RESUMO AVALIAÇÃO EDIÇÃO

SUBMISSÃO

Autores	André Belico Vasconcelos, João Pedro Brandão Zandonaidé, Monalyse Kevelyn Borges de Oliveira, Neimar Correa Severo 
Título	Avaliação de três diferentes diluentes sobre a funcionalidade e integridade da membrana plasmática do espermatozoide bovino
Seção	Produção Animal
Editor	Antonio Borges 

AVALIAÇÃO

RODADA 1

Versão para avaliação	49099-204548-1-RV.DOCX 30-08-2017
Iniciado	—
Última alteração	—

ANEXO III

- Solução de viabilidade de membrana: Solução Estoque - Eosina (Sigma) a 1%(p/v), Citrato de sódio (Sigma) 3% (p/v), diluídos em solução isotônica (PBS). Para a solução 2 utilizou-se em água destilada. Solução de trabalho – 1,0 ml de eosina a 1% (p/v) adicionado 1,0 ml de citrato de sódio 3% (p/v);
- Solução de funcionalidade de membrana: Citrato de Sódio (7,3g/L) e D-Frutose (13,5g/L) em água destilada, na concentração de 150 mOsm/Kg.H 2 O;
- Formol Salino – Formol 4% (p/v) em Citrato de Sódio 29g/L;
- Diluidor de sêmen - Tryladil®, gema de ovo pasteurizada, e água purificada (tipo II) na proporção 1:1:3 respectivamente;
- Solução crioprotetora (HES 20%) Empresa Citopharma – Glicose Anidra 1,7g/L; Mg (+2) 3mEq/L; Gluconato 23mEq/L; Acetato 27mEq/L;
- Solução crioprotetora (HES 6%) - Hidroxietilamido (D.C.B.: 06930) 60 mg/ml; Cloreto de sódio (D.C.B.: 02421) 9 mg/ml. 312mOsm.

ANEXO IV

Análise de dispersão dos dados de motilidade (A); vigor (B); integridade de membrana – Eosina (C) e funcionalidade de membrana – Host (D). n=30.

