

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA TROPICAL
DOUTORADO EM PRODUÇÃO ANIMAL NOS TRÓPICOS

ANNA MONALLYSA SILVA DE OLIVEIRA

**SÊMEN BOVINO CRIOPRESERVADO COM DILUIDOR TRIS-GEMA
SUPLEMENTADO DE HIDROXIPROPILMETILCELULOSE E GOMA DE
CAJAZEIRA**

Teresina - PI

2024

ANNA MONALLYSA SILVA DE OLIVEIRA

**SÊMEN BOVINO CRIOPRESERVADO COM DILUIDOR TRIS-GEMA
SUPLEMENTADO DE HIDROXIPROPILMETILCELULOSE E GOMA DE
CAJAZEIRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Tropical - PPGZT da Universidade Federal do Piauí - UFPI, na área de Produção Animal nos Trópicos, como requisito para obtenção do título de Doutora em Zootecnia Tropical.

Orientador: Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza

Co-Orientadora: Prof. Dra. Yndyra Nayan Carvalho Teixeira Castelo Branco

Teresina - PI

2024

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial CCA
Serviço de Representação da Informação

O48u Oliveira, Anna Monallysa Silva de.
Sêmen bovino criopreservado com diluidor tris-gema
suplementado de hidroxipropilmetilcelulose e goma de cajazeira. /
Anna Monallysa Silva de Oliveira. -- 2024.
74 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de
Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Tropical, 2024.

“Orientador: Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza.”

1. Andrologia. 2. Espermatozoides. 3. Diluidor. 4. Goma. 5.
Bovino. I. Souza, José Adalmir Torres de. II. Título.

CDD 636.214

Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa - CRB3/1163

**SÊMEN BOVINO CRIOPRESERVADO COM DILUIDOR TRIS-GEMA
SUPLEMENTADO DE HIDROXIPROPILMETILCELULOSE E GOMA DE
CAJAZEIRA**

ANNA MONALLYSA SILVA DE OLIVEIRA

Tese aprovada em: 05/08/2024

Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 JOSE ADALMIR TORRES DE SOUZA
Data: 19/08/2024 11:35:05-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza (Presidente) / DCCV/CCA/UFPI

Documento assinado digitalmente
 YNDYRA NAYAN TEIXEIRA CARVALHO CASTELO
Data: 19/08/2024 11:33:37-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco (Externa) / UFMA

Documento assinado digitalmente
 ANTONIO DE SOUSA JUNIOR
Data: 19/08/2024 15:27:56-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Antônio de Sousa Júnior (Interno) / CTT/UFPI

Documento assinado digitalmente
 ISOLDA MARCIA ROCHA DO NASCIMENTO
Data: 19/08/2024 17:06:41-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Isôlda Márcia Rocha do Nascimento (Interna) / CTT/UFPI

Documento assinado digitalmente
 LEOPOLDINA ALMEIDA GOMES
Data: 19/08/2024 20:37:59-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Leopoldina Almeida Gomes (Externa) / IESM

Documento assinado digitalmente
 MAURICIO BARBOSA SALVIANO
Data: 19/08/2024 18:51:23-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Maurício Barbosa Salviano (Externo) / UNINOVAFAPÍ

À autora dos principais capítulos do livro da minha vida e co-autora de outros tantos, minha mãe, Profa. Maria da Paz, que com dignidade e honra, transmitiu aos três filhos o sentido do estudo e do trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, a Jesus Cristo, ao Espírito Santo, à Virgem Maria e a todos os santos, pelo sustento, acalanto e direcionamento. Ao erguer meus olhos para o monte, reconheço a ancestralidade de minha fortaleza, segurança e proteção, o meu socorro vem Daquele que fez o céu e a terra.

Aos animais, fonte primária de todo o meu interesse e afincado no exercício da profissão de Médica Veterinária. À Drika, ao Trovão, à Neblina, à Tempestade, à Garoa, ao Bacon, ao Cheddar e a todos aqueles que passaram e passarão por mim.

À minha mãe, Profa. Maria da Paz, e ao meu pai (*in memoriam*), Sr. Raimundo, por serem minha base e referência de amor e integridade. Se eu pude pensar diferente, os senhores me concederam liberdade, e com ela eu construí os meus ideais. Muito obrigada.

Ao meu irmão, Phyllyppy Dyno, amigo e advogado que por inúmeras vezes me dedicou e dedica atenção, auxílio, conselhos e labor. Obrigada pelo amparo assertivo. Compartilhamos jornadas, crescemos, sorrimos, choramos, construímos e brindamos, sempre juntos.

Ao meu irmão Damião Kennedy, que durante a minha formação acadêmica básica contribuiu de forma significativa, meu agradecimento por acreditar. Obrigada por ser peça substancial para que de um passado semeado, houvesse um futuro de colheita, você esteve na plantação, quando a terra ainda era somente terra.

À Mayra Sales, pelo acompanhamento portentoso, pelo zelo, profissionalismo e comprometimento. Se encerra um dos ciclos iniciados outrora e visualizar a estrutura desse sonho, me remete às frações que escolhemos, locamos e realocamos. *Eu consegui! Muito obrigada, Mayra.*

À Naiane Campanha, pelo companheirismo, serenidade e temperança durante a rotina compartilhada. Sua paciência, foco e determinação são, por muitas vezes, bússola na estrada que decidimos trilhar juntas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza, por permitir experiências que são e serão base para minha carreira ao longo dos anos. Minha gratidão pelo acolhimento, pelos ensinamentos, por acrescentar na minha vida profissional, sendo referência de compromisso, respeito e decência. Sobretudo, agradeço pela consideração e pela vida dedicada a tantos e a todos que passaram pelo Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal.

À Prof. Dra. Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco, digo que “me levanto sobre o sacrifício de milhões de mulheres que vieram antes, e penso 'o que estou fazendo para tornar essa montanha mais alta para que as mulheres que vierem depois de mim possam ver além?'”. Obrigada por me fazer enxergar além e que eu possa, seguindo os conhecimentos compartilhados, deixar a montanha ainda maior. Minha gratidão inestimável a você, como minha co-orientadora, “madrinha” e amiga.

Aos professores, em especial Prof. Dr. Antônio de Sousa Júnior e Prof. Dra. Isolda Márcia Rocha do Nascimento, por serem fonte de conhecimento e motivação. Obrigada pelo acolhimento, pelos auxílios e intercessões.

Aos membros do LBRA (Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal) e UFPI, pós-graduados e técnicos, que se tornaram ao longo do tempo grandes companheiros de estudo e trabalho. À servidora Dona Noeme, em especial, por ser o abraço acolhedor na rotina de pesquisas.

À Universidade Federal do Piauí (UFPI), pela receptividade e disponibilização de corpo docente, infraestrutura e material qualificado para realização do doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Tropical (PPGZT), em nome do Prof. Dr. Natanael Pereira da Silva Santos e Prof. Dr. Arnaud Azevedo Alves, pelo suporte prestado durante e após as disciplinas cursadas e projetos executados. À secretária e colaboradora, Andressa Karyne, pela atenção e presteza durante os anos de pós-graduação.

À FAPEPI, por disponibilizar recursos financeiros e bolsa de fomento, durante o período de pós-graduação.

“Poucos aceitam o fardo da própria vitória,
a maioria desiste dos sonhos quando eles se tornam possíveis.”
(Paulo Coelho)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. ESTRUTURA ESPERMÁTICA.....	16
2.2. CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL.....	19
2.3. CRIOINJÚRIAS	20
2.4. CRIOPROTETORES	21
2.4.1. CRIOPROTETORES EXTRACELULARES.....	22
2.4.2. CRIOPROTETORES INTRACELULARES.....	23
2.5. HIDROXIPROPILMETILCELULOSE (HMPC)	26
2.6. GOMA DE CAJAZEIRA.....	27
2.7. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO SEMINAL	30
2.7.1. TESTE DE TERMORRESISTÊNCIA (TTR)	30
2.7.2. MORFOLOGIA ESPERMÁTICA.....	31
2.7.3. TESTE DE EXPANSÃO HIPOSMÓTICA	31
2.7.4 INTEGRIDADE DE MEMBRANAS.....	31
2.7.5. PRODUÇÃO IN VITRO (PIV)	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
CAPÍTULO I.....	43
CAPÍTULO II	58
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1 - Média e desvio-padrão do percentual de Motilidade Total e Vigor do sêmen criopreservado de bovinos, avaliados pelo teste de termorresistência rápido (TTRR).....	50
Tabela 2 - Integridade da membrana plasmática e atividade mitocondrial pós-descongelação de sêmen criopreservado acrescidos de diferentes concentrações de hidroxipropilmetilcelulose.....	51
Tabela 3 - Avaliação da expansão hiposmótica do sêmen criopreservado de bovinos, avaliados pelo teste de expansão hiposmótica.....	51
Tabela 4 - Avaliação da morfologia espermática de sêmen criopreservado em diluidor acrescido de diferentes concentrações de hidroxipropilmetilcelulose.....	52
Tabela 5 - Taxas de fertilização in vitro com espermatozoides criopreservados em meio de congelamento acrescido de diferentes concentrações de hidroxipropilmetilcelulose.....	52

Capítulo II

Tabela 1 - Média e desvio-padrão do percentual de Motilidade Total e Vigor do sêmen criopreservado de bovinos, avaliados pelo teste de termorresistência rápido (TTRR).....	66
Tabela 2 - Integridade da membrana plasmática e atividade mitocondrial pós-descongelação de sêmen criopreservado acrescidos de diferentes concentrações de hidroxipropilmetilcelulose.....	66
Tabela 3 - Avaliação da expansão hiposmótica do sêmen criopreservado de bovinos, avaliados pelo teste de expansão hiposmótica.....	67
Tabela 4 - Avaliação da morfologia espermática de sêmen criopreservado em diluidor acrescido de diferentes concentrações de goma de cajá.....	67
Tabela 5 - Taxas de fertilização in vitro com espermatozoides criopreservados em meio de congelamento acrescido de diferentes concentrações de hidroxipropilmetilcelulose.....	67

LISTA DE ABREVIACÕES

µl – Microlitro

µm – Micrômetros

µM – Micromol

DIC – Diacetato de carboxifluoresceína

DNA – Ácido desoxirribonucleico

IP – Iodeto de propídio

JC-1 – Iodeto de tetraetilbenzimidazolil carbocianina

mL – Mililitro

MP – Membrana plasmática

°C – Graus Celsius

CAT – Catalase

CPD – Curraleiro Pé-Duro

VIG – Vigor

M.M. - Membrana Mitocondrial

MOT – Motilidade total

M.P. – Membrana Plasmática

% - Porcentagem

HPMC - Hidroxipropilmetilcelulose

GC - Goma de cajá

DMSO – Dimetilsulfóxido

FITC-PNA – Isotiocianato de Fluoresceína Conjugada a *Peanut agglutini*

TTR - Teste de Termorresistência

TTRR - Teste de Termorresistência Rápido

RESUMO

Objetivou-se avaliar e comparar as características de qualidade de sêmen criopreservado com diferentes concentrações de hidroxipropilmetilcelulose e goma de cajá. Foram coletados sete touros em triplicata, por eletroejaculação e avaliado quanto aos aspectos macroscópicos e microscópicos. As amostras foram submetidas a diluição em meio de criopreservação Tris-gema com e sem glicerol, divididas em dois experimentos. O experimento I sendo subdividido nos tratamentos: Controle: Tris-Gema + 6% glicerol; T1: Tris-Gema + 3% glicerol; T2: Tris-Gema + 0% glicerol; T3: Tris-Gema + 0,5% HPMC; T4: Tris-Gema + 1,0% HPMC; T5: Tris-Gema + 1,5% HPMC e T6: Tris-Gema + 5,5% glicerol + 0,5% HPMC; E, o experimento II, dividido nos grupos: Controle: Tris-Gema + 6% glicerol; T1: Tris-Gema + 3% glicerol; T2: Tris-Gema + 0% glicerol; T3: Tris-Gema + 0,5% goma de cajá; T4: Tris-Gema + 1,5% goma de cajá; T5: Tris-Gema + 5,5% glicerol + 0,5% goma de cajá; As amostras foram congeladas e após descongelamento foram avaliadas quanto aos testes de termorresistência rápido (TTRR), morfologia espermática, integridade de membrana plasmática, atividade mitocondrial e teste de fertilização in vitro. Para análise de dados foram utilizados os procedimentos usuais de estatística descritiva, tais como distribuição de frequência absoluta (n) e relativa (%), média e desvio padrão, bem como o teste Shapiro-Wilk para verificar se os dados seguiram distribuição normal. Para os dados sem distribuição normal foi utilizado a transformação pela fórmula $\text{arc.sen}(\sqrt{x/100})$. Os dados de membrana plasmática, atividade mitocondrial e expansão hiposmótica, foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e para as análises de produção in vitro, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Os dados foram digitados no Excel e analisados a nível de significância de 5% ($p < 0,05$), no programa InfoStat versão 2008. O TTRR do Experimento I e II demonstraram que o grupo controle apresentou melhores resultados de motilidade e vigor nos tempos 0', 15' e 30' quando comparado com os respectivos tratamentos experimentais. O grupo T6 do Experimento I apresentou melhores resultados de motilidade e vigor que os demais grupos acrescidos de 0,5%, 1,0% e 1,5% de HPMC ao diluidor. O grupo T5 do Experimento II apresentou melhores resultados de motilidade e vigor que os demais grupos acrescidos de goma de cajá ao diluidor seminal. Em ambos os experimentos, não houve diferença significativa no tempo 45' do TTRR, nos testes de expansão hiposmótica, morfologia espermática, integridade de membrana, atividade mitocondrial e taxa de fertilização in vitro com espermatozoides criopreservados em meio de congelamento acrescido de diferentes concentrações de hidroxipropilmetilcelulose e goma de cajá.

Palavras-chave: andrologia; espermatozoides; diluidor; goma; bovino.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate and compare the quality characteristics of cryopreserved semen with different concentrations of hydroxypropylmethylcellulose and cashew gum. Seven bulls were collected in triplicate by electroejaculation and evaluated for macroscopic and microscopic aspects. The samples were subjected to dilution in Tris-yolk cryopreservation medium with and without glycerol, divided into two experiments. Experiment I was subdivided into the following treatments: Control: Tris-Yolk + 6% glycerol; T1: Tris-Yolk + 3% glycerol; T2: Tris-Yolk + 0% glycerol; T3: Tris-Yolk + 0.5% HPMC; T4: Tris-Yolk + 1.0% HPMC; T5: Tris-Yolk + 1.5% HPMC and T6: Tris-Yolk + 5.5% glycerol + 0.5% HPMC; And, experiment II, divided into groups: Control: Tris-Yolk + 6% glycerol; T1: Tris-Yolk + 3% glycerol; T2: Tris-Yolk + 0% glycerol; T3: Tris-Yolk + 0.5% cajá gum; T4: Tris-Yolk + 1.5% cajá gum; T5: Tris-Yolk + 5.5% glycerol + 0.5% cajá gum; The samples were frozen and after thawing they were evaluated for rapid thermoresistance tests (RRT), sperm morphology, plasma membrane integrity, mitochondrial activity and in vitro fertilization test. For data analysis, the usual descriptive statistics procedures were used, such as absolute (n) and relative (%) frequency distribution, mean and standard deviation, as well as the Shapiro-Wilk test to verify whether the data followed a normal distribution. For data without normal distribution, transformation by the formula $\text{arc.sen}(\sqrt{x/100})$ was used. Data on plasma membrane, mitochondrial activity and hyposmotic expansion were subjected to analysis of variance (ANOVA), and the Kruskal-Wallis test was applied for in vitro production analyses. Data were entered into Excel and analyzed at a significance level of 5% ($p < 0.05$) using the InfoStat program, version 2008. The TTRR of Experiments I and II demonstrated that the control group presented better motility and vigor results at times 0', 15' and 30' when compared with the respective experimental treatments. Group T6 of Experiment I presented better motility and vigor results than the other groups added with 0.5%, 1.0% and 1.5% of HPMC to the extender. Group T5 of Experiment II showed better motility and vigor results than the other groups that added cashew gum to the seminal extender. In both experiments, there was no significant difference in the 45' time of the TTRR, in the hyposmotic expansion tests, sperm morphology, membrane integrity, mitochondrial activity and in vitro fertilization rate with sperm cryopreserved in freezing medium added with different concentrations of hydroxypropylmethyl cellulose and cashew gum.

Keywords: andrology; sperm; diluter; gum; bovine.

1. INTRODUÇÃO

As biotecnologias da reprodução são ferramentas utilizadas na busca pelo aceleramento do melhoramento genético e replicação das características desejadas pelos bovinocultores em seus rebanhos, viabilizando a obtenção de animais geneticamente superiores (Oliveira, 2014). Dentre essas biotecnologias, a inseminação artificial, utilizando sêmen criopreservado em bovinos, é uma forma de manejo comum para aperfeiçoar a genética do rebanho, ocasionando assim um aumento da produtividade (Boni, 2012).

No entanto, as técnicas de criopreservação de sêmen podem provocar alguns danos na estrutura celular que advém de alguns fatores como formação intracelular de cristais de gelo e diminuição da temperatura antes do congelamento (Felippelli et al., 2023; Zeron et al., 1999). Tendo em vista isso, alguns diluentes são testados, a fim de se obter maior qualidade e durabilidade dos espermatozóides, na tentativa de potencializar o material genético dos animais (Silva et al, 2011).

Segundo Valverde (2016), uma forma de melhoramento da técnica de criopreservação é a utilização de polissacarídeos naturais e atóxicos, que através de matérias primas renováveis sejam preparados e tenham características que possibilitem a preservação do sêmen após a conservação em baixas temperaturas e diminuam os danos ocasionados pela criopreservação.

Dentre os compostos que possuem potencial para redução dos efeitos deletérios da criopreservação, surge o hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), obtido a partir da derivação da celulose utilizando cloreto de metila e óxido de propileno como reagente (Marani, 2015). O HPMC possui características anfífilas, capacidade de formar gel em meio aquoso, bem como atoxicidade e capacidade de acomodar elevadas quantidades de fármacos, fazendo com que seu uso seja muito apreciado em diversas aplicações tecnológicas, inclusive em matrizes de liberação controlada de fármacos (Baumgartner et al. 2000; Vueba et al., 2004).

Além do hidroxipropilmetilcelulose, outra potencialidade é a goma de cajá estudada por Moura (2013), que demonstrou ter o pó de cajá, percentual de solubilidade, e propriedades secundárias, tais como estabilização de emulsões, suspensão de partículas, controle de cristalização, inibição de sinérese, encapsulação e formação de filmes.

Neste cenário, devido à necessidade de ampliar conhecimentos relacionados aos procedimentos de criopreservação do sêmen, promover a inclusão de crioprotetores em associação ou substituição do glicerol nos extensores seminais, com a finalidade de aumentar a capacidade fertilizante dessas células, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de hidroxipropilmetilcelulose e da goma de cajá na criopreservação do sêmen de bovino.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ESTRUTURA ESPERMÁTICA

As células germinativas possuem origem primária extra-gonadal, a partir do saco vitelínico mesentérico, sendo células móveis e altamente invasivas, que migram do saco vitelino para a crista genital, dando origem aos cordões gonadais. Ao nascimento do animal, o parênquima testicular é constituído por cordões seminíferos, formados por células de Sertoli e gonócitos, envolvidos por uma camada de musculatura lisa, as células mióides. O interstício é composto principalmente por células de Leydig, células do tecido conjuntivo e vasos sanguíneos (Avelar et al., 2010).

A produção do gameta masculino, envolve os processos de divisão celular e diferenciação, pelos quais os espermatozoides são produzidos nos testículos (Staub e Johnson, 2018) e esse processo é denominado de espermatogênese. A espermatogênese divide-se nas fases de espermatocitogênese (fase de proliferação), que consiste em todas as divisões meióticas e mitóticas das várias gerações de espermatogônias e espermatócitos, fase de espermiogênese (fase de diferenciação), na qual ocorre uma série de transformações resultando na produção do espermatozoide, contendo uma cabeça (material nuclear), uma peça intermédia (hélice mitocondrial) e um flagelo (Senger, 2003) e na fase de liberação de células germinativas formadas para a luz dos túbulos seminíferos, conhecida por fase de espermiação (Schlatt e Ehmcke, 2014).

O percurso no trato reprodutivo feminino, acarreta a interação de cada estrutura com o meio, desta forma as enzimas do acrossoma e suas membranas, são essenciais para a fertilização oocitária, assim como a motilidade espermática, alcançada mediante a energia produzida pelo flagelo. Tais eventos são necessários para a junção dos pronúcleos haploides, masculino e feminino, no processo de fertilização, gerando a produção do zigoto, o qual por diante iniciará seu desenvolvimento. (Kelly e Trasler, 2004).

Em mamíferos, os espermatozoides são células alongadas formadas por uma cabeça contendo um núcleo achatado e de forma oval com a cromatina altamente condensada com a sua extremidade anterior recoberto pelo acrossoma, e uma cauda composta de colo e peças intermediária, principal e terminal, necessário para a motilidade celular (Hafez e Hafez, 2004). Os espermatozoides bovinos apresentam cerca de 75 a 90 µm de comprimento, com a

cabeça medindo cerca de 4,25 μm de largura, 9,15 de comprimento e 0,5 μm de espessura, recoberto pela membrana plasmática, constituída por proteínas e lipídios. (Pesch e Bergmann, 2006).

A membrana plasmática é o componente mais externo do espermatozoide que o envolve completamente, sendo contínua sobre a superfície e diferindo regionalmente (Flesh e Gadella, 2000; Khosro Beygi e Zarghami, 2007). É uma estrutura fina, flexível, autosselante e seletivamente permeável aos solutos polares, com espessura de apenas 7,5 a 10nm, formada quase que inteiramente por proteínas e lipídios (Guyton e Hall, 1997), sendo que proporções relativas desses componentes são distintas em diferentes tipos de membranas (Lehninger et al., 2000) e os mesmos facilitam o transporte de glicose e de frutose do meio extracelular para o espermatozoide (Schurmann et al., 2002).

A membrana plasmática dos espermatozoides em mamíferos tem uma pronunciada organização de domínios com muitos antígenos glicoprotéicos (Wolfe et al., 1998). Na cabeça do espermatozóide, a membrana plasmática possui dois domínios maiores: região acrossomal e região pós-acrossomal (Eddy, 2006; O'Brien, 1994).

A cabeça do espermatozoide possui como característica principal a presença do núcleo achatado de forma oval, contendo a cromatina altamente compactada. A cromatina condensada compreende um complexo de DNA com uma classe especial de proteínas conhecidas como protaminas. A extremidade anterior do núcleo espermático é recoberta pelo acrossomo, formado por uma dupla camada de membranas que envolvem intimamente o núcleo durante os últimos estágios de formação do espermatozoide (Hafez, 1995).

Toda a característica estrutural especializada do espermatozóide está voltada para a sua atividade funcional única, ou seja, assegurar a liberação do material genético contido no núcleo do espermatozóide para o oócito, onde a união dos pronúcleos masculino e feminino ocorre, produzindo o zigoto (Eddy, 2006; O'Brien, 1994). Desta forma, a função principal da cabeça do espermatozóide é a liberação de uma série haploide de cromossomos para o oócito (Mortimer, 1997).

O acrossomo situa-se nos primeiros dois terços da cabeça, o qual se origina-se do complexo de Golgi, durante a espermatogênese e atua como um tampão sobre o núcleo (Pesch e Bergmann, 2006). Essa estrutura contém enzimas hidrolíticas incluindo pró-acrosina,

hialuronidase, esterases, e hidrolases ácidas, envolvidas no processo de fecundação, sendo essenciais para a lise da zona pelúcia e penetração da corona radiata do oócito. Elas são liberadas durante a reação acrossômica quando a membrana exterior acrosomal se funde com a membrana plasmática (Rovan, 2001).

O colo do espermatozoide representa a pequena área de ligação entre a cabeça e a peça intermediária do flagelo (Mies Filho, 1987). Está ligado anteriormente à placa basal, uma densa placa aderente ao exterior da membrana nuclear do envelope nuclear, e posteriormente às fibras densas externas do flagelo, apresentando aproximadamente 1µm de comprimento, variando também em relação a sua forma, que é alongado no eixo transversal da cabeça (Eddy, 2006; Pesch e Bergmann, 2006).

O flagelo corresponde à parte mais longa do espermatozoide, formada pelas peças intermediária, principal e terminal (Singh, 2006). A peça intermediária é de estrutura complexa e caracterizada pela presença da bainha mitocondrial (Mies Filho, 1987; Carvalho et al., 2002), responsável pela geração da energia utilizada pelo axonema para execução dos movimentos flagelares (Carvalho et al., 2002; Hafez e Hafez, 2004; Singh, 2006), essenciais para que os espermatozoides de mamíferos alcancem o local da fertilização e possam dar início a este processo (Pesch e Bergmann, 2006).

Na porção intermediária há nove fibras densas externas ao redor do axonema, uma para cada um dos nove microtúbulos duplos, de aproximadamente 20nm de diâmetro, que o compõem. Conectado à membrana plasmática, no final da peça intermediária, há um anel proteico, o ânulo, que evita o deslocamento das mitocôndrias durante o batimento flagelar (Gibbons, 1981; Montanari, 2013). O flagelo dos espermatozoides mamíferos, apresenta formato cilindro e delgado, são compridos, com tamanho médio que varia de 50-100 µm de comprimento e 0,5 a 1 µm de diâmetro, e apresentam uma estrutura principal de 200 nm de diâmetro chamado de axonema (Gibbons, 1981).

Abaixo do ânulo, conectado à membrana plasmática, no final da peça intermediária, há a peça principal, a maior parte do flagelo, a qual possui o axonema, sete fibras densas externas e a baixa fibrosa que contém queratina e confere certa rigidez ao flagelo. A última parte da cauda é a peça terminal, ela não apresenta fibras, somente o axonema recoberto por membrana plasmática (Hafez, 1995).

2.2. CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL

O congelamento de sêmen consiste em uma técnica com objetivo de armazenar e preservar amostras de sêmen, em botijões de nitrogênio à -196°C , por período indeterminado, para serem utilizadas futuramente (Amirat et al., 2004; Alves Junior, 2023). Vários aspectos da criopreservação espermática têm sido estudados, tais como a composição química dos diluentes e seus efeitos sobre a membrana plasmática, limites de tolerância osmótica, condutividade hídrica e a permeabilidade dos crioprotetores (Gilmore et al., 2000; Carrer, 2022).

A técnica adequada de criopreservação é decisiva para um desenvolvimento embrionário inicial normal, para a minimização dos danos em organelas e membranas, além da redução de interferências na capacitação e maturação espermática, assim como na reação acrossomal (Watson, 1995; Garner et al., 2001; Kumar et al., 2003). Spallanzani, em 1776, foi o primeiro a observar que a atividade metabólica dos espermatozóides era reduzida com a diminuição da temperatura, permitindo que estes fossem armazenados por um período de tempo superior ao observado em temperatura ambiente (England e Plummer, 1993). Posteriormente, Polge et al. (1949) descreveram a ação crioprotetora do glicerol, o que proporcionou um impacto significativo nos protocolos de congelação.

Os métodos de congelação incluem etapas como a diluição, refrigeração, penetração do crioprotetor, envasamento, congelação, armazenamento e descongelação (Hammerstedt et al., 1990). Existem diversas aplicações biotecnológicas para a criopreservação em diferentes campos, sendo a preservação de células um dos principais destaques. Essas células possuem grande utilidade em áreas como medicina humana, veterinária e aquicultura (Cruz, 2022).

No entanto, estudos sugerem que a criopreservação pode gerar danos irreversíveis aos espermatozóides, evidenciando que, se a taxa de congelação não for reduzida corretamente, todas as células serão danificadas quando submetidas à temperatura de -80°C (Polge, 1957), considerando a zona crítica de temperatura para a congelação entre -15 a -30°C (Polge, 1957) e 20 a 0°C (Salomon e Maxwell, 1995; Salomon e Maxwell, 2000).

Nesse sentido, foi observado que a curva lenta de refrigeração apresentou melhores resultados de motilidade espermática pós-descongelação quando comparada à curva rápida (Kumar et al., 2003; Santos et al., 2003), isso porque durante a refrigeração rápida, o tempo disponível para desidratação dos espermatozoides é reduzido, o que aumenta a possibilidade

de formação de cristais de gelo intracelulares e consequentes danos irreversíveis à célula, como sugerido por Muldrew e Mc Gann (1994) e Gao e Citser (2000). Já na congelação lenta, a desidratação celular ocorre devido ao meio extracelular hipertônico, eliminando a formação de grandes cristais de gelo intracelulares que prejudicam a integridade celular.

2.3. CRIOINJÚRIAS

Os danos causados às células espermáticas durante o processo de criopreservação, reduzem a quantidade de células viáveis, bem como sua capacidade funcional. As lesões ocasionadas têm sido atribuídas à variação de temperatura, aos danos oxidativos, às alterações de membrana e DNA, além da toxicidade de crioprotetores e do estresse osmótico (Yeste, 2017; Carrer, 2022).

Embora seja um procedimento rotineiro, os protocolos de congelação utilizados ainda resultam em considerável número de espermatozóides que não resistem ao processo, o que compromete a fecundação do ovócito (Najy et al., 2004). A composição do meio diluidor e crioprotetores, taxas de congelação/descongelação e remoção dos crioprotetores (Leite et al., 2011), são fatores que influenciam na sobrevivência das células espermáticas. Mesmo sob as melhores condições de criopreservação, cerca de metade da população inicialmente móvel morre após a descongelação e, naquela que sobrevive podem ocorrer alterações que comprometem a atividade funcional dos espermatozóides descongelados (Medeiros, 2002).

A redução da temperatura leva à fase de transição dos lipídeos da membrana, passando da fase líquida ou fluida para a cristalina ou gel, resultando em uma organização mais rígida da membrana (Watson, 2000). O congelamento das células espermáticas também pode gerar fraturas na área do colo, conexão entre cabeça e cauda, quando a membrana do envelope nuclear que reveste a fossa de implantação contém uma população densa de grandes partículas intramembranas espaçadas em torno de uma região livre de partículas centrais (Eddy, 2006).

Outro aspecto a ser considerado é a presença no plasma seminal, dentre outras, das proteínas BSP-A1/-A2, BSP-A3 e BSP-30 kDa, coletivamente denominadas de *bovine seminal proteins* (BSP). Estas constituem um grupo de moléculas que se liga aos fosfolipídeos da membrana espermática e atuam como fatores reguladores da capacitação espermática, estimulando o efluxo de colesterol e lipoproteínas da membrana plasmática. A preservação do

plasma seminal à congelação expõe os espermatozóides às BSP e estas, ao promoverem o efluxo de colesterol, tornam os gametas mais suscetíveis à criopreservação. Tal efeito pode ser minimizado pelas lipoproteínas de baixa densidade presentes nos crioprotetores extracelulares como a gema de ovo, pois estas se ligam de forma estável às BSP impedindo sua ação prejudicial sobre a membrana plasmática (Manjunath, 2002).

Além das mudanças físicas, os fosfolípidos da membrana durante o resfriamento, sofrem influência sobre a regulação do influxo de cálcio, com graves consequências em termos de função celular, podendo até ser incompatível com a viabilidade do espermatozóide. O influxo de cálcio durante o resfriamento contribui tanto para o início da capacitação quanto para o início da reação acrossemia, evento no qual ocorre a fusão das membranas plasmática e acrossomal externa (Leite et al., 2011).

Desta forma o processo de criopreservação do sêmen, necessita que o diluente, acrescido de crioprotetores, utilizado garanta proteção contra os choques térmicos e osmóticos que ocorrem durante o processo de congelamento e descongelamento. Sendo que o estudo dos crioprotetores pode ser uma alternativa para garantir a melhoria efetiva nos índices de congelabilidade dos ejaculados para saber qual o meio diluidor apresenta melhores resultados pós criopreservação, garantindo maior fertilidade do sêmen depois de processado e evitando desperdícios (Watson, 2000).

2.4. CRIOPROTETORES

Denomina-se crioprotetor qualquer substância que ofereça, temporariamente, energia, e proteção contra os danos ocasionados pela redução de temperatura e manutenção de ambiente favorável à sobrevivência da célula armazenada (Purdy, 2006). Nesse sentido, com o intuito de reduzir os danos causados às células durante o processo de criopreservação, diversas substâncias foram estudadas e mostraram-se bons crioprotetores.

Os crioprotetores utilizados na congelação de sêmen das mais variadas espécies têm a função de evitar a formação de cristais de gelo intracelular, reduzir o estresse osmótico por meio da reposição de água necessária para manutenção do volume celular, interagir com íons e macromoléculas, reduzir o ponto de congelação da água, assim como servir de tampão para ajustes de possíveis alterações do potencial de hidrogênio - pH (Medeiros et al., 2002).

Os componentes do diluente de criopreservação são classificados como extracelulares ou não penetrantes, os quais são representados por macromoléculas com peso molecular elevado, tais como açúcares complexos (rafinose, trealose), lipoproteínas da gema do ovo, água de coco (Nunes, 2002), proteínas do leite e alguns aminoácidos, que atuam por meio de efeito osmótico, induzindo a saída de água do interior da célula e prevenindo a formação de cristais de gelo no meio intracelular (Amann e Pickett, 1987) e intracelulares ou penetrantes, os quais foram classificados por Ashwood-Smith (1987) em dois grupos: alcoólicos e amidas (Alvarenga et al., 2005).

Dentre os crioprotetores alcoólicos utilizados para a preservação espermática, destacam-se, especialmente, o glicerol, o etilenoglicol e o DMSO (Fickel et al., 2007); entre as amidas, citam-se a acetamida, a lactamida (Kashiwazaki et al., 2006), a dimetilformamida (Oliveira et al., 2006) e a dimetilacetamida (Calderam et al., 2008). Os crioprotetores penetrantes são substâncias que têm a capacidade de proteção intracelular das células espermáticas. O mecanismo de ação destes crioprotetores baseia-se em estruturas que promovem ligações de hidrogênio com as moléculas da água. Estas ligações mudam a orientação da molécula da água nos cristais de gelo, criando um ambiente menos nocivo para as células (Alberti, 2007).

2.4.1. CRIOPROTETORES EXTRACELULARES

Açúcares, proteínas e polímeros sintéticos são crioprotetores extracelulares, ou seja, não conseguem penetrar na célula espermática. Ao agir no meio extracelular, aumentando a pressão osmótica, induzem a desidratação da célula, diminuindo a formação de cristais de gelo intracelular (Celeghini, 2008). Os mais comuns são os açúcares, o leite e a gema de ovo. Porém, uma desvantagem do uso da gema de ovo ou leite é o risco de contaminação por patógenos associados aos produtos de origem animal, além da dificuldade de padronizar o meio diluente (Thun, 2002; Muiño, 2007).

A composição da gema do ovo é bastante variável, uma vez que é um composto de origem animal e que pode ter diferentes composições de acordo com as práticas de manejo alimentar utilizadas na criação das aves (Braga et al., 2005; Ribeiro et al., 2007). Segundo Barreto et al. (2006), a gema do ovo apresenta a seguinte composição: 49,0% de umidade e 51,0% de sólidos totais, sendo que, destes, 30,9% são lipídeos totais. Todavia, a gema de ovo

não é inteiramente definida, sendo um composto biológico que contém proteínas, vitaminas, fosfolípidos, glicose, componentes bactericidas e antioxidantes (Houpalathi et al., 2007). A gema do ovo começou a ser estudada na criopreservação de sêmen da espécie bovina (Phillips e Lardy, 1940), apresentando resultados satisfatórios, quando comparados aos meios suplementados apenas com glicose, com aumento considerável da viabilidade espermática.

Segundo Holt (2000), a principal função protetora da gema de ovo é estabilizar as membranas biológicas, minimizando os efeitos negativos do choque térmico. Watson (1976), avaliando o comportamento das células espermáticas criopreservadas de carneiros e bovinos, sugeriu que uma parte da gema de ovo, chamada de fração de baixa densidade (LDF), era responsável pela proteção dos espermatozoides destas espécies e concluiu que estes fosfolípidos fornecem proteção à membrana da célula espermática, uma vez que a proteína da LDF serviria para solubilizar os lípidos e incorporá-los à membrana celular (Watson, 1981).

Posteriormente, Bergeron et al. (2007), na criopreservação de sêmen bovino com diluentes à base de gema de ovo ou leite, afirmaram que, da mesma forma que a gema de ovo, as caseínas do leite reduzem a ligação das proteínas do plasma aos espermatozoides, minimizando a perda de lípidos da membrana plasmática durante os procedimentos de criopreservação e aumentando a proteção espermática durante a refrigeração e a congelação/descongelação. Ao contrário da gema de ovo, o efeito protetor do leite sobre a célula espermática envolve proteínas ao invés de lípidos.

2.4.2. CRIOPROTETORES INTRACELULARES

Os crioprotetores intracelulares são solutos que atuam tanto interna quanto externamente no espermatozoide, desidratando a célula espermática devido ao efluxo de água intracelular para equilibrar o meio extracelular. Esta categoria de crioprotetores penetra na membrana celular por meio de difusão passiva, permanecendo na membrana e no citoplasma, uma vez que, semelhante aos agentes não penetrantes, atua na desidratação celular por meio do seu efeito osmótico, criando um meio hipertônico que induz a saída de água das células espermáticas (Purdy, 2006).

O crioprotetor intracelular mais utilizado na congelação do sêmen bovino é o glicerol., que através do processo de desidratação, reduz o ponto de congelação da célula, resultando

em menor formação de gelo intracelular e consequente manutenção da sobrevivência e fertilidade dos espermatozoides (Purdy, 2006). O glicerol é um álcool que contém três grupos de hidroxila ligados a uma cadeia com três átomos de carbono. É uma substância capaz de penetrar na membrana celular por difusão passiva. Sua principal ação na criopreservação é inibir a formação de cristais de gelo dentro da célula (Fracaro, 2022).

Conforme Watson (1979), essa substância atua através de propriedade coligativa com a água, na qual, uma solução com glicerol, dispõe de mais água não congelada do que outra sem o glicerol, aumentando o volume dos canais de solventes não congelados, reduzindo a concentração de sais das porções não congeladas. Portanto, age tanto como solvente quanto como soluto. Kundu et al., (2000) hipotetizaram que o mecanismo de ação do glicerol representa a ligação dos átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila do glicerol com os átomos de oxigênio dos grupos fosfatos dos fosfolipídios da membrana plasmática dos espermatozoides promovendo assim, uma estabilização da membrana durante o processo de criopreservação.

Além disso, o glicerol modifica a formação de cristais de gelo, reduzindo a lesão mecânica dos espermatozoides durante a cristalização, uma vez que penetra na célula e substitui parcialmente seu conteúdo de água e de eletrólitos (Singh, 2006). O glicerol atua também, reduzindo o estresse osmótico através da reposição de água necessária para manutenção do volume celular, das interações com íons e macromoléculas, assim como pela redução do ponto de congelamento da água.

Polge et al. (1949) ao avaliar a atividade dos espermatozoides após vitrificação e desidratação em baixas temperaturas, observaram que bons resultados foram obtidos com o glicerol, como agente crioprotetor para congelação de células espermáticas de aves, e na congelação do sêmen bovino. Observaram também em seus estudos que o glicerol evita que as células morram enquanto são congeladas.

Outros crioprotetores intracelulares utilizados em menor escala são o etilenoglicol e o dimetilsulfóxido. O etilenoglicol (monoetileno glicol; etano-1, 2-diol) é um álcool com dois grupos-OH, um composto químico largamente utilizado como um anticongelante automotivo. Na sua forma pura é um composto inodoro, incolor, xaroposo líquido, de sabor doce e com massa molecular 62 g/mol (Fernandes et al., 2002). Segundo Moraes et al. (1998), o

etilenoglicol tem sido apontado como alternativa, devido a sua capacidade crioprotetora, determinando maior proteção do acrossoma e das membranas espermáticas de espermatozoides ovinos, quando comparado ao glicerol.

Entretanto, quando utilizado em elevadas concentrações, este álcool apresenta efeito deletério na conservação dos espermatozoides, observado após criopreservação de espermatozoides ovinos a 0,7 M (Moraes et al., 1998) e em espermatozoides caprinos com diluentes a 7% de etilenoglicol (Souza et al., 2002). Estes estudos ressaltam a necessidade de menores concentrações deste álcool em relação às concentrações usuais de glicerol (5-7%) para obtenção de índices ideais de criopreservação para o sêmen ovino (Moraes et al., 1998), uma vez que elevadas concentrações deste crioprotetor determinam efeito tóxico sobre os espermatozoides (Bittencourt et al., 2004).

O dimetilsulfóxido (DMSO), composto químico orgânico de fórmula C_2H_6SO e peso molecular 78 g/mol (Fernandes et al., 2002), possui ação crioprotetora através da sua capacidade de interagir ou combinar com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos, proteínas e muitas drogas sem alterar de forma irreversível a configuração molecular (Sojka et al., 1990), devido a sua rápida penetração celular, sendo um solvente penetrante (Stedman, 2003).

Apesar de o mecanismo de ação não estar totalmente elucidado na célula espermática, é sabido que o DMSO interage com os fosfolipídeos estruturais da membrana espermática, mantendo a propriedade de transporte de água em temperaturas abaixo do 0°C, reduzindo a formação de cristais de gelo, por diminuir o ponto de congelamento do fluido intracelular durante o processo de criopreservação (Thirumala et al., 2006). Porém, a substância apresenta toxicidade reconhecida conforme Stone (1993).

A toxicidade dos crioprotetores penetrantes, relatada por muitos autores (Bittencourt et al., 2004)), parece causar desnaturação das proteínas, alteração nas interações de actina, além de ocasionar mudanças nos eventos citoplasmáticos devido ao aumento da viscosidade pelo glicerol intracelular, modificações na polimerização da tubulina, na associação de microtúbulos, atuação direta na membrana plasmática e nas proteínas da superfície celular (Alvarenga et al., 2000). Como consequência, têm-se desenvolvido inúmeras investigações com o objetivo de identificar crioprotetores alternativos (Silva et al., 2012).

2.5. HIDROXIPROPILMETILCELULOSE (HMPC)

O hidroxipropilmetilcelulose é um éter de celulose que possui estrutura variável dependendo da quantidade de grupos metila, apolares, e hidroxipropoxila, polares, inseridos na cadeia polimérica celulósica. A polaridade do polímero é controlada através da quantidade de grupos metila e de hidroxipropoxila (Marani, 2015). Funcionalmente, pode ser utilizado como agente de revestimento, cobertura; formador de película; agente estabilizador; agente de suspensão; unificador de comprimidos; agente de incremento da viscosidade (Martindale, 2007).

Os polímeros sintéticos são considerados crioprotetores extracelulares por não conseguirem penetrar na célula espermática. Os crioprotetores não penetrantes protegem as células basicamente através de efeitos osmóticos, isto é, em meio hipertônico, as células perdem seu conteúdo de água, o que diminui a possibilidade de formação de cristais dentro da célula. Estes componentes agem como solutos ou colóides, não servindo como solventes (Graham, 1996; Celeghini, 2008).

Alguns polímeros sintéticos vêm sendo utilizados nos diluentes para congelamento de embriões equinos (Curcio, 2005) e oócitos suínos (Macedo Jr et al., 2006), equinos (Leon, 2008), bovinos (Santos, 2008) e de camundongos (Fahy et al., 2004; Santos, 2008) com a finalidade de bloquear a formação de gelo (Wowk et al., 2000), impedindo que ocorram danos à membrana plasmática. No entanto, a adição do hidroxipropilmetilcelulose nos diluentes para criopreservação de sêmen bovino ainda não foi reportada na literatura.

Em bovinos, os polímeros PVA, poliglicerol e PVP K-12 foram testados separadamente e comparados para a vitrificação de tecido ovariano juntamente com DMSO, EG e sacarose. A taxa de folículos morfológicamente normais foi maior nas amostras de PVA, embora a viabilidade e a função estivessem prejudicadas quando comparadas às amostras de PVP K-12. Os autores sugeriram que tecido ovariano bovino usando polímeros sintéticos pode ser preservado. No entanto, mais análises para confirmar a funcionalidade do uso de polímeros sintéticos na vitrificação de tecido ovariano bovino são necessárias (Shahsavari et al., 2020).

Wowk et al. (2000) propuseram o uso de polímeros sintéticos para evitar a formação de gelo intracelular. Estes mesmos autores sugeriram que os polímeros se assemelham em funcionalidade com as proteínas anticongelamento (AFPs) e com as glicoproteínas

anticongelamento (AGFPs), presentes em peixes polares e em alguns insetos, as quais permitem um super resfriamento dos fluídos corporais abaixo da temperatura de equilíbrio de congelamento. Entretanto, os polímeros apresentam menor custo e podem ser produzidos em larga quantidade, diferentemente das proteínas anticongelamento.

Os polímeros sintéticos também se relacionam com a redução da toxicidade dos crioprotetores, devido a sua capacidade de se fixar e inativar impurezas, as quais podem levar à formação de gelo em água ou outras soluções (Wowk et al., 2000). Carrol et al. (1993) relataram pela primeira vez que oócitos de camundongos podem ser criopreservados com sucesso utilizando PVA no meio criopreservação, no entanto, obtiveram baixa fecundação. Macedo et al., (2006) adicionaram 1% de polímero no meio de vitrificação e obtiveram bons resultados quanto ao teste de penetração in vitro de oócitos suínos vitrificados.

O HPMC possui característica anfifílica, e capacidade de formar gel em meio aquoso, assim como não ser tóxica, e por acomodar elevadas quantidades de fármacos (Vueba et al., 2004), o polímero é utilizado como matriz para liberação controlada de fármacos, desenvolvido por Baumgartner et al. (2000) e seu uso tem sido muito apreciado em diversas aplicações tecnológicas (Marani, 2015). O hidroxipropilmetilcelulose é amplamente empregado como retardante da liberação de fármacos em formulações orais, como também na implantação de lentes intraoculares na área da oftalmologia (Lopes et al., 2005).

Nesse sentido, a utilização de hidroxipropilmetilcelulose se justifica pelas suas características químicas, e funcionais aplicadas em diversas tecnologias e biotécnicas como, em células oculares, hemáticas, derme e epiderme (Villanova e Sá, 2007). Pois, embora imprescindíveis para a sobrevivência dos espermatozoides no processo de congelamento, algumas substâncias com características crioprotetoras utilizadas na criopreservação de outros tipos celulares são impróprios para a célula espermática e podem apresentar efeitos tóxicos, reduzindo a capacidade fertilizante deste gameta devido à lesão por danos osmóticos (Graham, 1996; Watson, 2000).

2.6. GOMA DE CAJAZEIRA

A cajazeira (*Spondias mombin* L.) é considerada uma espécie produtora de frutos comestíveis, nativa da América Tropical e origem amazônica. Amplamente dispersa no Brasil, com maior frequência e abundância nas regiões Norte e Nordeste. No Norte é conhecida popularmente como taperebazeiro e, nas demais regiões, como cajazeira. Ainda em fase de

domesticação, não existindo clones nem variedades disponíveis no mercado, ao longo do tempo, os agricultores buscam selecionar, dentro de áreas de cultivo e em populações naturais, genótipos que apresentam atributos de produtividade e de qualidade do fruto (EMBRAPA, 2024).

Trata-se de uma espécie arbórea, caducifólia, que atinge altura de até 30 m e diâmetro de copa e 24 m, em plantas com mais de 50 anos de idade. É propagada por sementes, estaquia e enxertia, principalmente pelo método de garfagem no topo, em fenda cheia. Quando propagada por sementes, inicia a frutificação entre cinco e seis anos após o plantio. Plantas oriundas de mudas enxertadas e de estacas de ramos são mais precoces, frutificando com idade de três a quatro anos, o cajá (Nascimento, 2020).

O cajá é um fruto cultivado em quase todo o Brasil, desde os tempos coloniais (Barbosa et al., 1981; Bosco et al., 2000). O fruto é extremamente aromático e rico em carotenoides, que dão à sua polpa uma intensa coloração amarela. Junto aos carotenoides, o cajá possui um elevado teor de taninos, que faz com que a polpa do fruto ganhe destaque como provável antioxidante natural, com atividades antioxidantes de 9397,3 g.g-1 pelo método de DPPH, (7,8 μ mol Trolox.g-1) por ABTS, (11,8 μ mol Fe₂SO₄.g-1) por FRAP, e (inibição da oxidação em 92,7%) pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico (Rufino, 2008).

Um rendimento considerável da polpa e valores razoáveis de açúcares, acidez, fibras, vitamina C e minerais, vêm demonstrando ser uma alternativa para o mercado de frutas, bem como para a agroindústria (Santos et al., 2010). Assim como o fruto, polpa e subprodutos, as gomas têm sido utilizadas na indústria farmacêutica devido as características físico-químicas e funcionais com capacidade de melhorar a atividade celular.

Na reprodução animal, dentre os aditivos testados para a preservação de gametas, observou-se que açúcares como a sacarose, a rafinose (Jafaroghli et al., 2011) e a trealose (Tonieto et al., 2010) atuam como protetores da membrana espermática. Outros agentes como a gelatina (Vanni et al., 2008; Corcini et al., 2011) e a goma-arábica (Platov, 1977 apud Salamon & Maxwell, 1994; Schmehl et al., 1986) também demonstraram efeito benéfico na preservação de sêmen mas não tiveram seu uso difundido, apesar dos seus potenciais benefícios.

As gomas são moléculas hidrofílicas ou hidrofóbicas de alta massa molar (polímeros de cadeia longa) que possuem propriedades coloidais (Whistler, 1973; Food Ingredients

Brasil, 2011). As gomas são hidrocolóides produto vegetal natural que podem ser classificados como polissacarídeos aniônicos, não iônicos ou como sal de polissacarídeos. São substâncias translúcidas e amorfas, frequentemente, obtidas de exsudatos de árvore, de sementes, de algas ou por fermentação microbiológica (Food Ingredients Brasil, 2011).

Os biopolímeros derivado das gomas, como exemplo, a goma de xantana, vem sendo utilizados na indústria de alimentos, cosméticos e petrolíferos. Na indústria de alimentos, ela ganha destaque para os alimentos congelados (Papagianni & Anastasiadou, 2009), pois diminui os danos causados pela formação dos cristais de gelo no processo de congelamento e descongelamento (Fernandez et al., 2007). Estudos toxicológicos e de segurança mostraram que a goma xantana não causa toxicidade aguda em animais de laboratório quando administrada de forma parenteral (Weber et al., 2008). As gomas possuem características pseudoplásticas, ou seja, a sua viscosidade diminui com o aumento da taxa de deformação do fluido.

Quimicamente as gomas são caracterizadas por apresentarem sempre ácidos urônicos, além de açúcares comuns, monossacarídeos, motivo pelo qual são classificadas como heteropolissacarídeos (Poser, 2007). As propriedades funcionais das gomas são afetadas pelo tamanho e orientação molecular, ligações iônicas e de hidrogênio, tamanho da partícula, temperatura, concentração dentre outros fatores (Food Ingredients Brasil, 2011).

As gomas naturais sofrem hidratação em água fria ou quente, formando dispersões coloidais, soluções altamente viscosas ou até mesmo géis. Suas impurezas mais frequentes são os sais inorgânicos e outras substâncias de baixa massa molar, além de proteínas, ligninas e ácidos nucleicos (Costa et al., 1996). Apresentam também propriedades secundárias, tais como estabilização de emulsões, suspensão de partículas, controle de cristalização, inibição de sinérese, encapsulação e formação de filmes (Food Ingredients Brasil, 2011).

Outro estudo trouxe o uso de diferentes gomas (arábica e tragacanto) como solução para obtenção de uma nanoemulsão estável para criopreservação de espermatozóides epididimários. Esta foi preparada com o óleo essencial de laranja e o polisorbato 80 pelo método de sonicação (Hashtjin & Abbasi, 2015). A adição de metodologias complementares e/ou adição de novos ingredientes à formulação se mostram como alternativas viáveis para melhoria da estabilidade das nanoemulsões formuladas com o óleo essencial da casca de

laranja e o polisorbato 80 (Brilhante, 2022). No entanto, demonstram-se ausentes dados sobre o uso da goma de cajá como aditivo crioprotetor para sêmen bovino.

2.7. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO SEMINAL

Para que o espermatozóide seja considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil é necessário que possua morfologia, metabolismo e membranas plasmáticas normais (Arruda et al., 2011). Consequentemente, a relação da qualidade do sêmen com a fertilidade é um dos pontos mais importantes do sistema de produção (Januskauskas et al., 2001).

A fertilização envolve um processo complexo (Õura; Toshimori, 1990), que para a célula espermática ser capaz de completar sua função, precisa, além de alcançar o local de fertilização, penetrar o ovócito e ativar o desenvolvimento embrionário (Braundmeier; Miller, 2001), o que requer muitos atributos dos espermatozoides (Arruda et al., 2011). A qualidade do sêmen depende da integridade e função de todas as estruturas que compõem a célula espermática, tais como membrana plasmática, flagelo, mitocôndrias, acrossomo e cromatina (Arruda et al., 2011).

2.7.1. TESTE DE TERMORRESISTÊNCIA (TTR)

Através do teste de termorrestência é possível observar o decréscimo na curva linear nos valores de motilidade e vigor com a progressão do tempo de incubação durante o teste de exaustão, acreditando-se muitas vezes, que este decréscimo ocorre por conta do maior consumo de suas substâncias nutritivas nos primeiros períodos do teste, além das perdas de componentes intracelulares ou de lesões estruturais na cauda dos espermatozoides, diminuindo sua viabilidade durante as duas primeiras horas (Barros et al., 2013).

O TTR possui sua fundamentação teórica relacionada à própria cronologia do processo de reprodução animal, no qual fêmeas iniciam sintomatologia de estro com aceitação da monta do macho previamente à ocorrência do processo ovulatório, exigindo que espermatozoides depositados no trato reprodutor feminino possuam longevidade e resiliência suficientes para acessar o ovócito feminino e realizar o processo de fertilização (Crespilho e Silva, 2024).

2.7.2. MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

De forma geral, as características morfológicas espermáticas são analisadas usualmente utilizando-se esfregaços corados ou a técnica da câmara úmida. A técnica da câmara úmida, na qual os espermatozóides não são corados, é realizada utilizando-se microscopia capaz de destacar os contornos celulares, como microscopia de contraste (Johnson et al., 1997; Celeghini, 2005).

A alta frequência de espermatozóides morfológicamente anormais ou a alta incidência de um único defeito podem reduzir a fertilidade. As anormalidades morfológicas são classificadas de diversas formas, sendo que algumas classificações dividem as alterações de acordo com a região da célula onde a mesma ocorreu como cabeça, peça intermediária ou cauda, e outras simplesmente dividem os defeitos em primários e secundários, ou defeitos maiores e menores (Howard e Pace, 1988).

2.7.3. TESTE DE EXPANSÃO HIPOSMÓTICA

O teste hiposmótico avalia a atividade bioquímica da membrana plasmática intacta, através do influxo de água para o interior das células, com base na habilidade da membrana de permitir o transporte seletivo de moléculas (Bacinoglu et al., 2008). Através da integridade funcional da membrana plasmática pode-se prever a capacidade de fertilização do sêmen de bovinos, tendo em vista que quando colocado em uma solução hiposmótica, a água entra no espermatozóide na tentativa de se alcançar o equilíbrio osmótico (Martins et al, 2011).

O influxo de água aumenta o volume espermático e a membrana plasmática provocando uma turgidez, diminuindo a razão volume/superfície. O flagelo do espermatozóide, por apresentar uma membrana mais frágil do que a presente na região da cabeça, é mais suscetível a estas condições de teste hiposmótico (Arruda et al, 2011) e pode se dobrar indicando que o transporte de água através da membrana ocorre normalmente e que esta se encontra íntegra e com funcionalidade (Martins et al, 2011).

2.7.4 INTEGRIDADE DE MEMBRANAS

A integridade das membranas e a estabilidade de seu aspecto semipermeável são pré-requisitos para a viabilidade do espermatozoide. A integridade da membrana plasmática, apresenta uma relação positiva com a fecundação, bem como a funcionalidade das organelas,

sendo a membrana plasmática responsável pela manutenção da homeostase celular, que pode ser alterada pelo processo de criopreservação (Peña et al., 2005).

Dessa forma, a funcionalidade das membranas e organelas dos espermatozóides ou seus compartimentos têm sido monitorados por procedimentos específicos de coloração, tecnicamente conhecidos como sondas fluorescentes. Estas sondas possuem a capacidade de se ligar a pontos específicos das células, diferindo assim dos corantes, permitindo um diagnóstico mais fácil e direto, na dependência de suas características físicas (Arruda, 2011).

Atualmente uma variedade muito grande de sondas fluorescentes tem sido usadas isoladamente ou em associações em andrologia, pois a combinação de várias sondas fluorescentes possibilita a avaliação de diversos compartimentos espermáticos simultaneamente. O uso de sondas fluorescentes em microscopia de epifluorescência, ou citometria de fluxo, permite avaliar a integridade de membranas plasmática, a integridade da membrana acrossomal, o potencial mitocondrial, entre outros (Arruda et al., 2003, 2008, 2010a; Gardes et al., 2010).

2.7.5. PRODUÇÃO IN VITRO (PIV)

O potencial de fertilização de uma amostra de sêmen pode ser obtido pela análise das características seminais correlacionando os resultados com a técnica de PIV (Nascimento et al., 2015). A biotécnica de produção in vitro de embriões permite o contato entre o espermatozoide e o oócito fora do trato reprodutivo da fêmea, com a formação de um novo indivíduo através das fases de coleta de oócitos, maturação in vitro (MIV), fecundação in vitro (FIV) e cultivo in vitro (CIV) (Gonçalves et al., 2008). A fecundação se refere ao processo em que o espermatozoide entra em contato com o oócito, gerando o zigoto, que, posteriormente, se desenvolve até o estágio de blastocisto.

Sabe-se que, no processo in vivo, os espermatozoides precisam chegar até a ampola da tuba uterina para fecundar o oócito, e que durante esse trajeto, substâncias presentes no sistema reprodutor da fêmea induzem a capacitação dos espermatozoides. In vitro, o processo de capacitação espermática é desencadeado por glicosaminoglicanas (como a heparina), que são adicionadas nos meios de fecundação (Gonçalves et al., 2007).

Os oócitos maturados in vitro podem ser fertilizados com sêmen fresco ou congelado/descongelado. Para bovinos, os métodos de preparação espermática mais utilizados são o

gradiente de PERCOLL e o swim-up. (Cognie et al., 2003). O co cultivo (espermatozoide e oócito) é realizado por um período de 18 a 22 horas, em temperatura de 39°C e atmosfera com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (Gonçalves et al., 2007).

Seguida a fertilização in vitro, os presumíveis zigotos são isolados das células do cumulus e mantidos em estufa à temperatura de 38,5°C, em 5% de CO₂, durante 7 dias, no cultivo in vitro. A avaliação da taxa de clivagem é realizada após 48 horas do início do cultivo e a formação de blastocisto após 168 horas, conforme Mapletoft, 2013.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMIRAT, L., TAINTURIER, D., JEANNEAU, L., THORIN, C., GÉRARD, O., COURTENS JL, ANTON M. **Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender.** Theriogenology 2004;61:895-907.
2. ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS K, WATSON J. **Biologia Molecular da Célula.** 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, p. 506, 1997.
3. ALVARENGA, M. A., PAPA, F. O., LANDIM-ALVARENGA, F. C., MEDEIROS, A. S. L. **Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review.** Anim Reprod Sci, v.89, p.105-113, 2005.
4. ALVES JUNIOR, Paulo Costa. **Criopreservação de sêmen bovino provoca alterações dos micro-RNAs espermáticos? 2023. 31 f.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2023.
5. AMANN R.P., PICKETT B.W. **Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa.** J Equine Vet Sci, v.7, p.145-173, 1987
6. ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; MARTINS, S. M. M. K.; RAPHAEL, C.F.; MORETTI, A. S. **Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm.** Reproduction in Domestic Animals, v.42, p.190- 194, 2007.
7. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES (ABIEC). **Beef Report: Exportações de carne bovina brasileira crescem 20,4% em fevereiro de 2022*.** (2022). Disponível em: <https://www.abiec.com.br/publicacoes/exportacoes-de-carne-bovina-brasileira-crescem-204-em-fevereiro-de-2022/>. Acesso em: 14/04/2023.
8. AVELAR, G.F.; OLIVEIRA, C.F.A.; SOARES, J.M.; SILVA, I.J.; DOBRINSKI, I.; HESS, R.A.; FRANÇA, L.R. **Post-natal somatic cell proliferation and seminiferous tubule maturation in pigs: A non-random event.** Theriogenology, v.74, n.1, p.11-23, 2010.
9. BARBOSA, W. C.; NAZARÉ, R. F. R.; HASHIMOTO, K. **Estudo bromatológico e tecnológico da graviola e do taperebá.** Belém: Embrapa, 1981. 15 p. Boletim de pesquisa, n. 32.
10. BARROS, M.H.C.; SHIOMI, H.H.; AMORIM, L.S.; SIQUEIRA, J.B.; PINHO, R.O.; LIMA, D.M.A.; LOPES, P.S.; GUIMARÃES, S.E.F.; GUIMARÃES, J. D. **Viabilidade espermática do sêmen congelado de suínos da raça piau avaliada pelo teste de termorresistência.** Acta Veterinaria Brasilica, v.7, n.2, p. 164-170, 2013.

11. BARUSELLI, P. S., FERREIRA, R. M., COLLI, M. H. A., ELLIFF, F. M., SÁ FILHO, M. F., VIEIRA, L., & DE FREITAS, B. G. **Timed artificial insemination: current challenges and recent advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil.** *Animal Reproduction (AR)*, v. 14, n. 3, p. 558-571. 2018. <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR999>
12. BAUDOT, A.; CAULA, C.; DUARTE, M.L.; FAUSTO, R. **Thermal study of simple aminoalcohol solution,** *Cryobiology*, v. 44, p. 150-160, 2002.
13. BAUMGARTNER, S., KRISTL, J., VRECER, F., VODOPIVEC, P., ZORKO, B. **Optimisation of floating matrix tablets and evaluation of their gastric residence time.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 195, p. 125-135, 2000. 28.
14. BEDFORD, J.; CALVIN, H. **The occurrence and the possible functional significance of - S-S- crosslinked sperm heads, with particular reference to eutherian mammals.** *Journal Experimental Zoology*, v.188, p.137-55, 1974.
15. BERGERON, A., BRINDLE, Y., BLONDIN, P., MANJUNATH, P. **Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage.** *Biol Reprod*, v.77, p.120-126, 2007.
16. BITTENCOURT, R. F., RIBEIRO, A. L., SANTOS, A. D. F., FURST, R., TEIXEIRA, R. B. S., CHALHOUB, M., PORTELA, A. P., ALVES, S. G. G., ALMEIDA, A. K., GUIMARÃES, J. D. **Utilização de glicerol e etileno glicol como crioprotetores na congelação do sêmen caprino.** *Ciênc Anim Bras*, v.5, p.27-32, 2004
17. BONI R. 2012. **Coleta de óvulos em bovinos: uma análise retrospectiva de 25 anos.** *Anima. Reprodução*. 9(3):362-369.
18. BOSCO, J.; SOARES, K. T.; AGUIAR FILHO, S. P.; BARROS, R. V. **A cultura da cajazeira.** João Pessoa: EMEPA-PB, 2000. 29 p
19. CABRAL, J. V. **Consumo de Carne Bovina No Brasil.** Rio Verde – GO, Março, 2022. Sistema Integrado de Bibliotecas – Instituto Federal Goiano. Disponível em: <https://repositorio.ifgoiano.edu.br/bitstream/prefix/2506/1/TCC%20Je%CC%81ssica%20Viana%20Cabral%20Final%20%20%281%29.pdf>. Acesso em: 14/04/2023
20. CARDOSO, L. M. **Espécies reativas de oxigênio no controle neurovegetativo da pressão arterial.** In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FISIOLOGIA CARDIOVASCULAR, Anais... Ribeirão Preto - SP (Medicina), v.39. n.1. p. 77-88, jan./mar, 2006.
21. CARRER, Alessandra Regina. **Criopreservação de sêmen bovino com dois diluentes comerciais suplementados com astaxantina.** 2022. 60p. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista (Unesp). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal.

22. CARVALHO, L. A. E. B., VEIGA, F., SOUSA, J. J., PINA, M. E. **Influence of cellulose ether polymers on ketoprofen release from hydrophilic matrix tablets.** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 58, p. 51-59, 2004. 29.
23. CELEGHINI, E. C. C., ARRUDA, R. D., FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A., SANTOS, F. D., ALVES, M. B. R., & OLIVEIRA, B. D. **Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 41, n. 1, p. 40-45, 2017.
24. COSTA, S.M.O.; RODRIGUES, J.F.; PAULA, R.C.M. **Monitorização do Processo de Purificação de Gomas Naturais: Goma do Cajueiro.** Polímeros: Ciência e Tecnologia - Abr/Jun – 1996.
25. DADOUNE, J.P.; SIFFROI, J.P.; ALFONSI, M.F.; **Transcription in haploid male germ cells.** International Review of Cytology, v. 237, p.1–56, 2004.
26. DALIMATA, A.M.; GRAHAM, J.K. **Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose.** Theriogenology, v. 48, p. 831-841, 1997.
27. EDDY, E. M. The spermatozoon. In: Neill JD. (Ed.). **Knobil and Neill's physiology of reproduction.** New York: Elsevier, v.1, p.3-54, 2006.
28. FAWCETT, D.W. **A comparative view of sperm ultrastructure.** Biology of Reproduction, v.2, p.90–127, 1970.
29. FEKETE, T., BORSA, J., TAKÁCS, E., & WOJNÁROVITS, L. **Synthesis and characterization of superabsorbent hydrogels based on hydroxyethylcellulose and acrylic acid.** Carbohydrate polymers. v. 166, p. 300-308, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.108>
30. FELIPPELLI, G., TOSCANO, J. H. B., TEXEIRA, W. F., SANTOS, I. B., CRUZ, B. C., MACIEL, W. G., ... & COSTA, A. J. **Viability of Toxoplasma gondii in cattle semen cryopreserved with different concentrations of cryoprotectant.** Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 43, <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-7106>
31. FERNANDES, A. C., HEROLD, B., MAIA, H., RAUTER, A. M., RODRIGUES, J. A. R. **Guia IUPAC para a nomenclatura de compostos orgânicos.** Lisboa: Lidel, 2002. 220p.
32. FICKEL, J., WAGENER, A., LUDWIG, A. **Semen cryopreservation and the conservation of endangered species.** Eur J Wildl Res, v.53, p.81-89, 2007.
33. FLESH, F. M., GADELLA, B. M. **Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization.** Biochim Biophys, v.1469, p.197-235, 2000.
34. FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Dossiê das gomas.** Revista- fi.com.n.17,p. 26-46 2011.

35. FRACARO, Pablo Luis. **Glicerol na criopreservação de sêmen de garanhões.** Dissertação (Mestrado) – Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas. 2022, 28 f.
36. GIBBONS, I. R. **Cilia and flagella of eukaryotes.** The Journal of Cell Biology, v. 91, p.107–124, 1981.
37. GRAHAM, J.K. **Cryopreservation of stallion spermatozoa.** Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, v. 12, p. 131-147, 1996.
38. GRAHAM, J.K. **Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa.** Proceedings of the 14th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, p. 307 (Abstract), 2000.
39. GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Funções Reprodutoras e Hormonais Masculinas (e Função da Glândula Pineal).** In: Tratado de Fisiologia Médica. 10ª ed. Rio de Janeiro – RJ: Guanabara Koogan. 2002. Cap. 80, pg. 857-868.
40. HALLIWELL, B. **Espécies reativas e antioxidantes. Redox Biology é um tema fundamental da vida aeróbica.** Plant Physiology, v. 141, p. 312 – 322, 2006.
41. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Radicais livres em biologia e medicina,** Ed 4. Clarendon Press, Oxford, 2006.
42. HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal.** São Paulo, Brasil Manole, 7ed, 2004.
43. HOLT, W. V. **Basic aspects of frozen storage of semen.** Anim Reprod Sci, v.62, p.3-22, 2000.
44. HOUPALATHI, R., LÓPEZ-FANDIÑO, R., ANTON, M., SCHADE, R. **Bioactive egg compounds.** New York: Springer- Verlag, 2007. 296p.
45. KASHIWAZAKI, N., OKUDA, Y., SEITA, Y., HISAMATSU, S., SONOKI, S., SHINO, M., MASAOKA, T., INOMATA, T. **Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese white rabbit spermatozoa.** J Reprod Dev, v.52, p.511-516, 2006.
46. KELLY, T. L. J. e TRASLER, J. M. **Reproductive epigenetics.** Clin. Genet. 65, 247–260, 2004.
47. KUNDU, C. N., CHAKRABORTY, J., DUTTA, P., BHATTACHARYYA, D., GHOST, A., MAJUNDER, G. C. **Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemical defined medium and the goat caudal epididymal spermatozoa.** Cryobiology 2000,40: 117-25.
48. LADHA, S. **Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon.** The Journal of Membrane Biology, vol. 165, no. 1, pp. 1–10, 1998.

49. LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 838p.
50. LEITE, P. A., SCHREDER, G. G., ALMEIDA, C. L. R., ZUCCARI, C. E. S. N. SILVA, E. V. C. **Criopreservação do Sêmen Bovino**. UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde, 2011; 13(4): 279-86.
51. LILL, R.; KISPAL, G. **Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria**. Trends in Biochemical Sciences, v.25:p.352–356, 2000.
52. KHOSRO, B.; ZARGHAMI N. **Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of stress biomarkers in subfertile males**. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, v.77, p.117, 2007.
53. MANJUNATH, P., NAUC, V., BERGERON, A., MÉNARD, M. **Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk**. Biol Reprod 2002;67:1250-8.
54. MARANI, P. L. **Estudo da influência das características estruturais da Hidroxipropil- Metil-Celulose (HPMC) nas propriedades de superfície de filmes poliméricos, na incorporação e liberação de nicotina**. 2015. 101 p. Dissertação Programa de Pós Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.
55. MEDEIROS C. M. O. et al. **Current status of sperm cryopreservation: why isn't better?** Theriogenology 2002. 57:327-34. MIRHOSSEINI, H.; TAN, C. P. Discrimina
56. MEIZEL, S.; TURNER, K. O. **Stimulation of an exocytotic event, the hamster sperm acrosome reaction, by cis-unsaturated fatty acids**. FEBS Letters, vol. 161, no. 2, pp. 315– 318, 1983.
57. MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 5.ed. Porto Alegre: Sulina, 1987. 783p.
58. MONTANARI, T. **Embriologia: Texto, Atlas e Roteiro de Aulas Práticas**. Porto Alegre – RS. Edição do Autor. UFRGS. Porto Alegre. 2013.
59. MORTIMER, S. T. **A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals**. Human Reproduction Update, v. 3, n. 5, p. 403-439, 1997.
60. MOURA, N. P. **Secagem por atomização de polpa de cajá (Spondias mombin L.): influência das variáveis do processo, avaliação sensorial e caracterização físico-química** / Naíra Paes de Moura. – Recife, 2013.
61. NASCIMENTO, P.S.; CHAVES, M.S.; SANTOS FILHO, A.S.; GUIDO, S.I.; GUERRA, M.M.P.; BARTOLOMEU, C.C. **Produção animal produção in vitro de embriões utilizando-se sêmen sexado de touros 5/8**. Ciência Animal Brasileira, v.16,n.3, p.358- 368,2015.

62. NOREEN, A., ZIA, KM, TABASUM, S., KHALID, S., & SHAREEF, R. **A review on grafting of hydroxyethylcellulose for versatile applications.** Jornal internacional de macromoléculas biológicas. v. 150, p.289-303, 2020.
63. OLIVEIRA, Sidnei Nunes. **Efeito de glicerol e amidas em diferentes curvas de refrigeração sobre a qualidade do sêmen congelado aquino.** 2020. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2020.
64. OLIVEIRA, Clara Slade. **Biotécnicas da Reprodução em Bovinos.** Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora, 2014.
65. PAULA, Daniella Aparecida de Jesus. **Soluções crioprotetoras para embriões de curimba – *Prochilodus lineatus* e zebrafish – *Danio rerio*.** Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras: UFLA, 2013. PEÑA, F.J.; SARAVIA, F.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; MARTÍNEZ RODRÍGUEZ, H. **Um método novo e simples para avaliar as alterações da membrana início em congelados e descongelados espermatozoides javali.** International Journal of Andrology, v. 28, p.107-114, 2005.
66. PESCH, S.; BERGMAN, M. **Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, Fertility and Cryopreservation.** Micron, v.37, p. 597-612, 2006.
67. PHILLIPS, P. H., LARDY, H. A. **A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen.** J Dairy Sci, v.23, p.399- 404, 1940.
68. POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. **Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures.** Nature, v. 164, p. 666, 1949.
69. POSER, G.L.V. Polissacarídeos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p.497-504.
70. PRACTTIONERS ANNUAL CONVENTION, 38Th, 1992. Proceedings. 629-47, 1992.
71. PRACTTIONERS ANNUAL CONVENTION, 38Th, 1992. Proceedings. 629-47, 1992.
72. PURDY, P. H. **A review on goat sperm cryopreservation.** Small Rumin Res, v.63, p.215-225, 2006a.
73. RODRIGUES, L.F.; PAULA, R.C.M.; COSTA, S.M.O. - **Polímeros: Ciência e Tecnologia** - nº 1,31-36 (1993)
74. RODRIGUES, M. P. **Novas percepções sobre o uso de lecitina de soja na criopreservação e fertilidade de espermatozoide bovino.** Universidade de São

- Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal. São Paulo, 2014.
75. ROVAN, E. **Biochemistry sperm.** W. Busch, A. Holzmänn (Eds.), Veterinary Medicine Neurology, Physiology and Pathology of reproduction in males Animals, Schattauer, Stuttgart, p. 23-54, 2001.
 76. RUFINO, M. S. M. **Propriedades funcionais de frutas tropicais brasileiras não tradicionais.** 2008. 237 f. Tese (Doutorado em Agronomia)-Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2008.
 77. SANTOS, J. F. D.; SANTOS, K. J. G.; SANTOS, A. P. P.; BACKES, C.; FERRO, R. A. C.; FERRO, D. A. C.; PEIXER, P. F. **Qualidade do sêmen bovino criopreservado.** Revista Espacios. v.30, n. 14, p. 18, 2018.
 78. SANTOS, M. B.; CARDOSO, R. L.; FONSECA, A. A.O.; CONCEIÇÃO, M. N. **Characterization and quality of umbu-caja fruits (Spondias tuberosa X S. mombin) proceeding from the Southern Reconcavo in Bahia.** Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 32, n. 4, p. 1089-1097, 2010.
 79. SCHLATT, S.; EHMCKE, J. **Regulation of spermatogenesis: na evolutionary biologist'sperspective.** Seminal Cells Development and Biology, v.29, p.2-16, 2014.
 80. SCHURMANN, A; AXER, H. **The glucose transport facilitator GLUT8 is predominantly associated with the acrossomal region of mature spermatozoa.** Cell Tissue Research, v.307, n.2, p.237-242, 2002.
 81. SENGGER, P.L. **Pathways to pregnancy and parturition.** Animal Reproduction Science, v.89, n.1/4, p.93-103, 2003.
 82. SELLEM, E.; BROEKHUIJSE, M. L.; CHEVRIER, L.; CAMUGLI, S.; SCHMITT, E.; SCHIBLER, L.; KOENEN, E. P. **Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen.** Theriogenology, v. 84, p. 1447-1454, 2015.
 83. SHAPIRO, Y. E.; SHAPIRO, T.I. **¹H NMR self-diffusion study of PVA cryogels containing ethylene glycol and its oligomers.** Journal Colloid Interface Science, New York, v. 217, n. 2, p. 322-327, Sept. 1999.
 84. SILVA, N.C. et al. **Avaliação de dois diluentes e diferentes técnicas de criopreservação de sêmen bovino.** PUBVET, Londrina, V. 5, N. 19, Ed. 166, Art. 1122, 2011.
 85. SINGH, B. K. **Compêndio de andrologia e inseminação artificial em animais de fazenda.** São Paulo: Andrei Editora, 2006. 331p.
 86. STACKPOLE, C. W., AND DEVORKIN, D. **Membrane organization in mouse spermatozoa revealed by freeze-etching.** Journal of Ultrastructure Research, v.49, p.167-187, 1974.

87. STAUB, C.; JOHNSON, L. **Review: Spermatogenesis in the bull.** *Animal*, v.12, supl. 1, p.27- 35, 2018.
88. STEDMAN, T. L. **Stedman: dicionário médico.** 27.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 2196p.
89. TOSHIMORI, K. **Maturation of mammalian spermatozoa: modifications of the acrosome and plasma membrane leading to fertilization.** *Cell and Tissue Research*, v. 293, p. 177–187, 1998.
90. UGUR M.R., ABDELRAHMAN A.S., EVANS H.C., GILMORE A.A., HITIT M., ARIFIANTINI R.I., PURWANTARA B., KAYA A., MEMILI E. (2019). **Advances in Cryopreservation of Bull Sperm.** *Front. Vet. Sci.* 6:268. doi: 10.3389/fvets.2019.00268
91. VALVERDE, F. G. **Desenvolvimento de um crioprotetor contendo goma de ágar para a conservação de sêmen humano.** Aracajú, UNIT, 2016.
92. VAZ, Francisco Eduardo Machado. **Avaliação de qualidade de sêmen congelado e uso de árvore de decisão para predição de fertilidade em iatf de vacas zebuínas.** 2022.
93. VIANA, F. P., PAPA, F. O., ZAHN, F. S., MELO, C. M., DELL'AQUA, J. R. J. A. **Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen.** *Anim Reprod Sci*, v.113, p.279-282, 2009.
94. VISHAL, T.; GUPTA, B.M.; TANDON, R. **Free radicals/ reactive oxygen species.** *JK- Practitioner*, v. 12, n.3, p.143-148, 2005.
95. VUEBA, M. L., BONFERONI, M. C., CARAMELLA, C., LENNHOLM, H., NYSTROM, C. **Characterisation of particle properties and compaction behaviour of hydroxypropyl methylcellulose with different degrees of methoxy/ hydroxypropyl substitution.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 9, p. 171-184, 1999.
96. WATSON, P.F. **The causes of reduced fertility with cryopreserved semen.** *Animal Reproduction Science*, v. 60–61, p. 481–492, 2000.
97. WOLFE, J. BRYANT, G. **Celular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects.** *International Journal of Refrigeration*, v.24, p 438-450, 2001.
98. THIRUMALA, S., CAMPBELL, W. T., VICKNAIR, M. R., TIERSCH, T. R., DEVIREDDY, R. V. **Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving sperm cells of striped bass, *Morone saxatilis*.** *Theriogenology*, v.66, p.964-973, 2006.
99. THUN, R., HURTADO, M., JANETT, F. **Comparison of Biociphos-Plus® and TRIS egg-yolk extender for cryopreservation of bull semen.** *Theriogenology* 2002;57:1087-94.

100. WHISTLER, R. L. **Factors influencing gum costs and applications.** In: WHISTLER, R. L.; BeMILLER, J. N. (eds.). *Industrial gums: polysaccharides and their derivatives*. 2nd ed. New York: Academic Press, 1973. p. 5-18.
101. WOWK, B.; LEITI, E.; RASCH, C. M.; KARIMI, N. B.; HARRIS, S. B.; GREFOR, M. F. **Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents.** *Cryobiology*, v.40, p.228-236, 2000.
102. ZERON, Y.; PEARL, M.; BOROCHON, A. et al. **Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature oocytes.** *Cryobiology*, v. 38, p. 35-42, 1999.

CAPÍTULO I

Artigo elaborado conforme as normas do periódico Animal Reproduction Science

Research (ISSN: 1873-2232, Impact Factor: 2.2)

Qualis A2 em Medicina Veterinária e Zootecnia e Recursos Pesqueiros

Avaliação da qualidade do sêmen bovino submetido a criopreservação com hidroxipropilmetilcelulose

**Anna Monallysa Silva de Oliveira^a | Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco^b
José Adalmir Torres de Souza^a**

^aUniversidade Federal do Piauí - UFPI, Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal - LBRA, Socorro, CEP - 64049-550, Teresina - Piauí, Brasil.

^bUniversidade Federal do Maranhão - UFMA, Centro de Ciências Agrárias e Ambientais - CCAA, Campus IV MA-230, km 04, s/n - Boa Vista, CEP 65500-000, Chapadinha - Maranhão, Brasil.

Correspondente:

Anna Monallysa Silva de Oliveira

E-mail: amonallysa@gmail.com

RESUMO

Objetivou-se avaliar os efeitos de diferentes concentrações de hidroxipropilmetilcelulose na criopreservação de sêmen bovino. Foram coletados sete touros em triplicata, por eletroejaculação e avaliado quanto aos aspectos macroscópicos e microscópicos. Em seguida as amostras foram submetidas a diluição em meio de criopreservação Tris-gema com e sem glicerol, com os seguintes tratamentos: Controle: Tris-Gema + 6% glicerol; T1: Tris-Gema + 3% glicerol; T2: Tris-Gema + 0% glicerol; T3: Tris-Gema + 0,5% HPMC; T4: Tris-Gema + 1,0% HPMC; T5: Tris-Gema + 1,5% HPMC; T6: Tris-Gema + 5,5% glicerol + 0,5% HPMC. As amostras foram congeladas com meio automatizado em curva lenta de criopreservação, e armazenadas em botijão criogênico (-196°C). Após descongelamento as amostras foram avaliadas quanto aos testes de termorresistência rápida (TTRR), morfologia espermática, teste de expansão hiposmótica, integridade de membrana plasmática, atividade mitocondrial e teste de fertilização in vitro. Para as análises de motilidade e vigor, foi realizado o teste de Friedman. Os dados de membrana plasmática, atividade mitocondrial e expansão hiposmótica, foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e para as análises de produção in vitro, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Os dados foram digitados no Excel e analisados a nível de significância de 5% ($p < 0,05$), no programa InfoStat versão 2008. O TTRR demonstrou que o grupo controle apresentou melhores resultados de motilidade e vigor nos tempos 0', 15' e 30' quando comparado com os tratamentos compostos por diluidor Tris-Gema associado ao hidroxipropilmetilcelulose. O grupo T6 apresentou melhores resultados de motilidade e vigor que os demais grupos acrescidos de 0,5%, 1,0% e 1,5% de HPMC ao diluidor. Não houve diferença significativa no tempo 45' do TTRR, nos testes de expansão hiposmótica, morfologia espermática, integridade de membrana, atividade mitocondrial e taxa de fertilização in vitro com espermatozoides criopreservados em meio de congelamento acrescido de diferentes concentrações de hidroxipropilmetilcelulose. Em conclusão, a adição de diferentes concentrações de hidroxipropilmetilcelulose reduziu a motilidade e o vigor espermático, no entanto, não prejudicou o processo de criopreservação nos demais parâmetros avaliados.

Palavras-chave: andrologia; espermatozoides; diluidor; polímero; bovino.

INTRODUÇÃO

Os avanços biotecnológicos na reprodução animal refletem em um maior êxito na produção e no melhoramento genético dos animais, através do uso de biotecnologias como a inseminação artificial que utiliza sêmen criopreservado como forma de aperfeiçoar a genética do rebanho (Bozzi, et al., 2023; Boni, 2012). Entretanto, a técnica de criopreservação de sêmen é capaz de induzir crioinjúrias seminais provocando uma redução nas características e na fertilidade dos espermatozoides (Abavisani et al., 2013; Yoshida, 2000).

Atualmente, sabe-se que os crioprotetores utilizados também representam um fator de toxicidade ao espermatozoide, gerando assim, inúmeros estudos com o objetivo de identificar crioprotetores alternativos (Hammerstedt e Graham, 1992; Purdy, 2006). Dentre os compostos que possuem potencial para redução dos efeitos deletérios da criopreservação, surge o polímero sintético, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), obtido a partir da derivação da celulose utilizando cloreto de metila e óxido de propileno como reagente (Marani, 2015).

Os polímeros sintéticos vêm sendo utilizados nos diluentes para congelamento de embriões equinos (Curcio, 2005) e oócitos suínos (Macedo Jr et al., 2006), equinos (Leon, 2008), bovinos (Santos, 2008) e de camundongos (Fahy et al., 2004; Santos, 2008) com a finalidade de bloquear a formação de gelo (Wowk et al., 2000), impedindo que ocorram danos à membrana plasmática, obtendo resultados promissores (Bang et al., 2013).

O hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) é um éter de celulose com estrutura variável, dependente da quantidade de grupos metila e hidroxipropoxila, inseridos na cadeia polimérica celulósica e apresenta características químicas e funcionais aplicadas em diversas tecnologias e biotécnicas como, em células oculares, hemáticas, derme e epiderme, apresentando boa aplicabilidade, estabilidade e atoxicidade (Villanova e Sá, 2007).

Considerando a necessidade de ampliar conhecimentos relacionados a inclusão de crioprotetores em associação ou substituição do glicerol nos extensores seminais, com a finalidade de aumentar a capacidade fertilizante dessas células, a presente pesquisa objetivou avaliar o efeito de diferentes concentrações de hidroxipropilmetilcelulose na criopreservação do sêmen de bovino.

MATERIAL E MÉTODOS

Comitê de Ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís - MA, sob processo nº 23115.026162/2023-81.

Animais

Foram utilizados como doadores de sêmen sete reprodutores bovinos (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*), das raças Nelore e Senepol, com faixa etária entre 2 e 3 anos e peso médio de 650kg, provenientes na Fazenda Nova e Carnaubinha, respectivamente, na cidade de Chapadinha, e no Centro de Ciências de Chapadinha da Universidade Federal do Maranhão. Os reprodutores foram mantidos sob regime extensivo, em pastejo de *Panicum maximum* - *Massai*, com mistura mineral comercial e água ad libitum. As coletas foram realizadas com os animais contidos em tronco de contenção, do tipo sanduíche, no qual as metragens das instalações seguiam o padrão para a espécie bovina, com dois metros quadrados/animal, o brete com 1,60 m de altura e plataformas dispostas lateralmente, separadas entre si, a 0,75 m de altura e com 0,90 m de largura. Os animais foram previamente submetidos à avaliação clínica e andrológica para comprovação da higidez e viabilidade de participação do delineamento experimental, com base nos padrões recomendados pelo CBRA (2013).

Coleta e avaliação do sêmen pré-congelação.

Foram coletados 3 ejaculados por touro, pelo método de eletroejaculação, totalizando 21 ejaculados, com sessões de coleta realizadas uma vez por semana. No sêmen fresco foram avaliadas a motilidade, vigor, morfologia e concentração espermática. A motilidade e vigor espermáticos foram determinadas pela deposição de 10µL de sêmen entre lâmina e lamínula, sob microscopia em magnificação de 400x com base na estimativa visual (CBRA, 2013).

A concentração espermática foi determinada pela contagem das células em câmara de Neubauer, após diluição (1:200) de uma alíquota de sêmen em formol salino. A morfologia espermática foi avaliada em preparações úmidas, entre lâmina e lamínula, em magnificação

de 400x em microscopia de contraste de fase e classificados em defeitos menores, maiores e totais (CBRA, 2013).

Após avaliação da concentração da amostra seminal, cada ejaculado foi dividido em sete frações e diluído em extensor TRIS-gema (3,605 g de Tris, 2,024 g de ácido Cítrico, 1,488 g de frutose, 100 mL de água destilada, 20% de gema de ovo; 1000µg/mL diluidor de estreptomicina; 1000UI/mL diluidor de penicilina para cada 100mL de diluidor), conforme a esquematização abaixo:

- Controle: Tris- Gema 6% glicerol;
- T1: Tris-Gema + 3% glicerol;
- T2: Tris-Gema + 0% glicerol;
- T3: Tris Gema + 0,5% Hidroxipropilmetilcelulose;
- T4: Tris-Gema + 1,0% Hidroxipropilmetilcelulose;
- T5: Tris-Gema + 1,5% Hidroxipropilmetilcelulose;
- T6: Tris-Gema + 5,5% glicerol + 0,5% hidroxipropilmetilcelulose.

Criopreservação do sêmen

Após a adição dos tratamentos, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25mL, sendo a concentração final fixada em 40 milhões de espermatozoides viáveis por palheta. Em seguida as palhetas foram levadas a máquina de congelamento TK 3000® (TK 106 Tecnologia em congelamento Ltda., Uberaba, Brasil), utilizando a curva lenta de congelação, com uma taxa de resfriamento de -0,25°C/min, de 25°C até a temperatura de 5°C, e a -12,5°C/min, de 5°C até atingir a temperatura de -120°C, com tempo de estabilização de 4 horas a 5°C. Imediatamente após a congelação, as palhetas foram transferidas para o nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criogênico (-196°C).

Teste in vitro do sêmen pós-descongelação.

A descongelação do sêmen foi realizada em banho-maria a 37°C durante 30 segundos, para avaliação quanto à motilidade total e vigor no teste de termo resistência rápido (TTRR), morfologia, integridade da membrana plasmática, atividade mitocondrial e teste de fertilidade in vitro.

Teste de Termorresistência Rápido (TTRR)

O teste de termorresistência foi realizado de acordo Viana et al. (2009), que consiste em verificar a longevidade das amostras de sêmen descongeladas. Uma alíquota de 100µl de sêmen descongelado foi incubada a 46 ° C em banho-Maria, e avaliada quanto à motilidade total e o vigor espermático por meio de microscopia de campo claro, e aumento de 400x, nos tempos 0, 15, 30, e 45 minutos.

Avaliação morfológica

A morfologia foi estimada em cada amostra de sêmen descongelado, pelo método de câmara úmida, no qual foram avaliados 200 espermatozoides por observação microscópica (1000x), com óleo de imersão, em campo claro. A porcentagem das diversas alterações morfológicas foi agrupada e classificada de acordo com Bloom (1971).

Teste de expansão hiposmótica

Para a realização do teste de expansão hiposmótico, foi homogeneizado 100 µL de amostra a 900 µL de solução hiposmótica (150 mOsm). As amostras foram mantidas em banho-maria a 37 °C, durante 30 minutos. Transcorrido esse período, uma gota de cada amostra foi colocada entre lâmina e laminula para a contagem de 200 células, em microscópio de contraste de fase sob aumento de 400x. Os espermatozoides foram classificados quanto a presença (membrana íntegra e funcional) ou não (membrana não íntegra ou afuncional) de cauda enrolada.

Análise da integridade da membrana plasmática

Para avaliação da integridade da membrana plasmática, utilizou-se o método de coloração dupla com diaconato de carboxifluoresceína (DCF; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) e iodeto de propídio (IP; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), modificado por Coletto et al. (2002), em que alíquotas de 50µL de sêmen pós descongelado foram diluídas em 150µL de Tris, 5µL de DCF e 20µL de IP e incubadas por 10 min a 37°C. Foram avaliados 200 espermatozoides em microscópio de epifluorescência (400x; Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão), usando-se filtro de emissão DBP 580- 630nm e excitação DBP 485/20nm.

Análise da atividade mitocondrial

A função mitocondrial foi determinada pela utilização de um fluorocromo catiônico lipofílico JC-1 (GUTHRIE E WELCH, 2006). Para tanto, alíquotas de 50µL de sêmen pós-descongelamento foram diluídas em 150 µL de Tris, contendo 5 µL de JC-1 (0,15mM em DMSO) e incubadas por 10 minutos a 37 °C. Um total de 100 espermatozoides foram avaliados em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão), com aumento de 1000 x, sob óleo de imersão, usando-se filtro de emissão LP 515nm e BP 450-490 nm para excitação. Os espermatozoides com a região da peça intermediária coradas em laranja foram classificados com alto potencial de membrana mitocondrial, e aqueles com a região da peça intermediária coradas em verde foram classificados com baixo potencial de membrana mitocondrial.

Teste de fertilidade in vitro

Os complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram coletados por aspiração folicular de ovários obtidos de um matadouro local. Foram considerados adequados para o cultivo in vitro os oócitos com três ou mais camadas de células do cumulus compactas, grau I e II, com citoplasma homogêneo ou apresentando pequenas irregularidades (Leibfried e First, 1979). Os CCOs selecionados foram submetidos à maturação in vitro em meio de maturação (GeneUp Biotecnologia), composto por TCM 199 e 10% de SFB (Soro Fetal Bovino), sob óleo mineral, em placas de Petri 100 x 20mm, incubados à 38,5°C com atmosfera de 5% de CO₂ em ar, por um período de 24 horas.

Para avaliar o efeito do hidroxipropilmetilcelulose na qualidade do sêmen bovino criopreservado utilizado na fertilização in vitro, foram utilizados o total de 315 oócitos, distribuídos entre sete tratamentos, cultivados em três repetições, no qual cada grupo conteve no máximo 15 oócitos. Para a realização da fertilização in vitro, as doses de sêmen referentes a cada tratamento foram descongeladas a 37°C por 30 segundos e centrifugada em gradiente de Percoll (45% e 90%; GeneUp Biotecnologia) a 8000rpm, durante 7 minutos.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido, os espermatozoides ressuspensos em 1mL de meio de fertilização e centrifugados a 3200rpm por 5 minutos. O sobrenadante resultante da segunda centrifugação também foi descartado, e 5µL do pellet (60 µL) diluído em 250µL de solução formol salina, para realização da contagem espermática em

câmara de Neubauer, bem como 5µL do pellet colocado entre lâmina e lamínula para avaliação de motilidade e o vigor. Posteriormente, cada tratamento foi co-incubado com espermatozoides, à concentração final de 1×10^6 espermatozoides/mL, por período de 22h, em temperatura de 38,5°C com atmosfera de 5% de CO₂ em ar, em meio de fertilização (GeneUp Biotecnologia), constituído de PHE (penicilina, hipotaurina e epinefrina), heparina e BSA (Albumina Sérica Bovina).

Seguida a fertilização in vitro, os presumíveis zigotos foram isolados das células do cumulus mediante sucessivas aspirações e passaram por três banhos em meio SOF (Gene Up Biotecnologia®). Posteriormente, os mesmos foram transferidos para uma placa de Petri 100x20 mm, contendo microgotas de 100µL de meio SOF (Gene Up Biotecnologia®) composto por SOF, EGF (Fator de Crescimento Epidermal), BSA e SFB, e mantidos em estufa à temperatura de 38,5°C, em 5% de CO₂, durante 7 dias.

No terceiro e quinto dia de cultivo foi realizado o “feeding”, que é a troca de 50% do meio SOF por um novo meio previamente estabilizado. A avaliação da taxa de clivagem foi realizada após 48 horas após o início do cultivo e a formação de blastocisto após 168 horas após. Os blastocistos foram avaliados segundo Mapletoft, 2013.

Análise estatística

Para análise de dados foram utilizados os procedimentos usuais de estatística descritiva, tais como distribuição de frequência absoluta (n) e relativa (%), média e desvio padrão, bem como o teste Shapiro-Wilk para verificar se os dados seguiram distribuição normal. Para os dados sem distribuição normal foi utilizado a transformação pela fórmula $\text{arc.sen}(\sqrt{x/100})$. As variáveis motilidade e vigor no teste de termorresistência rápido (TTRR), foram submetidos ao teste de Friedman. As análises de integridade da membrana plasmática, atividade mitocondrial e expansão hisposmótica foram submetidas à análise de variância (ANOVA). Os dados de produção in vitro foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis. Os dados foram digitados no Excel e analisados a nível de significância de 5% ($p < 0,05$), no programa InfoStat versão 2008.

RESULTADOS

No teste de termorresistência rápido, em relação à motilidade e vigor no tempo 0', o grupo Controle, diferiu significativamente em comparação aos grupos compostos por diluidor Tris-Gema associado à 0,5%, 1,0% e 1,5% de hidroxipropilmetilcelulose. O diluidor Tris-Gema, acrescido de 3% de Glicerol e sem acréscimo de glicerol demonstrou-se mais favorável às células espermáticas que os grupos compostos pelo diluidor Tris-Gema associado à 0,5%, 1,0% e 1,5% de hidroxipropilmetilcelulose. No entanto, o tratamento composto pelo diluidor Tris-Gema, acrescido de 5,5% de glicerol e 0,5% de HPMC, apesar de não demonstrar diferença significativa em relação ao grupo controle, apresentou melhores resultados que os demais grupos acrescidos de HPMC no diluidor seminal.

No tempo 15' e tempo 30', a motilidade e o vigor do grupo Controle, do grupo com 3% de glicerol e do grupo com associação de 5,5% de glicerol e 0,5% de HPMC, apresentaram-se maior que os grupos sem acréscimo de glicerol ou com acréscimo de HPMC em 0,5%, 1,0% e 1,5%. Sendo que o grupo controle demonstrou motilidade e vigor maiores em relação a todos os grupos avaliados. No tempo 45', os tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si, em relação à motilidade e vigor.

Tabela 1 - Média e desvio-padrão do percentual de Motilidade Total e Vigor do sêmen criopreservado de bovinos, avaliados pelo teste de termorresistência rápido (TTRR).

TRATAMENTOS	MOTILIDADE			
	0'	15'	30'	45'
C	31,40 ± 15,74 ^A	23,60 ± 12,49 ^A	17,10 ± 7,56 ^A	12,90 ± 4,88
T1	24,50 ± 12,14 ^A	18,20 ± 7,51 ^{AB}	17,30 ± 6,47 ^A	11,40 ± 3,23
T2	22,00 ± 8,37 ^A	12,00 ± 4,47 ^{BC}	12,00 ± 4,47 ^B	10,00 ± 0,00
T3	11,70 ± 4,08 ^B	10,00 ± 0,00 ^C	10,00 ± 0,00 ^B	10,00 ± 0,00
T4	11,10 ± 3,33 ^B	10,00 ± 0,00 ^C	10,00 ± 0,00 ^B	10,00 ± 0,00
T5	12,30 ± 4,39 ^B	10,00 ± 0,00 ^C	10,00 ± 0,00 ^B	10,00 ± 0,00
T6	23,00 ± 12,52 ^A	19,00 ± 11,01 ^{AB}	14,50 ± 6,85 ^{AB}	12,00 ± 6,32
p-valor ¹	0,0002	0,0002	0,0009	0,3963
TRATAMENTOS	VIGOR			
	0'	15'	30'	45'
C	1,57 ± 1,13 ^A	1,00 ± 0,81 ^A	0,57 ± 0,53 ^A	0,28 ± 0,48 ^A
T1	1,09 ± 0,70 ^A	0,54 ± 0,52 ^{AB}	0,54 ± 0,52 ^A	0,18 ± 0,40 ^A
T2	0,80 ± 0,44 ^{AB}	0,20 ± 0,44 ^{BC}	0,20 ± 0,44 ^{AB}	0,00 ± 0,00 ^A
T3	0,33 ± 0,81 ^{BC}	0,00 ± 0,00 ^C	0,00 ± 0,00 ^B	0,00 ± 0,00 ^A
T4	0,11 ± 0,33 ^C	0,00 ± 0,00 ^C	0,00 ± 0,00 ^B	0,00 ± 0,00 ^A
T5	0,23 ± 0,43 ^{BC}	0,00 ± 0,00 ^C	0,00 ± 0,00 ^B	0,00 ± 0,00 ^A
T6	0,80 ± 0,78 ^{ABC}	0,70 ± 0,82 ^{AB}	0,50 ± 0,70 ^A	0,10 ± 0,31 ^A
p-valor ¹	0,0007	0,0001	0,0017	0,2243

Os valores são expressos como média e desvio padrão (DP). MOT - Motilidade; VIG - Vigor; 0' - tempo zero; 15' - quinze minutos; 30' - trinta minutos; 45' - quarenta e cinco minutos; ¹Friedman.

A adição de diferentes concentrações de hidroxipropilmetilcelulose não demonstrou incremento no percentual de células com membranas plasmáticas e atividade mitocondrial (Tabela 2) e de células espermáticas com membranas funcionais exposta à solução hiposmótica (Tabela 3).

Tabela 2 - Integridade da membrana plasmática e atividade mitocondrial pós-descongelamento de sêmen criopreservado acrescidos de diferentes concentrações de hidroxipropilmetilcelulose.

TRATAMENTO	M.P.	M.M.
C	71,00 ± 12,23	12,50 ± 11,83
T1	62,90 ± 21,27	8,70 ± 7,12
T2	66,00 ± 26,29	5,00 ± 3,00
T3	73,20 ± 16,10	8,40 ± 1,52
T4	66,38 ± 20,93	8,38 ± 11,78
T5	75,50 ± 14,81	8,75 ± 8,28
T6	77,11 ± 8,30	10,11 ± 12,40
p-valor ¹	0,600	0,704

Os valores são expressos como média e desvio padrão (DP). M.M. - membrana mitocondrial; M.P. - membrana plasmática; ¹ANOVA.

Tabela 3 - Avaliação da expansão hiposmótica do sêmen criopreservado de bovinos, avaliados pelo teste de expansão hiposmótica.

TRATAMENTO	REAGENTES
C	21,30 ± 13,80
T1	18,40 ± 12,60
T2	16,20 ± 13,40
T3	17,50 ± 13,40
T4	20,20 ± 17,70
T5	17,50 ± 11,20
T6	11,60 ± 14,10
p-valor ¹	0,891

Os valores são expressos como média e desvio padrão (DP); ¹ANOVA.

Não houve diferença significativa na avaliação da morfologia espermática (Tabela 4) e na taxa de fertilização in vitro (Tabela 5) com espermatozoides criopreservados em meio de congelamento acrescido de diferentes concentrações de hidroxipropilmetilcelulose.

Tabela 4 - Avaliação da morfologia espermática de sêmen criopreservado em diluidor acrescido de diferentes concentrações de hidroxipropil-metilcelulose.

TRAT	NORMAIS	DMAI	DMEN	DT	DCAB	DPI	DCAU
C	93,83 ± 2,48	1,83 ± 1,17	4,33 ± 2,88	6,17 ± 2,48	2,17 ± 1,33	0,83 ± 0,75	3,17 ± 1,60
T1	94,86 ± 1,57	0,86 ± 0,69	2,86 ± 2,19	4,86 ± 2,12	0,86 ± 0,90	0,14 ± 0,38	4,14 ± 2,19
T2	92,63 ± 5,10	2,13 ± 1,46	5,00 ± 4,21	7,00 ± 5,37	1,25 ± 1,04	1,25 ± 1,49	4,88 ± 4,82
T3	93,50 ± 3,79	1,75 ± 1,26	5,25 ± 4,21	7,00 ± 3,46	1,75 ± 0,50	1,00 ± 0,82	4,25 ± 2,50
T4	93,63 ± 1,60	1,38 ± 1,30	4,50 ± 1,93	5,88 ± 18,96	2,38 ± 1,85	0,38 ± 0,52	3,13 ± 1,55
T5	93,50 ± 4,76	1,33 ± 1,51	5,17 ± 3,49	4,83 ± 2,32	1,83 ± 2,56	0,33 ± 0,52	4,33 ± 2,66
T6	92,33 ± 3,88	1,33 ± 1,21	6,33 ± 3,44	7,67 ± 3,88	2,17 ± 2,23	0,00 ± 0,00	5,50 ± 1,76
p-valor ¹	0,824	0,548	0,515	0,636	0,384	0,055	0,351

Os valores são expressos como média e desvio padrão (DP). DMAI - defeitos maiores; DMEN - defeitos menores; DT - defeitos totais; DCAB - defeitos de cabeça; DPI - defeitos de peça intermediária; DCAU - defeitos de cauda. ¹Kruskal-Wallis.

Tabela 5 - Taxas de fertilização in vitro com espermatozoides criopreservados em meio de congelação acrescido de diferentes concentrações de hidroxipropilmetilcelulose.

TRATAMENTO	TC	TB
C	40,00 ± 0,00	29,00 ± 3,46
T1	23,50 ± 4,95	16,50 ± 23,33
T2	15,67 ± 14,01	8,67 ± 7,51
T3	22,00 ± 19,05	22,00 ± 19,05
T4	27,00 ± 000	17,67 ± 4,04
T5	18,00 ± 15,59	20,00 ± 17,58
T6	16,50 ± 4,95	23,50 ± 4,95
p-valor ¹	0,115	0,523

Os valores são expressos como média e desvio padrão (DP). TC - taxa de clivagem; TB - taxa de blastocisto; ¹Kruskal-Wallis.

DISCUSSÃO

O presente estudo amplia o conhecimento sobre os efeitos da adição de diferentes crioprotetores ao meio diluidor de criopreservação de sêmen bovino. Os resultados obtidos demonstram que as células espermáticas apresentaram maior motilidade e vigor quando em meios de congelação acrescidos com glicerol na concentração de 6% do que quando submetidas a criopreservação com meios acrescidos de hidroxipropilmetilcelulose nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 1,5%.

Os resultados obtidos podem ser explicados pelo mecanismo crioprotetor do glicerol, o qual não é totalmente esclarecido (Aires, 2003), mas sabe-se que o mesmo exerce efeitos extra e intracelulares. Caracteriza-se como ação extracelular sua participação na desidratação osmótica da célula com consequente diminuição do volume de água intracelular no momento da congelação. E efeito intracelular, a habilidade de permear a membrana celular e assim reduzir o estresse osmótico intracelular decorrente da desidratação. Isto ocorre pela

substituição da água intracelular, necessária para a manutenção do volume celular, interação com íons e macromoléculas e, em especial, pela redução do ponto de congelação da água (Guerra, 2011).

No presente estudo, não foi observado diferenças significativas entre os grupos experimentais em relação à integridade da membrana plasmática e mitocondrial, bem como nos teste de expansão hiposmótica e morfologia espermática, o que sugere que a presença de hidroxipropilmetilcelulose não prejudica os parâmetros de qualidade estrutural de espermatozoides criopreservados de touro. Tal fato se justifica pelo uso de açúcares, proteínas e polímeros sintéticos como crioprotetores extracelulares.

Os crioprotetores extracelulares não conseguem penetrar na célula espermática, sendo denominados de não penetrantes. Ao agir no meio extracelular, induzem a desidratação da célula, diminuindo a formação de cristais de gelo intracelular (Celeghini, 2008). Os crioprotetores não penetrantes como os açúcares (lactose, frutose, rafinose ou tralose) e os polímeros sintéticos (metil celulose) protegem as células basicamente através de efeitos osmóticos. Em meio hipertônico, as células perdem seu conteúdo de água, o que diminui a possibilidade de formação de cristais dentro da célula. Estes componentes agem como solutos ou colóides, não servindo como solventes (Graham, 1996).

Os crioprotetores não penetrantes mais comuns são os açúcares, o leite e a gema de ovo. No entanto, o uso de alguns desses protetores como a gema de ovo ou leite possui como desvantagem o risco de contaminação por microorganismos associados aos produtos de origem animal, além da dificuldade de padronizar o meio diluente (Thun, 2002; Muiño, 2007). Tendo em vista isso, é necessário testar substâncias que promovam maior qualidade e durabilidade dos espermatozóides, na tentativa de potencializar o material genético dos animais (Silva et al, 2011).

Nesse sentido, o hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), polímero obtido a partir da derivação da celulose utilizando cloreto de metila e óxido de propileno como reagente (Marani, 2015) foi utilizado na presente pesquisa e não prejudicou os parâmetros de qualidade estrutural de espermatozoides criopreservados de touro. A substância quando associada ao glicerol, também apresentou resultados favoráveis de motilidade e vigor, semelhantes ao grupo controle.

Corroborando com resultados obtidos por Silva (2022), na manipulação de gametas femininos, onde folículos frescos e com adição de polímeros aumentaram de diâmetro durante o cultivo *in vitro*, ao passo que os folículos sem adição de polímeros cresceram apenas na primeira semana. Concluindo que a combinação do uso de polímeros sintéticos na vitrificação de tecido ovariano é uma técnica promissora, que poderá proteger o desenvolvimento folicular, mas ainda são necessários mais estudos que possam aperfeiçoar esse protocolo.

Logo, devido às características de atoxicidade e estabilidade, e a aplicabilidade do HPMC em diversas tecnologias e biotécnicas como células oculares, hemáticas, derme e epiderme (Villanova e Sá, 2007) é fundamental a ampliação dos conhecimentos relacionados ao seu uso, tendo em vista os resultados apresentados pela pesquisa realizada. Visto que, ainda não haviam evidências e estudos relativos a atividade do HPMC na criopreservação espermática de touros.

CONCLUSÕES

Em conclusão, a adição de diferentes concentrações de hidroxipropilmetilcelulose reduziu a motilidade e o vigor espermático e não prejudicou o processo de criopreservação nos demais parâmetros avaliados.

REFERÊNCIAS

1. AIRES, V. A., HINSCH, K. D., MUELLER-SCHLOESSE, F., BOGNER, K. **In vitro and in vivo comparison of egg-yolk based and soybean lecithin- based extenders for cryopreservation of bovine semen.** Theriogenology 2003;60:269-79.
2. BAUMGARTNER, S., KRISTL, J., VRECER, F., VODOPIVEC, P., ZORKO, B. **Optimisation of floating matrix tablets and evaluation of their gastric residence time.** International Journal of Pharmaceutics, v. 195, p. 125-135, 2000. 28.
3. BLOM, E. **Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for anew classification of the bull spermogram.** Nordisk Veterinaermedicin, v.25, p.383-391, 1973.
4. BONI R. 2012. **Coleta de óvulos em bovinos: uma análise retrospectiva de 25 anos.** Anima. Reprodução. 9(3):362-369.
5. CELEGHINI, E. C. C., ARRUDA, R. D., FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A., SANTOS, F. D., ALVES, M. B. R., & OLIVEIRA, B. D. **Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 41, n. 1, p. 40-45, 2017.

6. CELEGHINI, E. C. C., ARRUDA, R. P., ANDRADE, A. F. C., NASCIMENTO, J., RAPHAEL, C. F., RODRIGUES, P. H. M. **Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin.** Anim Reprod Sci. 2008;104:119- 31.
7. COSTA, S.M.O.; RODRIGUES, J.F.; PAULA, R.C.M. **Monitorização do Processo de Purificação de Gomas Naturais: Goma do Cajueiro.** Polímeros: Ciência e Tecnologia - Abr/Jun – 1996.
8. CURCIO, B. R. **Maturação e vitrificação de oócitos eqüinos incubados em meio contendo hormônio do crescimento e fator de crescimento semelhante à insulina-I.** Pelotas, 2005. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pelotas, 2005.
9. GRAHAM, J.K. **Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa.** Proceedings of the 14th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, p. 307 (Abstract), 2000.
10. GUERRA, M. M.P.; SILVA, S. V. **Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.35, n.4, p 370-384, out/dez - 2011.
11. LEON, P. M. M. **Oócitos eqüinos: maturação in vitro e vitrificação.** Pelotas, 2008. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas; 2008.
12. MACEDO, J. R., M. C.; DESCHAMPS, J. C.; LUCIA JR, T.; BORDIGNON, J.; SERRET, C. G.; RAMBO, G.; PIVATO, I.; SCHIMITT, E. **In vitro penetration of fresh and vitrified swine oocytes by homologous spermatozoa using different incubation system.** Animal Reproduction Science, v. 92, n. 3-4, p. 334-348, 2006.
13. MAPLETOFT, R. J. **Bovine embryo transdermal.** In: Morrow, D. A. (Ed.). Current Therapy in Theriogenology II. Philadelphia, PA: WV Saunders. Pp. 54-63.
14. MARANI, P. L. **Estudo da influência das características estruturais da Hidroxipropil- Metil-Celulose (HPMC) nas propriedades de superfície de filmes poliméricos, na incorporação e liberação de nicotina.** 2015. 101 p. Dissertação Programa de Pós Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.
15. MEDEIROS C. M. O. et al. **Current status of sperm cryopreservation: why isn't better?** Theriogenology 2002. 57:327-34.
16. MONTANARI, T. **Embriologia: Texto, Atlas e Roteiro de Aulas Práticas.** Porto Alegre – RS. Edição do Autor. UFRGS. Porto Alegre. 2013.
17. MUIÑO, R., FERNANDEZ, M., PEÑA, A. I. **Post-thaw survival and longevity of Bull spermatozoa frozen with na egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18h.** Reprod Domes Anim 2007;42:305-11.

18. PURDY, P. H. **A review on goat sperm cryopreservation.** Small Rumin Res, v.63, p.215-225, 2006a.
19. ROTH, T. L., WEISS, R. B., & BUFF, J. L. (1998). **Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*).** *Biol Reprod.*, 58, 475-482.
20. SANTOS, E. C.S. **Efeito dos métodos de vitrificação, OPS e SSV, com adição de bloqueador sintético de gelo, sobre a viabilidade de oócitos de camundongos e de bovinos.** Pelotas, 2008. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas; 2008.
21. SILVA, N.C. et al. **Avaliação de dois diluentes e diferentes técnicas de criopreservação de sêmen bovino.** PUBVET, Londrina, V. 5, N. 19, Ed. 166, Art. 1122, 2011.
22. SILVA, T. E. C. **Avaliação da aplicabilidade de polímeros sintéticos na vitrificação de tecido ovariano bovino.** Belo Horizonte, 2022.
23. THUN, R., HURTADO, M., JANETT, F. **Comparison of Biociphos-Plus® and TRIS egg-yolk extender for cryopreservation of bull semen.** *Theriogenology* 2002; 57:1087-94.
24. TOSHIMORI, K. **Maturation of mammalian spermatozoa: modifications of the acrosome and plasma membrane leading to fertilization.** *Cell and Tissue Research*, v. 293, p. 177–187, 1998.
25. VIANA, F. P., PAPA, F. O., ZAHN, F. S., MELO, C. M., DELL'AQUA, J. R. J. A. **Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen.** *Anim Reprod Sci*, v.113, p.279-282, 2009.
26. WOWK, B.; LEITI, E.; RASCH, C. M.; KARIMI, N. B.; HARRIS, S. B.; GREFOR, M. F. **Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents.** *Cryobiology*, v.40, p.228-236, 2000.

CAPÍTULO II

*Artigo elaborado conforme as normas do periódico *Reproduction in Domestic Animals**

Research (ISSN: 1439-0531, Impact Factor: 1.7)

Qualis A3 em Medicina Veterinária e Zootecnia e Recursos Pesqueiros

Avaliação da qualidade do sêmen bovino submetido a criopreservação com goma de cajá

**Anna Monallysa Silva de Oliveira^a | Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco^b
José Adalmir Torres de Souza^a**

^aUniversidade Federal do Piauí - UFPI, Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal - LBRA, Socorro, CEP - 64049-550, Teresina - Piauí, Brasil.

^bUniversidade Federal do Maranhão - UFMA, Centro de Ciências Agrárias e Ambientais - CCAA, Campus IV MA-230, km 04, s/n - Boa Vista, CEP 65500-000, Chapadinha - Maranhão, Brasil.

Correspondente:

Anna Monallysa Silva de Oliveira

E-mail: amonallysa@gmail.com

RESUMO

Objetivou-se avaliar os efeitos de diferentes concentrações de goma de cajá (GC) na criopreservação de sêmen bovino. Foram coletados sete touros em triplicata, por eletroejaculação e avaliado quanto aos aspectos macroscópicos e microscópicos. Em seguida as amostras foram submetidas a diluição em meio de criopreservação Tris-gema com e sem glicerol, com os seguintes tratamentos: Controle: Tris-Gema + 6% glicerol; T1: Tris-Gema + 3% glicerol; T2: Tris-Gema + 0% glicerol; T3: Tris-Gema + 0,5% GC; T4: Tris-Gema + 1,5% GC e T5: Tris-Gema + 5,5% glicerol + 0,5% GC. As amostras foram congeladas com meio automatizado em curva lenta de criopreservação, e armazenadas em botijão criogênico (-196°C). Após descongelamento as amostras foram avaliadas quanto aos testes de termorresistência rápido (TTRR), morfologia espermática, teste de expansão hiposmótica, integridade de membrana plasmática, atividade mitocondrial e teste de fertilização in vitro. Para as análises de motilidade e vigor, foi realizado o teste de Friedman. Os dados de membrana plasmática, atividade mitocondrial e expansão hiposmótica, foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e para as análises de produção in vitro, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Os dados foram digitados no Excel e analisados a nível de significância de 5% ($p < 0,05$), no programa InfoStat versão 2008. O TTRR demonstrou que o grupo controle apresentou melhores resultados de motilidade e vigor nos tempos 0', 15' e 30' quando comparado com os demais tratamentos. O grupo T5 apresentou melhores resultados de motilidade e vigor que os demais grupos acrescidos de goma de cajá ao diluidor seminal. Não houve diferença significativa no tempo 45' do TTRR, nos testes de expansão hiposmótica, morfologia espermática, integridade de membrana, atividade mitocondrial e taxa de fertilização in vitro com espermatozoides criopreservados em meio de congelamento acrescido de diferentes concentrações de goma de cajá. Em conclusão, a adição de diferentes concentrações de goma de cajá demonstrou reduzir a motilidade e o vigor espermático, no entanto, não demonstrou-se prejudicial ao processo de criopreservação nos demais parâmetros avaliados.

Palavras-chave: andrologia; espermatozoides; diluidor; goma; bovino.

INTRODUÇÃO

A congelação de sêmen tem sido amplamente utilizada para aumentar o potencial reprodutivo de touros de alto valor genético. O uso do sêmen congelado permite rápido avanço genético dos rebanhos comerciais, permitindo a escolha de reprodutores que melhor atendam às necessidades de produção (Leite, 2010). No entanto, os protocolos de congelação utilizados ainda resultam em considerável número de espermatozóides que não resistem ao processo, o que compromete a fecundação do ovócito (Nagy et al., 2004)

O sêmen sujeito à criopreservação é exposto às condições de diluição do plasma seminal e às baixas temperaturas e estas levam à perda e reorganização dos componentes da membrana plasmática de forma semelhante ao que ocorre durante a capacitação. Tais alterações resultam na diminuição do tempo de sobrevivência do espermatozóide, bem como da sua habilidade de interagir com o ambiente do trato reprodutor feminino (Medeiros, 2002).

Dentre os aditivos testados para a preservação de gametas durante o processo de criopreservação, observou-se que açúcares como a sacarose, a rafinose (Jafaroghli et al., 2011) e a trealose (Tonieto et al., 2010) atuam como protetores da membrana espermática. Outros agentes como a gelatina (Vanni et al., 2008; Corcini et al., 2011) e a goma-arábica (Platov, 1977 apud Salamon & Maxwell, 1994; Schmehl et al., 1986) também demonstraram efeito benéfico na preservação de sêmen mas não tiveram seu uso difundido, apesar dos seus potenciais benefícios.

As gomas são moléculas hidrofílicas ou hidrofóbicas de alta massa molar (polímeros de cadeia longa) que possuem propriedades coloidais (Whistler, 1973; Food Ingredients Brasil, 2011). A utilização de diferentes gomas (arábica e tragacanto) vem sendo realizada como solução para obtenção de uma nanoemulsão estável para criopreservação de espermatozóides epididimários, como demonstrado por Hashtjin & Abbasi (2015).

Os biopolímeros derivados das gomas, como exemplo, a goma de xantana, vem sendo utilizados na indústria de alimentos, cosméticos e petrolíferos. A substância ganha destaque em processos de congelamento (Papagianni & Anastasiadou, 2009), pois diminui os danos causados pela formação dos cristais de gelo (Fernandez et al., 2007). Nesse sentido, buscando minimizar os efeitos deletérios da criopreservação a presente pesquisa objetivou avaliar os

efeitos de diferentes concentrações de goma de cajá (GC) na criopreservação de sêmen bovino.

MATERIAL E MÉTODOS

Comitê de Ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís - MA, sob processo nº 23115.026162/2023-81.

Animais

Foram utilizados como doadores de sêmen sete reprodutores bovinos (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*), das raças Nelore e Senepol, com faixa etária entre 2 e 3 anos e peso médio de 650kg, provenientes na Fazenda Nova e Carnaubinha, respectivamente, na cidade de Chapadinha, e no Centro de Ciências de Chapadinha da Universidade Federal do Maranhão. Os reprodutores foram mantidos sob regime extensivo, em pastejo de *Panicum maximum* - *Massai*, com mistura mineral comercial e água ad libitum. As coletas foram realizadas com os animais contidos em tronco de contenção, do tipo sanduíche, no qual as metragens das instalações seguiam o padrão para a espécie bovina, com dois metros quadrados/animal, o brete com 1,60 m de altura e plataformas dispostas lateralmente, separadas entre si, a 0,75 m de altura e com 0,90 m de largura. Os animais foram previamente submetidos à avaliação clínica e andrológica para comprovação da higidez e viabilidade de participação do delineamento experimental, com base nos padrões recomendados pelo CBRA (2013).

Coleta e avaliação do sêmen pré-congelação.

Foram coletados 3 ejaculados por touro, pelo método de eletroejaculação, totalizando 21 ejaculados, com sessões de coleta realizadas uma vez por semana. No sêmen fresco foram avaliadas a motilidade, vigor, morfologia e concentração espermática. A motilidade e vigor espermáticos foram determinadas pela deposição de 10µL de sêmen entre lâmina e lamínula, sob microscopia em magnificação de 400x com base na estimativa visual (CBRA, 2013).

A concentração espermática foi determinada pela contagem das células em câmara de Neubauer, após diluição (1:200) de uma alíquota de sêmen em formol salino. A morfologia

espermática foi avaliada em preparações úmidas, entre lâmina e lamínula, em magnificação de 400x em microscopia de contraste de fase e classificados em defeitos menores, maiores e totais (CBRA, 2013).

Após avaliação da concentração da amostra seminal, cada ejaculado foi dividido em seis frações e diluído em extensor TRIS-gema (3,605 g de Tris, 2,024 g de ácido Cítrico, 1,488 g de frutose, 100 mL de água destilada, 20% de gema de ovo; 1000µg/mL diluidor de estreptomicina; 1000UI/mL diluidor de penicilina para cada 100mL de diluidor), conforme a esquematização abaixo:

- Controle: Tris- Gema 6% glicerol;
- T1: Tris-Gema + 3% glicerol;
- T2: Tris-Gema + 0% glicerol;
- T3: Tris Gema + 0,5% Goma de Cajá;
- T4: Tris-Gema + 1,5% Goma de Cajá;
- T5: Tris-Gema + 5,5% glicerol + 0,5% Goma de Cajá.

Obtenção da goma de cajá

A goma bruta de cajá foi coletada de exsudatos naturais do cajazeiro. No estágio de isolamento, como sugerido por Rodrigues et al (1993), a goma bruta foi separada da maior parte das suas impurezas e seus constituintes ácidos neutralizados.

A primeira purificação teve como finalidade a substituição dos cátions presentes na goma (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+}) por Na^+ , por meio da adição de excesso de cloreto de sódio, além de retirar as impurezas ainda presentes. Nesse estágio, foram dissolvidos 4 g da goma isolada em 100 mL de H_2O , na presença de 5g de NaCl, respeitando as seguintes etapas: filtração, precipitação, nova filtração e lavagem do precipitado.

O excesso de NaCl que foi precipitado com a goma na primeira purificação foi eliminado na segunda purificação. Para realizar essa segunda purificação, cada alíquota de 3 g foi dissolvida em 100mL de H_2O e submetida às mesmas etapas citadas na primeira purificação.

Para garantir a goma totalmente na forma de sal de Na, foi feita uma eluição em uma coluna de troca iônica tipo amberlite IR- 120H+. A troca dos íons H^+ por Na^+ da coluna foi previamente feita pela eluição de uma solução de NaCl. A solução de goma na forma de sal, oriunda da coluna, foi liofilizada em três alíquotas de 200 mL em um liofilizador modelo L4KR, Edwards de alto vácuo. O material oriundo de cada liofilização foi misturado aos demais para homogeneização.

Criopreservação do sêmen

Após a adição dos tratamentos, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25mL, sendo a concentração final fixada em 40 milhões de espermatozoides viáveis por palheta. Em seguida as palhetas foram levadas a máquina de congelamento TK 3000® (TK 106 Tecnologia em congelamento Ltda., Uberaba, Brasil), utilizando a curva lenta de congelação, com uma taxa de resfriamento de $-0,25^{\circ}C/min$, de $25^{\circ}C$ até a temperatura de $5^{\circ}C$, e a $-12,5^{\circ}C/min$, de $5^{\circ}C$ até atingir a temperatura de $-120^{\circ}C$, com tempo de estabilização de 4 horas a $5^{\circ}C$. Imediatamente após a congelação, as palhetas foram transferidas para o nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criogênico ($-196^{\circ}C$).

Teste in vitro do sêmen pós-descongelação.

A descongelação do sêmen foi realizada em banho-maria a $37^{\circ}C$ durante 30 segundos, para avaliação quanto à motilidade total e vigor no teste de termo resistência rápido (TTRR), morfologia, integridade da membrana plasmática, atividade mitocondrial e teste de fertilidade in vitro.

Teste de Termorresistência Rápido (TTRR)

O teste de termorresistência foi realizado de acordo Viana et al. (2009), que consiste em verificar a longevidade das amostras de sêmen descongeladas. Uma alíquota de 100 μ l de sêmen descongelado foi incubada a $46^{\circ}C$ em banho-Maria, e avaliada quanto à motilidade total e o vigor espermático por meio de microscopia de campo claro, e aumento de 400x, nos tempos 0, 15, 30, e 45 minutos.

Avaliação morfológica

A morfologia foi estimada em cada amostra de sêmen descongelado, pelo método de câmara úmida, no qual foram avaliados 200 espermatozoides por observação microscópica

(1000x), com óleo de imersão, em campo claro. A porcentagem das diversas alterações morfológicas foi agrupada e classificada de acordo com Bloom (1971).

Teste de expansão hiposmótica

Para a realização do teste de expansão hiposmótico, foi homogeneizado 100 μ L de amostra a 900 μ L de solução hiposmótica (150 mOsm). As amostras foram mantidas em banho-maria a 37 °C, durante 30 minutos. Transcorrido esse período, uma gota de cada amostra foi colocada entre lâmina e lamínula para a contagem de 200 células, em microscópio de contraste de fase sob aumento de 400x. Os espermatozoides foram classificados quanto a presença (membrana íntegra e funcional) ou não (membrana não íntegra ou afuncional) de cauda enrolada.

Análise da integridade da membrana plasmática

Para avaliação da integridade da membrana plasmática, utilizou-se o método de coloração dupla com diaconato de carboxifluoresceína (DCF; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) e iodeto de propídio (IP; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), modificado por Coletto et al. (2002), em que alíquotas de 50 μ L de sêmen pós descongelado foram diluídas em 150 μ L de Tris, 5 μ L de DCF e 20 μ L de IP e incubadas por 10 min a 37°C. Foram avaliados 200 espermatozoides em microscópio de epifluorescência (400x; Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão), usando-se filtro de emissão DBP 580- 630nm e excitação DBP 485/20nm.

Análise da atividade mitocondrial

A função mitocondrial foi determinada pela utilização de um fluorocromo catiônico lipofílico JC-1 (GUTHRIE E WELCH, 2006). Para tanto, alíquotas de 50 μ L de sêmen pós-descongelamento foram diluídas em 150 μ L de Tris, contendo 5 μ L de JC-1 (0,15mM em DMSO) e incubadas por 10 minutos a 37 °C. Um total de 100 espermatozoides foram avaliados em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão), com aumento de 1000 x, sob óleo de imersão, usando-se filtro de emissão LP 515nm e BP 450-490 nm para excitação. Os espermatozoides com a região da peça intermediária coradas em laranja foram classificados com alto potencial de membrana mitocondrial, e aqueles com a região da peça intermediária coradas em verde foram classificados com baixo potencial de membrana mitocondrial.

Teste de fertilidade in vitro

Os complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram coletados por aspiração folicular de ovários obtidos de um matadouro local. Foram considerados adequados para o cultivo in vitro os oócitos com três ou mais camadas de células do cumulus compactas, grau I e II, com citoplasma homogêneo ou apresentando pequenas irregularidades (Leibfried e First, 1979). Os CCOs selecionados foram submetidos à maturação in vitro em meio de maturação (GeneUp Biotecnologia), composto por TCM 199 e 10% de SFB (Soro Fetal Bovino), sob óleo mineral, em placas de Petri 100 x 20mm, incubados à 38,5°C com atmosfera de 5% de CO₂ em ar, por um período de 24 horas.

Para avaliar o efeito da goma de cajá na qualidade do sêmen bovino criopreservado utilizado na fertilização in vitro, foram utilizados o total de 180 oócitos, distribuídos entre seis tratamentos, cultivados em duas repetições, no qual cada grupo conteve no máximo 15 oócitos. Para a realização da fertilização in vitro, as doses de sêmen referentes a cada tratamento foram descongeladas a 37°C por 30 segundos e centrifugada em gradiente de Percoll (45% e 90%; GeneUp Biotecnologia) a 8000rpm, durante 7 minutos.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido, os espermatozoides ressuspensos em 1mL de meio de fertilização e centrifugados a 3200rpm por 5 minutos. O sobrenadante resultante da segunda centrifugação também foi descartado, e 5μL do pellet (60 μL) diluído em 250μL de solução formol salina, para realização da contagem espermática em câmara de Neubauer, bem como 5μL do pellet colocado entre lâmina e lamínula para avaliação de motilidade e o vigor. Posteriormente, cada tratamento foi co-incubado com espermatozoides, à concentração final de 1×10^6 espermatozoides/mL, por período de 22h, em temperatura de 38,5°C com atmosfera de 5% de CO₂ em ar, em meio de fertilização (GeneUp Biotecnologia), constituído de PHE (penicilina, hipotaurina e epinefrina), heparina e BSA (Albumina Sérica Bovina).

Seguida a fertilização in vitro, os presumíveis zigotos foram isolados das células do cumulus mediante sucessivas aspirações e passaram por três banhos em meio SOF (Gene Up Biotecnologia®). Posteriormente, os mesmos foram transferidos para uma placa de Petri 100x20 mm, contendo microgotas de 100μL de meio SOF (Gene Up Biotecnologia®)

composto por SOF, EGF (Fator de Crescimento Epidermal), BSA e SFB, e mantidos em estufa à temperatura de 38,5°C, em 5% de CO₂, durante 7 dias.

No terceiro e quinto dia de cultivo foi realizado o “feeding”, que é a troca de 50% do meio SOF por um novo meio previamente estabilizado. A avaliação da taxa de clivagem foi realizada após 48 horas após o início do cultivo e a formação de blastocisto após 168 horas após. Os blastocistos foram avaliados segundo Mapletoft, 2013.

Análise estatística

Para análise de dados foram utilizados os procedimentos usuais de estatística descritiva, tais como distribuição de frequência absoluta (n) e relativa (%), média e desvio padrão, bem como o teste Shapiro-Wilk para verificar se os dados seguiram distribuição normal. Para os dados sem distribuição normal foi utilizado a transformação pela fórmula $\text{arc.sen}(\sqrt{x/100})$. As variáveis motilidade e vigor no teste de termorresistência rápido (TTRR), foram submetidos ao teste de Friedman. As análises de integridade da membrana plasmática, atividade mitocondrial e expansão hipotônica foram submetidas à análise de variância (ANOVA). Os dados de produção in vitro foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis. Os dados foram digitados no Excel e analisados a nível de significância de 5% ($p < 0,05$), no programa InfoStat versão 2008.

RESULTADOS

No teste de termorresistência rápido, em relação à motilidade e vigor no tempo 0', o grupo Controle, diferiu significativamente em comparação aos grupos compostos por diluidor Tris-Gema associado à 0,5% e 1,5% de goma de cajá. O diluidor Tris-Gema, acrescido de 3% de Glicerol e sem acréscimo de glicerol demonstrou-se mais favorável às células espermáticas que os grupos compostos pelo diluidor Tris-Gema associado à 0,5% e 1,5% de goma de cajá, quando avaliada a motilidade. No entanto, o tratamento composto pelo diluidor Tris-Gema, acrescido de 5,5% de glicerol e 0,5% de goma de cajá, apesar de não demonstrar diferença significativa em relação ao grupo controle, apresentou melhores resultados de motilidade e vigor que os demais grupos acrescidos de goma de cajá no diluidor seminal.

No tempo 15' e tempo 30', a motilidade e o vigor do grupo Controle, do grupo com 3% de glicerol e do grupo com associação de 5,5% de glicerol e 0,5% de goma de cajá, apresentaram-se maior que os grupos sem acréscimo de glicerol ou com acréscimo de goma

de cajá em 0,5% e 1,5%. Sendo que o grupo controle demonstrou motilidade e vigor maiores em relação a todos os grupos avaliados. No tempo 45', os tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si, em relação à motilidade e vigor.

Tabela 1 - Média e desvio-padrão do percentual de Motilidade Total e Vigor do sêmen criopreservado de bovinos, avaliados pelo teste de termorresistência rápido (TTRR).

TRATAMENTOS	MOTILIDADE			
	0'	15'	30'	45'
C	31,40 ± 15,74 ^A	23,60 ± 12,49 ^A	17,10 ± 7,56 ^A	12,90 ± 4,88 ^A
T1	24,50 ± 12,14 ^{AB}	18,20 ± 7,51 ^{AB}	17,30 ± 6,47 ^A	11,40 ± 3,23 ^{AB}
T2	22,00 ± 8,37 ^{AB}	12,00 ± 4,47 ^B	12,00 ± 4,47 ^{AB}	10,00 ± 0,00 ^B
T3	18,20 ± 7,17 ^B	10,90 ± 2,02 ^B	10,00 ± 0,00 ^B	10,00 ± 0,00 ^B
T4	15,00 ± 5,27 ^B	11,00 ± 3,16 ^B	10,00 ± 0,00 ^B	10,00 ± 0,00 ^B
T5	32,3 ± 12,52 ^A	19,10 ± 12,21 ^{AB}	14,50 ± 9,34 ^{AB}	10,00 ± 0,00 ^B
p-valor ¹	0,0036	0,0076	0,0237	0,0705
TRATAMENTOS	VIGOR			
	0'	15'	30'	45'
C	1,57 ± 1,13 ^A	1,00 ± 0,81 ^A	0,57 ± 0,53 ^A	0,28 ± 0,48 ^A
T1	1,09 ± 0,70 ^{AB}	0,54 ± 0,52 ^{AB}	0,54 ± 0,52 ^A	0,18 ± 0,40 ^{AB}
T2	0,80 ± 0,44 ^{AB}	0,20 ± 0,44 ^{AB}	0,20 ± 0,44 ^{AB}	0,00 ± 0,00 ^B
T3	0,90 ± 0,70 ^{AB}	0,18 ± 0,40 ^{AB}	0,00 ± 0,00 ^B	0,00 ± 0,00 ^B
T4	0,50 ± 0,52 ^B	0,10 ± 0,31 ^B	0,00 ± 0,00 ^B	0,00 ± 0,00 ^B
T5	1,54 ± 0,52 ^A	1,45 ± 2,91 ^A	0,36 ± 0,67 ^{AB}	0,00 ± 0,00 ^B
p-valor ¹	0,0455	0,0375	0,0070	0,0866

Os valores são expressos como média e desvio padrão (DP). MOT - Motilidade; VIG - Vigor; 0' - tempo zero; 15' - quinze minutos; 30' - trinta minutos; 45' - quarenta e cinco minutos; ¹Friedman.

A adição de diferentes concentrações de goma de cajá não demonstrou incremento no percentual de células com membranas plasmáticas e atividade mitocondrial (Tabela 2) e de células espermáticas com membranas funcionais exposta à solução hiposmótica (Tabela 3).

Tabela 2 - Integridade da membrana plasmática e atividade mitocondrial pós-descongelamento de sêmen criopreservado acrescidos de diferentes concentrações de goma de cajá.

TRATAMENTO	M.P.	M.M.
C	71,00 ± 12,23	12,50 ± 11,83
T1	62,90 ± 21,27	8,70 ± 7,12
T2	60,25 ± 24,35	5,75 ± 2,87
T3	75,30 ± 12,69	9,10 ± 12,03
T4	55,11 ± 17,52	8,56 ± 8,43
T5	71,30 ± 17,70	13,00 ± 15,40
p-valor ¹	0,199	0,580

Os valores são expressos como média e desvio padrão (DP). M.M. - membrana mitocondrial; M.P. - membrana plasmática; ¹ANOVA.

Tabela 3 - Avaliação da expansão hiposmótica do sêmen criopreservado de bovinos, avaliados pelo teste de expansão hiposmótica.

TRATAMENTO	REAGENTES
C	21,30 ± 13,80
T1	18,40 ± 12,60
T2	16,20 ± 13,40
T3	17,00 ± 11,31
T4	15,20 ± 11,04
T5	13,00 ± 3,89
p-valor ¹	0,541

Os valores são expressos como média e desvio padrão (DP); ¹ANOVA.

Não houve diferença significativa na avaliação da morfologia espermática (Tabela 4 e Tabela 5) e na taxa de fertilização in vitro (Tabela 6) com espermatozoides criopreservados em meio de congelamento acrescido de diferentes concentrações de goma de cajá.

Tabela 4 - Avaliação da morfologia espermática de sêmen criopreservado em diluidor acrescido de diferentes concentrações de goma de cajá.

TRAT	NORMAIS	DMAI	DMEN	DT	DCAB	DPI	DCAU
C	93,83 ± 2,48	1,83 ± 1,17	4,33 ± 2,88	6,17 ± 2,48	2,17 ± 1,33	0,83 ± 0,75	3,17 ± 1,60
T1	94,86 ± 1,57	0,86 ± 0,69	2,86 ± 2,19	4,86 ± 2,12	0,86 ± 0,90	0,14 ± 0,38	4,14 ± 2,19
T2	92,63 ± 5,10	2,13 ± 1,46	5,00 ± 4,21	7,00 ± 5,37	1,25 ± 1,04	1,25 ± 1,49	4,88 ± 4,82
T3	90,67 ± 7,81	1,83 ± 0,75	7,83 ± 8,40	9,67 ± 8,57	3,17 ± 3,13	0,17 ± 0,41	6,33 ± 7,94
T4	93,40 ± 2,97	1,40 ± 1,14	4,80 ± 3,11	6,20 ± 3,42	1,00 ± 1,00	0,60 ± 1,34	4,60 ± 2,51
T5	94,88 ± 2,90	0,88 ± 0,64	3,38 ± 1,85	4,25 ± 1,67	1,25 ± 0,71	0,38 ± 0,52	2,75 ± 1,58
p-valor ¹	0,65	0,093	0,758	0,433	0,216	0,171	0,706

Os valores são expressos como média e desvio padrão (DP). DMAI - defeitos maiores; DMEN - defeitos menores; DT - defeitos totais; DCAB - defeitos de cabeça; DPI - defeitos de peça intermediária; DCAU - defeitos de cauda. ¹Kruskal-Wallis.

Tabela 5 - Taxas de fertilização in vitro com espermatozoides criopreservados em meio de congelamento acrescido de diferentes concentrações de goma de cajá.

TRATAMENTO	TC	TB
C	40,00 ± 0,00	30,00 ± 4,24
T1	23,50 ± 4,94	16,50 ± 23,33
T2	23,50 ± 4,94	13,00 ± 0,00
T3	23,50 ± 2,12	11,50 ± 0,70
T4	30,00 ± 14,14	20,00 ± 9,89
T5	16,50 ± 4,94	30,00 ± 4,24
p-valor ¹	0,270	0,320

Os valores são expressos como média e desvio padrão (DP). TC - taxa de clivagem; TB - taxa de blastocisto; ¹Kruskal-Wallis.

DISCUSSÃO

A criopreservação de sêmen é uma técnica eficiente na conservação de material genético. Entretanto sempre induz, mesmo que em proporções variadas, danos na membrana plasmática dos espermatozoides, liberando fosfolipídios no meio circundante durante o choque térmico e tornando-se transiente por causa das transições de fase lipídica (Watson, 1995). Danos à membrana pode interferir na motilidade espermática, que é uma das características mais importantes associadas à capacidade de fertilização dos espermatozoides, pois é essencial para o seu transporte através do trato reprodutivo feminino.

No presente estudo, a adição da goma de cajá no meio extensor do sêmen criopreservado reduziu a motilidade total e vigor em comparação ao grupo controle (6% de glicerol). Os tratamentos com adição de goma de cajá apresentaram valores de motilidade e vigor abaixo do preconizado pelo manual do colégio brasileiro de reprodução animal (CBRA), que determina o mínimo de 30% de motilidade e 3 de vigor para sêmen bovino criopreservado.

No teste de termorresistência rápido, em relação à motilidade e vigor no tempo 0', o grupo Controle, demonstrou melhores resultados em comparação aos grupos compostos por diluidor Tris-Gema associado à 0,5% e 1,5% de goma de cajá. E, no tempo 15' e tempo 30', a motilidade e o vigor do grupo Controle, do grupo com 3% de glicerol e do grupo com associação de 5,5% de glicerol e 0,5% de goma de cajá, apresentaram-se maior que os grupos sem acréscimo de glicerol ou com acréscimo de goma de cajá em 0,5% e 1,5%.

No entanto, o teste de termo resistência (TTR) tem por objetivo selecionar amostras de sêmen mais resistentes a lesões latentes ao calor e maximizar as chances de sobrevivência espermática dentro do trato reprodutivo feminino, e conforme Viana et al. (2009) em seu estudo, espermatozoides com taxa de motilidade de 0% ao final de 5 horas de incubação a 38°C apresentaram taxa de prenhes de 66% na IATF.

A ação dos crioprotetores é necessária para a criopreservação seminal (Fahy, 1986), devido a capacidade de manter a osmolaridade e tamponar o meio, e ser fonte de lipoproteína de alto peso molecular, que confere proteção contra o choque térmico induzido pelas baixas temperaturas do processo de criopreservação (Vishwanath; Shannon, 2000). Nesse contexto, o glicerol, inserido nos tratamentos controle e com resultados melhores, age penetrando à célula

e exerce efeitos extra e intracelulares, que potencializa a desidratação osmótica celular e redução do volume e do estresse osmótico intracelular decorrente da desidratação (Medeiros, et al., 2002).

Assim como as enzimas com atividade antioxidante podem atuar na criopreservação com efeito crioprotetor, a goma de cajá devido as suas características antioxidativas é atribuído potencial protetor de biomoléculas, com ação na inibição ou redução da oxidação celular através da prevenção do desencadeamento das reações oxidativas (Kaur e Kapoor, 2001). Contudo, neste trabalho não foi verificado o efeito crioprotetor da goma de cajá sobre a cinética espermática, pois os tratamentos contendo goma de cajá, na ausência de glicerol tiveram os resultados inferiores quanto a motilidade e vigor.

Não foi observado diferenças significativas entre os grupos experimentais em relação à integridade da membrana plasmática e mitocondrial, bem como nos teste de expansão hiposmótica, morfologia espermática e fertilização in vitro, o que sugere que a presença de goma de cajá não é prejudicial à qualidade estrutural de espermatozoides criopreservados de touro. Tal fato pode-se justificar pela característica pseudoplástica das gomas e ao uso de biopolímeros derivado das gomas, que diminuem os danos causados pela formação dos cristais de gelo no processo de congelamento e descongelamento (Fernandez et al., 2007) .

Portanto, considerando as características da goma de cajá, bem como estudos que demonstram a utilização dos biopolímeros como solução para obtenção de nanoemulsões estáveis para criopreservação de espermatozóide (Hashtjin & Abbasi, 2015), faz-se necessária a realização de pesquisas complementares na área, relacionadas ao seu uso, visto que trata-se de estudos recentes e que não há evidências da goma de cajá na criopreservação de sêmen bovino.

CONCLUSÕES

Conclui-se que a adição de diferentes concentrações de goma de cajá reduziu a motilidade e o vigor espermático e não prejudicou o processo de criopreservação no que tange morfologia espermática, expansão hiposmótica, integridade de membrana plasmática, atividade mitocondrial e fertilização in vitro.

REFERÊNCIAS

1. BONI R. 2012. **Coleta de óvulos em bovinos: uma análise retrospectiva de 25 anos.** Anima. Reprodução. 9(3):362-369.
2. BITTENCOURT, R. F., RIBEIRO, A. L., SANTOS, A. D. F., FURST, R., TEIXEIRA, R. B. S., CHALHOUB, M., PORTELA, A. P., ALVES, S. G. G., ALMEIDA, A. K., GUIMARÃES, J. D. **Utilização de glicerol e etileno glicol como crioprotetores na congelção do sêmen caprino.** Ciênc Anim Bras, v.5, p.27-32, 2004.
3. BLOM, E. **Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for anew classification of the bull spermogram.** Nordisk Veterinaermedicin, v.25, p.383-391, 1973.
4. CELEGHINI, E. C. C., ARRUDA, R. D., FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A., SANTOS, F. D., ALVES, M. B. R., & OLIVEIRA, B. D. **Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 41, n. 1, p. 40-45, 2017.
5. COLETO, Z. F., GUERRA, M.M.P., BATISTA, A. M. (2002). **Avaliação do sêmen congelado decaprinos com drogas fluorescentes.** *Rev. Bras. Med. Vet.*, 24, 101-104.
6. FAHY, G.M. **The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology.** Cryobiology, v. 23, n. 1, p. 1-13, 1986.
7. FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Dossiê das gomas.** Revista- fi.com.n.17,p. 26-46 2011.
8. KAUR, C.; KAPOOR, H.C. **Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium’shealth.** Food Science and Technology. vol.36, p. 703-725, 2001.
9. LEIBFRIED, M.L., FIRST, N. L. **Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro.** J. Reprodutor. Fertilizer, Suppl v.38, p. 35-47, 1989.
10. LEITE, P. A., SCHREDER, G. G., ALMEIDA, C. L. R., ZUCCARI, C. E. S. N. SILVA, E. V. C. **Criopreservação do Sêmen Bovino.** UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde, 2011; 13(4): 279-86.
11. MAPLETOFT, R. J. **Bovine embryo transdermal.** In: Morrow, D. A. (Ed.). Current Therapy in Theriogenology II. Philadelphia, PA: WV Saunders. Pp. 54-63.

12. MEDEIROS C. M. O. et al. **Current status of sperm cryopreservation: why isn't better?** Theriogenology 2002. 57:327-34. MIRHOSSEINI, H.; TAN, C. P. Discrimina
13. MEDEIROS C. M. O. et al. **Current status of sperm cryopreservation: why isn't better?** Theriogenology 2002. 57:327-34. MIRHOSSEINI, H.; TAN, C. P. Discrimina
14. MONTANARI, T. **Embriologia: Texto, Atlas e Roteiro de Aulas Práticas.** Porto Alegre – RS. Edição do Autor. UFRGS. Porto Alegre. 2013.
15. MUIÑO, R., FERNANDEZ, M., PEÑA, A. I. **Post-thaw survival and longevity of Bull spermatozoa frozen with na egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18h.** Reprod Domes Anim 2007;42:305-11.
16. NAGY, S. et al. **Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry.** Animal Reproduction Sciece, v. 80, p. 225-235, 2004.
17. ROTH, T. L., WEISS, R. B., & BUFF, J. L. (1998). **Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*).** *Biol Reprod.*, 58, 475-482.
18. VIANA, F. P., PAPA, F. O., ZAHN, F. S., MELO, C. M., DELL'AQUA, J. R. J. A. **Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen.** Anim Reprod Sci, v.113, p.279-282, 2009.
19. WATSON, P.F. **The causes of reduced fertility with cryopreserved semen.** Animal Reproduction Science, v. 60–61, p. 481–492, 2000.
20. WHISTLER, R. L. **Factors influencing gum costs and applications.** In: WHISTLER, R. L.; BeMILLER, J. N. (eds.). *Industrial gums: polysaccharides and their derivatives*. 2nd ed. New York: Academic Press, 1973. p. 5-18.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a conclusão da pesquisa, observou-se que as concentrações utilizadas tanto de hidroxipropilmetilcelulose como de goma de cajá foram capazes de preservar a integridade morfológica das células espermáticas após o processo de criopreservação, sem causar efeitos adversos. Em relação aos resultados do experimento I e II, verificou-se que as substâncias adicionadas apresentaram resultados mais favoráveis quando adicionado com a associação ao glicerol. Recomenda-se a realização de estudos futuros utilizando diferentes concentrações do HPMC e da goma de cajá, a fim de explorar seus respectivos potenciais para melhorar a qualidade do sêmen criopreservado.

