

## SBTE 002 FISIOLOGIA DA REPRODUÇÃO DO MACHO E TECNOLOGIA DO SÊMEN

### Uso da 2',7' diacetato de diclorofluoresceína por citometria para análise de estresse oxidativo em sêmen ovino

**P.M. Assis; T.R.S. Hamilton; C.M. Mendes; L.S. Castro; J.A. Visintin; M.E.O.D. Assumpção**

USP, São Paulo, SP, Brasil.

**Palavras-chave:** espermatozóide; citometria de fluxo; estresse oxidativo.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) atuam em vários processos fisiológicos, como a capacitação e a hiperativação espermática. Quando há um desequilíbrio entre EROS e antioxidantes ocorre à oxidação de biomoléculas, evento denominado de estresse oxidativo (EO). Nos espermatozóides, o EO pode afetar a qualidade do sêmen, alterar a motilidade e a atividade mitocondrial e gerar lesões no DNA (Andrade, E.R, Ver. Bras. Reprod. Anim., v.34, n.2, p. 79-85, 2010). A diclorofluoresceína é um marcador intracelular para peróxido de hidrogênio. Esta técnica foi descrita em espermatozóides humanos, suínos e caninos (Mahfouz,R., Fertility and Sterility, v.92, n.2, p.819-827, 2009; King, S., Anim. Rep. Sci.,119, p. 106-114, 2010; Aziz, N., fertility and Sterility, v. 94, n.7, p. 2604-2608, 2010). Nenhum dado foi descrito para a espécie ovina. O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso da 2',7' diacetato de diclorofluoresceína (DCF) por citômetro de capilar (CC) para análise de EO em espermatozóides ovinos. Foram analisados os espermatozóides de 12 carneiros, adultos, homogêneos, com 7 meses de idade, colhidos por vagina artificial, semanalmente durante 4 semanas. Após colheita, o sêmen foi avaliado quanto à motilidade progressiva retilínea e concentração. Cerca de 4.000 células/ $\mu$ L foram diluídos com meio TL-sêmen e 33  $\mu$ L incubados com 3,5  $\mu$ L da sonda fluorescente DCF (concentração 1mM), para evidenciar células com estresse oxidativo e 0,5  $\mu$ L iodeto de propídeo (PI), por 5 minutos, segundo Walrand,S., Clinica Chimica Acta, v 331 (1-2), p. 103-110, 2003 e Matos, D.G., Theriogenology, v.57(5), p. 1443-1451, 2002. O PI foi utilizado para a exclusão de células com lesão de membrana, já que esta condição não permite que o corante DCF atue corretamente. Para suspensão e leitura da amostra acrescentou-se solução tampão de fosfato (PBS) sem Cálcio e sem Magnésio. Após 5 minutos foi realizada a leitura pela técnica de CC (Guava Easy Cyte Mini) no espectro de fluorescência de 500 e 530nm, fluorescência verde. A análise dos resultados foi realizada por análise de variância comparando-se as 4 semanas. Foi realizado um teste de comparação de médias (Tukey), sendo estabelecido o nível de significância em 5%. Foram obtidas as médias e os erros padrão das médias de células positivas para DCF e negativas para DCF, respectivamente, 10,6  $\pm$  5,0 e 89,4  $\pm$  5,0, na primeira semana, 9,4  $\pm$  2,2 e 90,7  $\pm$  2,2, na segunda semana, 5,15  $\pm$  1,1 e 94,8  $\pm$  1,1, na terceira semana e na quarta semana 5,9  $\pm$  1,0 e 90,1  $\pm$  4,0. Não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as semanas. Conclui-se que a avaliação por citometria capilar e a diclorofluoresceína para avaliação de presença de espécies reativas de oxigênio em sêmen de ovino é efetiva.

## SBTE 003 FISIOLOGIA DA REPRODUÇÃO DO MACHO E TECNOLOGIA DO SÊMEN

### Influência de diferentes métodos de seleção de espermatozóides sobre a integridade acrosomal, viabilidade e outros parâmetros espermáticos em sêmen congelado de caprinos

**C.C.S. Olivares<sup>1</sup>; F.Z. Brandão<sup>1</sup>; J.F.Fonseca<sup>2</sup>; L.S.A. Camargo<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil; <sup>2</sup>Embrapa Caprinos e Ovinos, Coronel Pacheco, MG, Brasil; <sup>3</sup>EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil.

**Palavras-chave:** seleção espermática; caprinos; azul de tripan/giemsa.

O processo de congelamento e descongelamento do sêmen origina uma série de injúrias aos espermatozóides. Para se obter uma maior concentração de espermatozóides viáveis aptos à fecundação *in vitro* e, consequentemente, o sucesso da produção *in vitro* de embriões com sêmen descongelado, a seleção espermática possui papel importante. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da utilização de três métodos de seleção espermática sobre diferentes parâmetros espermáticos de machos caprinos. Foi utilizado sêmen congelado de nove machos da raça Saanem, com idade entre 2 e 5 anos. Foram testados os seguintes métodos de seleção espermática: swim-up (SWU) ou migração ascendente; gradiente de densidade Percoll (GP) e lavagem por centrifugação (LC). Todos os grupos foram avaliados em triplicata. Os parâmetros avaliados foram: motilidade, vigor e concentração espermática, antes e após os tratamentos. Foi avaliada a taxa de recuperação espermática, viabilidade espermática e integridade do acrosoma por meio da coloração supravital dupla de Azul de Tripan/Giemsa. Os resultados foram analisados por análise de variância e as médias comparadas por Student Newman Keuls. Os valores são mostrados como média  $\pm$  erro padrão da média. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) na motilidade e taxa de espermatozóides vivos após o descongelamento entre os machos. O método de GP recuperou mais ( $P < 0,05$ ) espermatozóides (28,1  $\pm$  3,3%) e com maior motilidade (55,5  $\pm$  2,6%) do que o SWU (2,27  $\pm$  0,3% e 41,1  $\pm$  5,0%, respectivamente), já a taxa de recuperação espermática foi inferior ( $P < 0,05$ ) do que a obtida na LC (43,3  $\pm$  3,8%). Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) na proporção de espermatozóides vivos entre os tratamentos (51,3  $\pm$  4,0%; 47,5  $\pm$  2,3% e 47,1  $\pm$  3,3% para SWU, GP e LC, respectivamente), porém a proporção de espermatozóides vivos sem acrosoma foi maior ( $P < 0,05$ ) para o método de SWU do que para os demais métodos (4,0  $\pm$  0,8%; 1,8  $\pm$  0,3% e 2,5  $\pm$  0,4% para SWU, GP e LC, respectivamente). Os resultados obtidos no presente estudo mostram que o método de GP e LC favorecem uma maior recuperação de espermatozóides de sêmen caprino descongelado e com melhor viabilidade e menor perda acrosomal.

**Supporte financeiro:** Embrapa (03.09.06.021.00).