

Editora Poisson

# Elementos de Zootecnia Volume 1

1ª Edição

Belo Horizonte  
Poisson  
2020

**Editor Chefe:** Dr. Darly Fernando Andrade

**Conselho Editorial**

Dr. Antônio Artur de Souza – Universidade Federal de Minas Gerais

Msc. Davilson Eduardo Andrade

Dra. Elizângela de Jesus Oliveira – Universidade Federal do Amazonas

Msc. Fabiane dos Santos

Dr. José Eduardo Ferreira Lopes – Universidade Federal de Uberlândia

Dr. Otaviano Francisco Neves – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

Dr. Luiz Cláudio de Lima – Universidade FUMEC

Dr. Nelson Ferreira Filho – Faculdades Kennedy

Msc. Valdiney Alves de Oliveira – Universidade Federal de Uberlândia

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

**E38**

**Elementos de Zootecnia-Volume 1/Organização**

**Editora Poisson – Belo Horizonte – MG:**

**Poisson, 2020**

**Formato: PDF**

**ISBN: 978-65-86127-25-6**

**DOI: 10.36229/978-65-86127-25-6**

**Modo de acesso: World Wide Web**

**Inclui bibliografia**

**1. Zootecnia 2. Bovinos.3. Suínos I. Título**

**CDD-636**

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos seus respectivos autores.

[www.poisson.com.br](http://www.poisson.com.br)

[contato@poisson.com.br](mailto:contato@poisson.com.br)

# Capítulo 7

## *Produção de radicais livres em sêmen criopreservado de bovinos zebuínos e taurinos*

*Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco*

*Marlon de Araújo Castelo Branco*

*Micherlene da Silva Carneiro Lustosa*

*Rodrigo Cruz de Freitas Lima*

*Geraldo Magela Côrtes Carvalho*

*José Adalmir Torres de Souza*

*Antônio de Sousa Júnior*

**Resumo:** Objetivou-se avaliar as características de qualidade de sêmen criopreservado das raças de touros, Nelore e Curraleiro Pé-Duro, por meio do teste de lipoperoxidação espermática. Foram utilizados quarenta ejaculados de quatro touros Curraleiro Pé-Duro, e quatro touros Nelore, obtidos igualmente, a partir de eletroejaculação, os quais foram diluídos em Tris-Gema, criopreservado em máquina TK 3000®, e armazenado em botijão criogênico. Após o descongelamento foram avaliados quanto a quantificação da lipoperoxidação da membrana espermática e determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH). A análise estatística foi realizada utilizando o GraphPad Prism 6.01 (2012), e as diferenças foram consideradas significativas quando  $p > 0,05$ . A produção de metabólitos como o malonaldeído pelo processo de peroxidação espermática foi menor na raça Curraleiro Pé-duro. Em conclusão, o sêmen criopreservado da raça Curraleiro Pé-Duro demonstrou menor estresse oxidativo ao processo de criopreservação.

**Palavras-chave:** Espécies Reativas de Oxigênio, Lipoperoxidação, Malonaldeído

## 1. INTRODUÇÃO

A inseminação artificial juntamente associada a criopreservação, tem papel fundamental na disseminação mais ampla de germoplasma de animais de alto valor genético. No entanto, apesar das vantagens proporcionada pela criopreservação, esta biotécnica causa efeitos deletérios aos espermatozoides, incluindo a indução prematura da reação acrossômica, perda de motilidade, redução na integridade do DNA, danos nas membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial, prejudicando assim a fertilidade (Morrell e Mayer, 2017).

Em bovinos o principal constituinte espermático afetado pelo processo de criopreservação é a membrana plasmática, sobretudo devido à alteração na composição lipídica, com perda de fosfolipídios totais, podendo ser atribuída essa perda a reações de peroxidação lipídica induzida por substâncias reativas de oxigênio (Buhr et al., 1994). Deste modo, o presente estudo teve por objetivo avaliar a lipoperoxidação da membrana espermática e determinar os níveis de glutatona reduzida (GSH) do sêmen criopreservado das raças de touros, Nelore e Curraleiro Pé-Duro.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Todos os procedimentos realizados com os animais estavam em conformidade com a legislação europeia para experimentação animal (Diretiva 2010/63 / UE) e com a legislação brasileira em pesquisa animal (Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008). O procedimento descrito neste artigo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da EMBRAPA MEIO – NORTE, sob o protocolo de 001/2016.

### 2.2. DILUIDORES EXPERIMENTAIS

O diluidor Tris-Gema constituído a partir de 3,605 g de Tris; 2,024 g de ácido cítrico; 1,488g de frutose; 25 MG de gentamicina; 50.000 UI de penicilina; 100 mL de água destilada; 20% de gema de ovo e 5% de glicerol, com osmolaridade de 350 mOsm/kg e pH 6,8, foi utilizado para diluição e congelamento do sêmen.

### 2.3. ANIMAIS

Foram utilizados quatro touros da raça Curraleiro Pé-Duro (CPD), provenientes da Fazenda Sol Posto de propriedade da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Meio Norte localizada na cidade de Campo Maior, Piauí, Brasil e quatro touros da raça Nelore, provenientes da Fazenda Santa Luzia localizada na cidade de Valença, Piauí, Brasil. Todos os touros possuíam idades média de 5 anos, pesando entre 310 a 365 Kg e com escore de condição corporal 3-4 (escala 1-5). Tinham histórico de fertilidade comprovada e foram avaliados quanto à saúde geral, à integridade dos órgãos reprodutivos e à qualidade espermática. Durante o experimento, os touros foram mantidos sob regime extensivo, em pastejo de gramíneas nativas, água e sal mineral à vontade.

### 2.4. COLETA DE SÊMEN E AVALIAÇÃO INICIAL

As coletadas de sêmen foram feitas duas vezes por semana, durante seis semanas, perfazendo cinco coletas para cada raça, totalizando 40 ejaculados, com o auxílio de um eletroestimulador controlado automaticamente (Biocon ® Soluções para Biotecnologia, Uberaba, Minas Gerais, Brasil), utilizando um tubo conico graduado de 15 mL, estéril. Logo após a coleta as amostras de sêmen de cada animal foram colocadas em banho Maria a 37 °C e avaliadas separadamente quando a cor, aspecto, volume (mL), turbilhonamento (0-5), motilidade total (%) e vigor espermático (1-5), em microscópio de contraste de fase (Olympus optical Co., Ltda., 163 Tóquio, Japão). A concentração espermática foi obtida em câmara de Neubauer, na diluição de 1:200, em solução de citrato de sódio em formol a 4 %. Para análise da morfologia espermática, utilizou-se o método de câmara úmida, segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA 2013). Apenas ejaculados com turbilhonamento  $\geq 3$ ; motilidade total  $\geq 80\%$ ; vigor  $\geq 3$ ; concentração espermática  $\geq 3,5 \times 10^9$  espermatozoides/mL e patologias espermáticas  $\leq 20\%$  foram utilizados nesse estudo. Quando aprovados, as amostras dos oito ejaculados foram diluídas separadamente em tris gema, e logo em seguida, foram submetidas a uma nova avaliação, objetivando eliminar qualquer efeito negativo do diluidor sobre as amostras estudadas.

## 2.5. CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN

O sêmen foi diluído, e envasado em palheta de 0,25mL (20 X 10<sup>6</sup> espermatozoides viáveis por palheta) e congelado em máquina TK 3000® (TK Tecnologia em congelação Ltda, Uberaba, Brasil), na curva de congelação rápida (-0,5° C/min, de 25° C a 5° C e -20° C/min, de 5° C a -120° C) e, após atingir -120° C, as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido (-196° C) e armazenadas em botijão criogênico. O tempo de equilíbrio na temperatura de 5° C foi de 60 minutos. Após 30 dias de armazenamento as amostras de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos e avaliadas quanto à quantificação da lipoperoxidação da membrana espermática, e a quantificação da glutathiona reduzida (GSH)

## 2.6. QUANTIFICAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO DA MEMBRANA ESPERMÁTICA

A taxa de peroxidação lipídica dos espermatozoides foi estimada pela medida do nível de malonaldeído (MDA), utilizando o ácido tiobarbitúrico (TBA), baseado no método descrito por Buege e Aust (1978). Os níveis de malonaldeído foram medidos após a suplementação de 500 µL de sêmen pós-criopreservado, mais Tampão Tris-ácido cítrico, pH 7,4, adicionado a 1mL do reagente TBA (15% de ácido tricloroacético; 0,25N de ácido clorídrico e 0,375% de ácido tiobarbitúrico) e 1% (v/v) de BHT 50mM. A mistura foi tratada em água fervente (100 ° C) durante 15 min. Posteriormente as amostras foram resfriadas, e centrifugadas a 1.200g por 15 min. O sobrenadante foi removido e a absorbância foi medida a 535 nm em espectrofotômetro UV-VIS (Perkin Elmer - Lambda). A concentração de MDA foi determinada pela curva de calibração feita diariamente com malonaldeído (MDA) como padrão, nas concentrações de 1 a 20mmol. O MDA produzido foi expresso em µmol de TBARS/mL de diluidor.

## 2.7. MÉTODO DA DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

A determinação da concentração de GSH foi baseada na reação de Ellman (5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico), conforme algumas modificações da técnica descrita por Khan et al. (2011). Em um tubo contendo tampão EDTA pH 5,4, foram adicionados 400 µL de sêmen, acrescidos de 320 µL de água destilada, mais 80 µL de ácido tricloroacético a 50%. O material foi agitado e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida, foram recolhidos 400 µL do sobrenadante e acrescido de 800 µL de tampão Tris-HCl 0,4 M, pH 8,9 e mais 20 µL de DTNB 0,01 M; após 1 minuto de reação, foi feita a leitura em espectrofotômetro em 412 nm. A concentração foi expressa em µM/mL. Para a curva padrão da glutathiona foram feitas soluções de glutathiona a 6,66; 13,33; 26,66; 40; 53,33 e 66 µM.

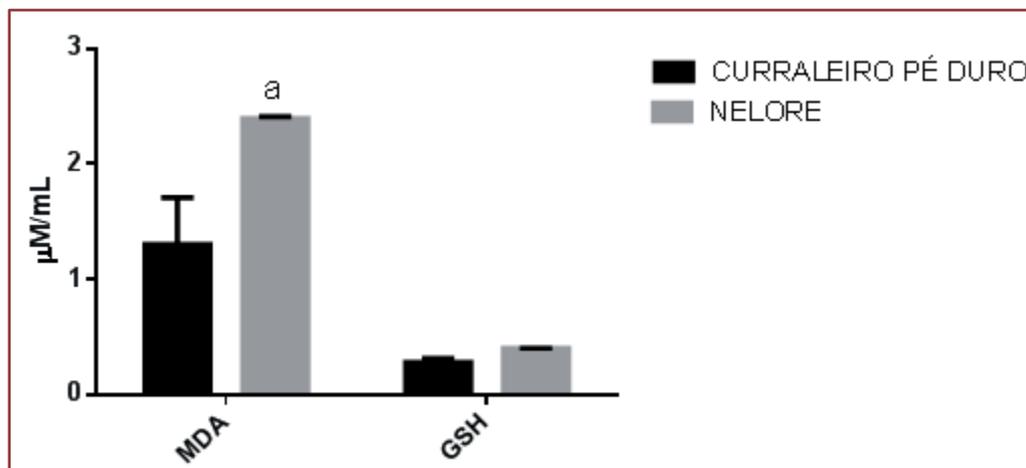
## 2.8. DELINEAMENTO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi em bloco ao acaso, com duas raças, Nelore e Currealeiro Pé-Duro, oito blocos (animais), cinco repetições (coletas). A quantificação da glutathiona reduzida e de malonaldeído foi submetida a Análise de Variância (ANOVA), seguido de Tukey como post hoc teste, na probabilidade de 5%. As análises foram realizadas por meio do software GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, EUA, 2012).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, observou-se que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para a determinação de malonaldeído entre as raças, verificando-se um aumento na produção de malonaldeído na Nelore, quando comparada à Currealeiro Pé-Duro. O mesmo não pode se observar para a quantificação de glutathiona reduzida – GSH ( $p > 0,05$ ).

Figura 1 - Quantificação de MDA e GSH em sêmen pós-criopreservado de touros, de duas diferentes raças. MDA: Malonaldeído. GSH: Glutationa reduzida. CN CPD: Controle Curraleiro Pé-Duro. CN Nelore: Controle Nelore. Os valores representam a média  $\pm$  D.P.M. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA two-way), seguido de Sidak como post hoc teste, ( $p < 0,05$ ).



A criopreservação através das alterações térmicas e osmóticas, atua sobre as células espermáticas induzindo a geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS), resultando em danos morfológicos e funcionais das membranas espermática, e comprometendo a motilidade dos espermatozoides, a integridade da membrana e o potencial de fertilização (Hu et al., 2010). Além disso o espermatozoide devido ao tamanho do seu citoplasma, apresenta capacidade antioxidante reduzida (Sariözkan et al., 2009).

Neste estudo observou-se que os espermatozoides criopreservados da raça Nelore produziram mais malonaldeído, quando comparados aos da raça Curraleiro Pé-Duro. A presença ou a adição de ácidos graxos poliinsaturados ao diluidor podem melhorar os parâmetros de motilidade total e progressiva e a viabilidade do sêmen pós-descongelamento, em animais *Bos taurus* (Monique, 2013). Neste raciocínio, acredita-se que a raça Curraleiro Pé-Duro possui no plasma seminal um sistema redox equilibrado, com concentrações de ácidos graxos poliinsaturados nos espermatozoides, em níveis necessários para manter a taxa de peroxidação lipídica baixa. Alguns autores verificaram que o efeito positivo, representado pela baixa produção de malonaldeído, ocorra devido a maiores porcentagens de ácido docosahexaenóico (DHA, n-3) e da proporção de n-3/n-6 nos espermatozoides, antes e após a criopreservação.

A diferença estatística observada no teste de TBARS neste estudo, deve-se também a interação de frutose, fonte de energia do espermatozoide bovino e presente na solução crioprotetora, com o ácido tiobarbitúrico (TBA) diminuindo as concentrações de malonaldeído no sêmen da raça Curraleiro Pé-Duro, quando comparado à Nelore (Rodrigues, 2009).

## 5. CONCLUSÃO

Em conclusão, o sêmen criopreservado da raça Curraleiro Pé-Duro demonstrou menor estresse oxidativo ao processo de criopreservação.

## REFERÊNCIAS

- [1] BUHR, M. M., Curtis, E. F., & Kakuda, N. S. 1994. Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*, 31, 224–38.
- [2] Hu, j.h., Zan, l.s., Zhao, x.l., li, q.w., jiang, z.l., li, y.k., et al. 2010. Efeitos da suplementação de trealose sobre a qualidade do sêmen e variáveis de estresse oxidativo em sêmen bovino congelado-descongelado. *Journal of animal science*.88 : 1657–1662.
- [3] Morrell, J. M., & Mayer, I. 2011. Reproduction biotechnologies in germplasm banking of livestock species: a review. *Zygote*, 25, 545–557.
- [4] Rodrigues, M.P. 2009. Perfil oxidativo e avaliação funcional de sêmen criopreservado de touros (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*) criados em clima tropical. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
- [5] Sariözkan, S., Bucak, M.N., Tuncer, P.B., Ulutaş, P.A., Bilgen, A. 2009. A influência de cisteína e taurina nos parâmetros de estresse oxidativo-microscópico e capacidade de fertilização do sêmen de touros após a criopreservação. *Criobiologia*.58 : 134–138.