

## **APLICAÇÃO DE ESRESSE CONTROLADO ATRAVÉS DE PRESSÃO NEGATIVA NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EQUINO**

Cláudia Anacleto Amorim, discente de graduação, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiiana

Daliza Bruno Ribeiro, discente de graduação, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiiana

Elise dos Santos Guerra, discente de graduação, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiiana

Flávio Arci Araújo, mestrando de pós graduação, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiiana

Fabrcio Desconsi Mozzaquatro, docente, Universidade Federal do Pampa Campus Uruguaiiana

E-mail primeiro autor: [claudiaamorim.aluno@unipampa.edu.br](mailto:claudiaamorim.aluno@unipampa.edu.br)

A criopreservação do semên equino é uma biotécnica de reprodução que tem como objetivo garantir o melhoramento genético através do congelamento e descongelamento, maximizando a utilização de garanhões. Entretanto, sabe-se que esse processo leva a um estresse térmico, mecânico, químico e osmótico que pode reduzir a fertilidade. Alguns trabalhos têm sugerido que a submissão de células, gametas e embriões a um estresse subletal controlado pode influenciar positivamente na criotolerância. Dentre os tipos de estresse utilizados a pressão hidrostática positiva é a mais utilizada. Contudo, outras formas de fornecimento de estresse já foram testadas como variação térmica, estresse osmótico e pressão negativa. A pressão negativa tem sido utilizada para melhorar a criopreservação de oócitos e embriões bovinos, células somáticas e sêmen de carneiro. Este trabalho tem como objetivo avaliar a cinética de espermatozoides criopreservados submetidos a diferentes intensidades de pressões negativas. Foram utilizados 13 ejaculados de quatro garanhões sadios com idade média de  $12,5 \pm 5,5$  anos. Todos os animais apresentaram saúde reprodutiva e foram mantidos nas mesmas condições em piquetes com pastagem de campo nativo, água e sal mineral *ad libitum*, sendo suplementados com 1,5% de concentrado. Os garanhões tiveram suas reservas seminais extra gonadais esgotadas para que desse início ao experimento. As coletas de sêmen foram realizadas com vagina artificial (modelo Botucatu). Após as coletas, o sêmen foi diluído com Botusêmen® na proporção 1:1 (sêmen:diluyente). Posteriormente, o ejaculado diluído foi transportado até o laboratório em caixa térmica sob refrigeração a 15°C. No laboratório foram realizadas análises imediatas: Motilidade total, progressiva e vigor. Ainda foram realizadas coloração supravital e verificação de patologias espermáticas para que essas amostras pudessem ser incluídas no experimento. Os parâmetros mínimos para liberação do ejaculado, seguiram o preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Após as análises iniciais o ejaculado foi dividido, de forma homogênea em tubos de 15 ml, nos grupos experimentais: Controle (sem exposição a pressão negativa), P200 (exposto a pressão negativa de 200 mbar), P500 (exposto a pressão negativa de 500 mbar), P800 (exposto a pressão negativa de 800 mbar). A técnica de exposição à pressão negativa respeitou o tempo de 15 minutos no total, onde se utilizou uma bomba de vácuo Vix® (¼ hp 60Hz) acoplada a uma câmara

de pressão que forneceu uma atmosfera de 200 a 800mbar. Após o período de exposição à pressão o sêmen foi centrifugado a 600x G por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em diluente Botucurio®, sendo a concentração espermática ajustada a  $100 \times 10^6$  spz/ml. Os espermatozoides foram envasados em palhetas de 0,5 ml e congelados na máquina automatizada TK 3000. A curva de resfriamento utilizada foi de  $0,5^\circ\text{C}/\text{min}$  e a curva de congelamento  $-20^\circ\text{C}/\text{min}$  até que fosse atingida a temperatura de  $-60^\circ\text{C}$ . Posteriormente as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido e estocadas em botijões a  $-196^\circ\text{C}$  até o momento das avaliações. O procedimento de descongelamento seguiu o protocolo preconizado pelo Laboratório de Produção e Reprodução Equina (descongelamento em banho-maria a  $37^\circ\text{C}/30$  segundos). Posteriormente, foi realizada a análise computadorizada da cinética espermática (CASA). As variáveis mensuradas foram as seguintes: motilidade total, motilidade circular, motilidade rápida, motilidade lenta, motilidade local, motilidade progressiva e imóveis. Estas análises foram realizadas no laboratório de reprodução animal (REPROLAB/UFRGS). As variáveis foram analisadas utilizando o pacote estatístico SPSS com teste de Tukey com nível de significância de 5%. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. Os resultados obtidos demonstraram que as pressões negativas não influenciaram nas variáveis de cinética espermática. Os valores médios obtidos para a variável motilidade total nos diversos tratamentos (controle:  $45,93 \pm 14,11\%$ ; P200:  $43,19 \pm 10,76\%$ ; P500:  $45,05 \pm 12,19\%$ ; P800:  $41,20 \pm 13,20\%$ ) não foram diferentes ( $p > 0,05$ ). Os resultados obtidos em relação a motilidade total (Controle:  $45,9 \pm 14,1\%$ ; P200:  $43,18 \pm 10,8\%$ ; P500:  $45,0 \pm 12,1\%$ ; P800:  $41,2 \pm 13,2$ ), motilidade circular (Controle:  $1,9 \pm 1,2\%$ ; P200:  $2,3 \pm 0,9\%$ ; P500:  $2,4 \pm 1,0\%$ ; P800:  $1,6 \pm 1,2\%$ ), motilidade rápida (Controle:  $6,7 \pm 3,7\%$ ; P200:  $5,5 \pm 1,8\%$ ; P500:  $6,0 \pm 4,2\%$ ; P800:  $4,1 \pm 2,3\%$ ), imóveis (Controle:  $54,0 \pm 14,1\%$ ; P200:  $56,6 \pm 10,9\%$ ; P500:  $54,9 \pm 12,1\%$ ; P800:  $58,7 \pm 13,1\%$ ), motilidade lenta (Controle:  $20,3 \pm 10,2\%$ ; P200:  $17,4 \pm 6,4\%$ ; P500:  $16,8 \pm 7,4\%$ ; P800:  $15,3 \pm 8,9\%$ ) e motilidade local (Controle:  $16,8 \pm 6,5\%$ ; P200:  $17,9 \pm 5,9\%$ ; P500:  $18,2 \pm 6,6\%$ ; P800:  $19,9 \pm 8,1\%$ ) não apresentaram diferença estatística entre os grupos controle e as diferentes pressões. Desta forma, concluímos que a submissão de espermatozoides equinos a um estresse controlado por meio de diferentes pressões negativas não alteram a cinética espermática.

**Agradecimentos:** Unipampa, Estância Itapitocai, (Reprolab, UFRGS), LPEqui, Botupharma.

**Palavras-chave:** Melhoramento genético; Cinética espermática.