

Universidade Federal do Ceará
Unidade Multiusuário NPDM

Avaliação em citometria de fluxo do sêmen criopreservado de caprinos das raças Saanen e Anglu Nubiano em meio diluente água de coco em pó (ACP) e Tris.

1. Informações do Projeto

Proponente: JOSÉ FERREIRA NUNES

CPF: 03121950363

Comitê de Ética: CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

2. Descrição

Objetivando avaliar os efeitos estruturais e função espermática após criopreservação de sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) e a solução Tris. Foram coletados ejaculados de 20 caprinos com três coleta por animal. Em cada coleta, os ejaculados foram analisados separadamente, reunidos a cada quatro em forma um pool, sendo este, divididos em duas frações (A e B) e diluídos na concentração de 400×10^6 spz/ml. Fração A: meio à base de água de coco em pó (ACP-101c; 300 mOsm/L; pH 6,8, ACP Biotecnologia, Fortaleza-CE, Brasil) acrescido de 5% de gema de ovo, 40 mg de antibiótico (gentamicina) e 7% de crioprotetor (glicerol); fração B: Tris (hidroximetil-aminometano), 94.7 mM ácido cítrico, 27.7 mM frutose, 10% (v/v) gema de ovo. Em seguida, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 ml (100×10^6 spz). As amostras foram refrigeradas em geladeira por uma hora. Ao atingir 4 °C, as amostras foram mantidas por mais 30 minutos de estabilização. Após este período, o sêmen foi congelado em vapor de nitrogênio (- 60 °C) por 15 min., a uma altura de 5 cm do nitrogênio líquido, e então imersas em nitrogênio líquido a -196 °C e armazenadas em botijões criogênicos. A primeira análise foi a cinética espermática em sistema CASA (Sperm Class Analyser® - SCA®, Microptic S.L, Barcelona, Espanha), com os parâmetros avaliados: motilidade total (MOV - %), motilidade progressiva (PROG - %), velocidade curvilínea (VCL - $\mu\text{m/s}$), velocidade média do percurso (VAP - $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN - %). Para avaliação da integridade de membrana espermática, integridade acrossomal e função mitocondrial, será adotado as sondas fluorescentes iodeto de propídio (IP, P4170, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), isotiocianato de fluoresceína conjugada a aglutinina do Pisum sativum (FITC-PSA, L0770, Sigma-Aldrich) e iodeto de 5,5,6,6-tetracloro-1,1,3,3-tetraetil-benzimidazolilcarbocianina (JC-1, T4069, Sigma-Aldrich). Será descongelado uma palheta de cada amostra. Uma alíquota de 150 μl de sêmen descongelado serão re-diluídas PBS para se obter 50×10^6 spz/ml, em tubos separados, será adicionado 6 μl de FITC-PSA (100 $\mu\text{g/ml}$ em PBS) e 6 μl de JC-1 (153 mM em dimetilsulfóxido) em microtubo e incubado a 37 °C por 5 minutos em escuro e adicionado de 1,5 μl de IP (0,5 mg/ml em tampão fosfato salino, PBS). As avaliações serão em citômetro de fluxo (FACSVerse, BD Biosciences), como descrito por Kumaresan et al. (2017) e Freitas, (2015) para sêmen bovino, com avaliação de 10 mil células por amostras. Os resultados do citômetro, serão ajustado utilizando o programa FlowJo e submetidos a análise estatística.

3. Justificativa de Uso

Devido a uma gama de nutrientes presente no diluente ACP 101c e este apresenta bons resultados

de motilidade após a descongelação, e, sendo o tris uma solução tamponante adicionado apenas de uma fonte de energia mais crioprotetor, faz-se necessário avaliar os efeitos estruturais e funcionais dos espermatozoides descongelado de caprinos. Bem como, utilizar estes resultados de citometria de fluxo para embasar pesquisas in vivo por meio de inseminação artificial, contribuindo com o avanço tecnológico na agropecuária.

4. Participantes do Projeto

Participante 1

Nome: Renata Sá de Castro Pires

Email: renatascp_vet@hotmail.com

Participante 2

Nome: Marcimar Silva Sousa

Email: marcimarmv@hotmail.com

Participante 3

Nome: Cristiane Clemente Mello Salgueiro

Email: crismelloacp@gmail.com

Participante 4

Nome: Bruna Farias Brito

Email: bruna.brito@aluno.uece.br