



**Universidade Federal de Pelotas**  
**Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária**



**ALTEAÇÕES DA INTEGRIDADE DO DNA DO  
ESPERMA DURANTE O PROCESSO DE  
CRIOPRESERVAÇÃO E INCUBAÇÃO *IN VITRO* DE  
SEMÊM DE TOUROS**

**Apresentadores: Francielle Bado e Ginter Silva da Cunha**  
**Orientação: Elisângela Mirapalheta Madeira**

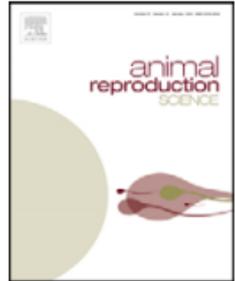
**Pelotas, 27 de abril de 2010**



Contents lists available at ScienceDirect

## Animal Reproduction Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/anireprosci](http://www.elsevier.com/locate/anireprosci)



# Alterations of sperm DNA integrity during cryopreservation procedure and in vitro incubation of bull semen

K.E. Waterhouse, A. Gjeldnes, A. Tverdal, P.M. De Angelis,  
W. Farstad, M. Haard, E. Kommisrud

FI: 1,89

# INTRODUÇÃO



◆ O que é criopreservação de sêmen?

◆ Consiste em um processo de tratamento em meios especiais e congelamento para uso posterior.

# INTRODUÇÃO



- ◆ Transporte;
- ◆ Aumentar a prole;
- ◆ Melhoramento genético;
- ◆ Uso posterior.



# INTRODUÇÃO



## **Prejuízos econômicos com danos no DNA do esperma:**

- ❖ Retorno ao cio;
- ❖ Maior concentração da dose de sêmen;
- ❖ Manutenção do sêmen em laboratório;
- ❖ Mão de obra;
- ❖ Custo da dose;
- ❖ Entre outros.

# OBJETIVO



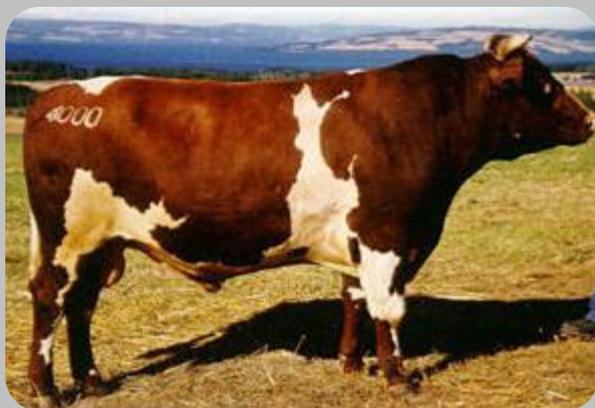
**Comparação da integridade do DNA do sêmen de touro da raça NRF diluído em SMEY e Triladyl no processo de criopreservação e incubação *in vitro*, assim como, comparação entre o sêmen de touros das raças NRF e Holandês diluídos em Triladyl®.**

# MATERIAIS E MÉTODOS



40 animais

20 Red Norueguês  
15 a 17 meses



TNR: 71,2%

20 Holandês  
12 a 16 meses



TNR: 67,4%

# MATERIAIS E MÉTODOS



## Experimento I

Congelado  
N<sub>2</sub>L sem  
diluyente



20 ejaculados NRF



determinação  
concentração



SMEY

TRILADYL®

14%  
GLICEROL

+

5% GEMA  
DE OVO

7% GLICEROL

+

20% GEMA DE  
OVO

# MATERIAIS E MÉTODOS



**SÊMEN NRF**



**CONCENTRAÇÃO**

**Solução SMEY**

**136 x 10<sup>6</sup> sperm./ml**

**Solução Triladyl<sup>®</sup>**

**68 x 10<sup>6</sup> espm./ml**

**MOTILIDADE**



mini palhetas 0,25 ml  
**15 x 10<sup>6</sup> espm/palheta**

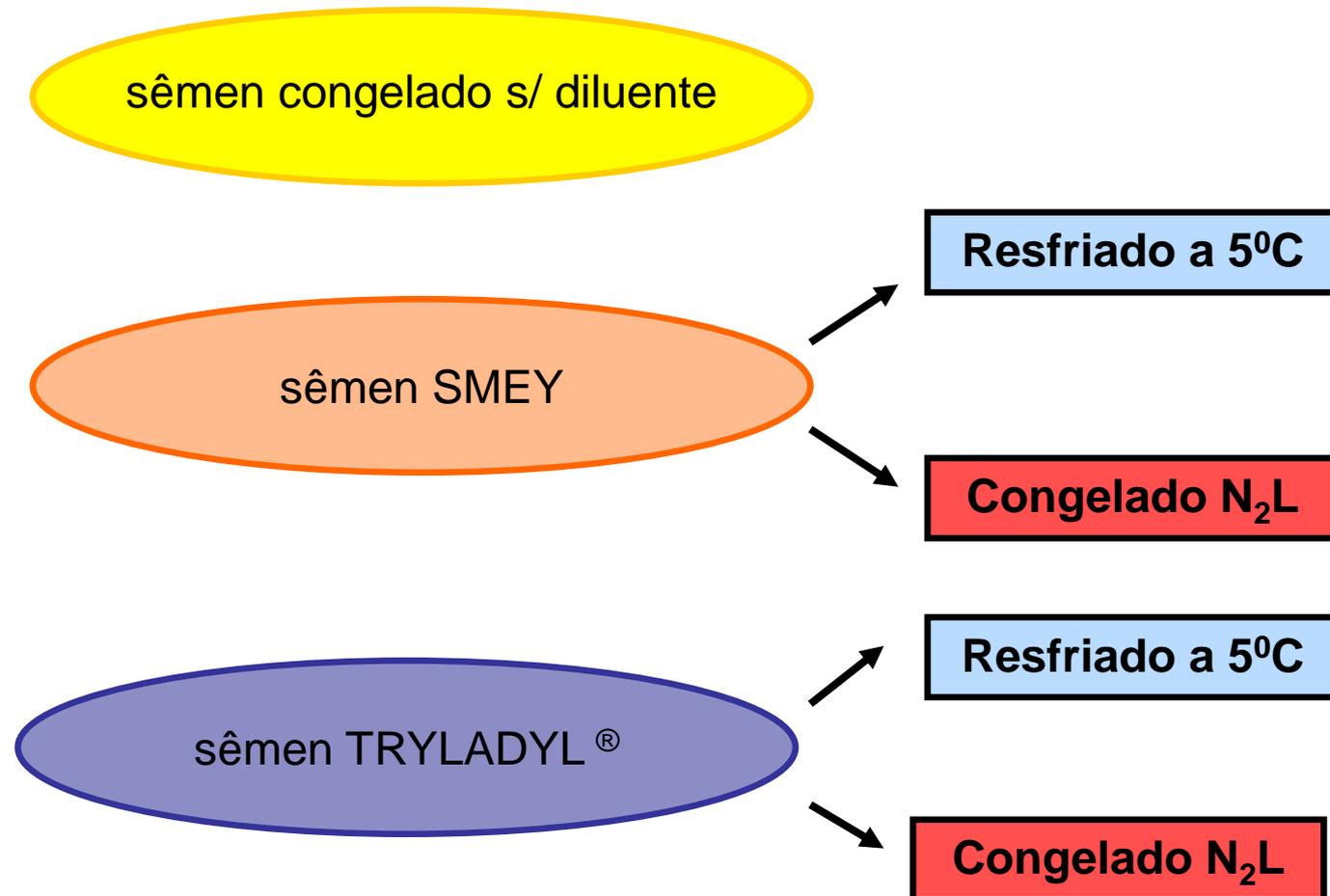


**Resfriado a 5°C**



**Congelado N<sub>2</sub>L**

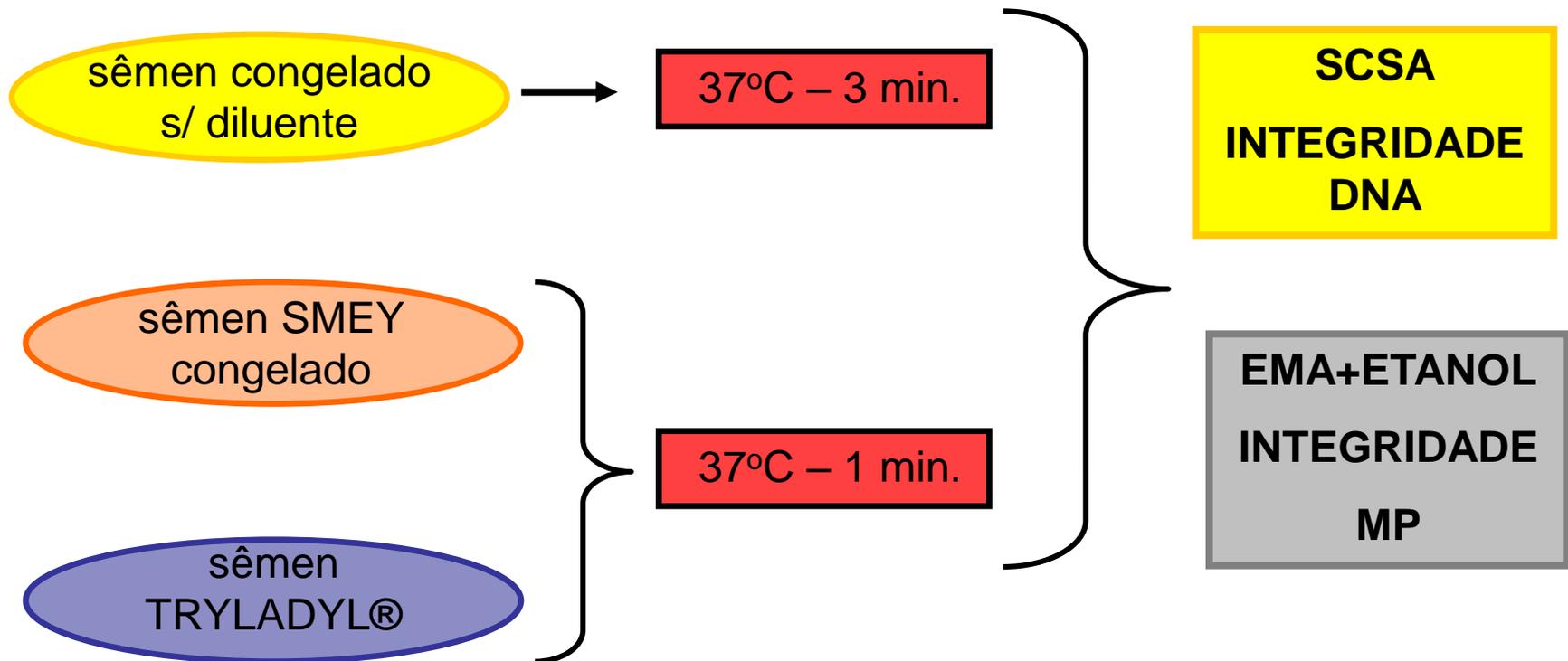
## Experimento I – AMOSTRAS NRF



# MATERIAIS E MÉTODOS



## TEMPO DE DESCONGELAMENTO



## Experimento II

20 ejaculados HOLLANDÊS

CONCENTRAÇÃO  
MOTILIDADE



Solução Trilady®  
68 x 10<sup>6</sup> espm./ml



mini palhetas 0,25 ml

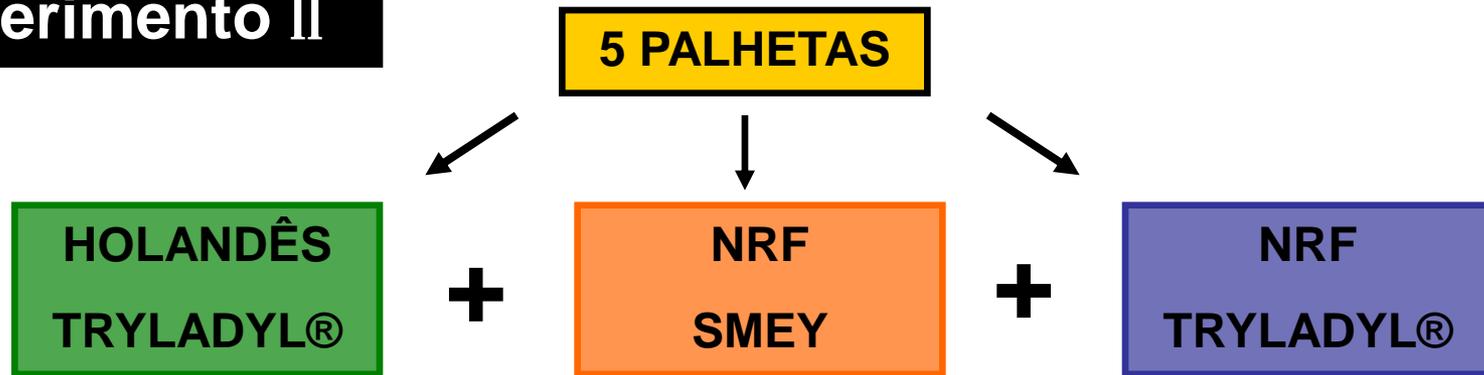


Congelado N<sub>2</sub>L

# MATERIAIS E MÉTODOS



## Experimento II



- mSOF - 1:1 - (34 x 10<sup>6</sup> espm/ml)
- 0,1% MEM
- 0,2% BME
- 5% ECS

zero hora  
incubação



Incubados – 5% CO<sub>2</sub> a 38,8°C

# MATERIAIS E MÉTODOS



SCSA

EMA +  
ETANOL

Avaliação  
integridade  
DNA

Avaliação  
integridade  
MP

0 h

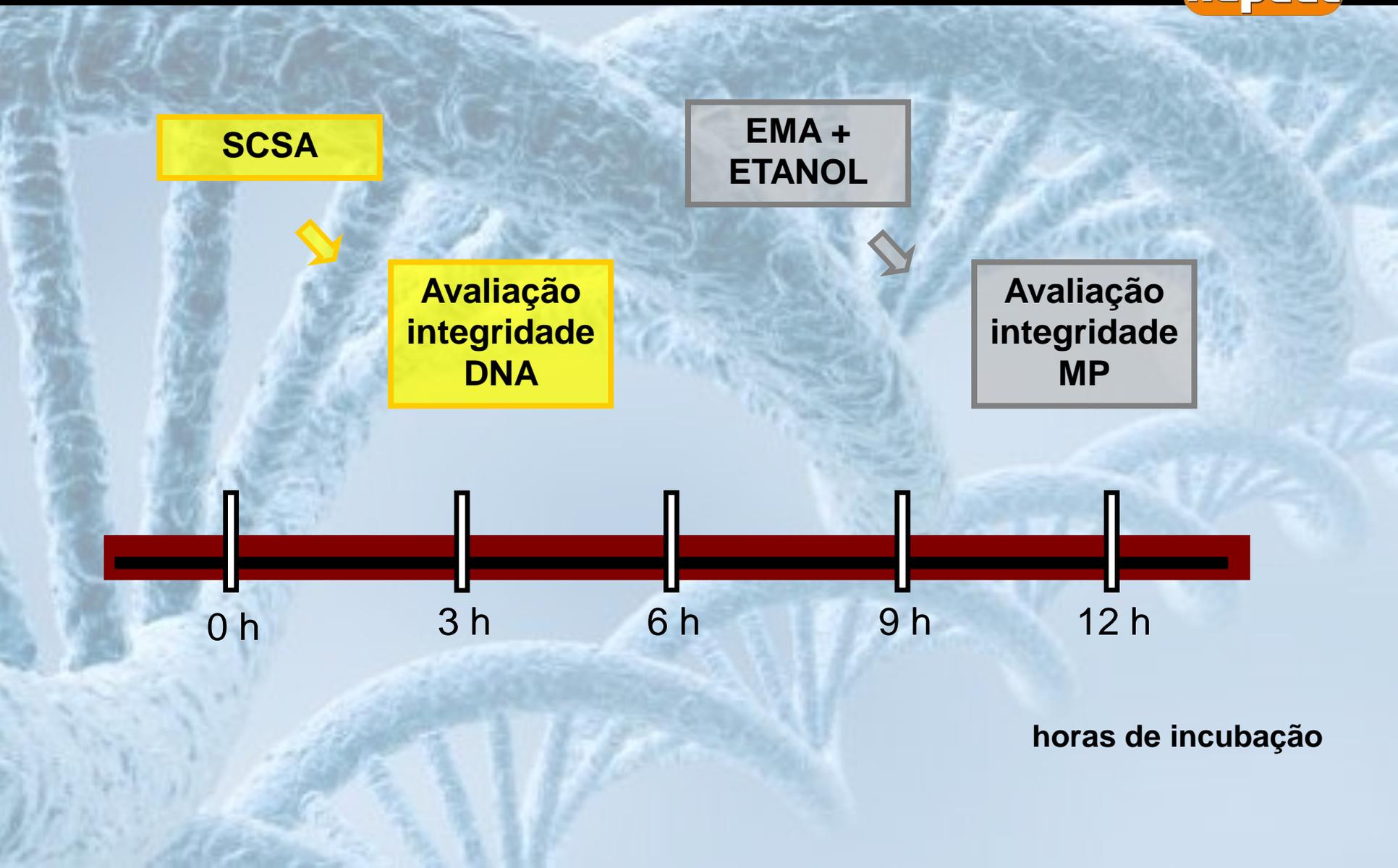
3 h

6 h

9 h

12 h

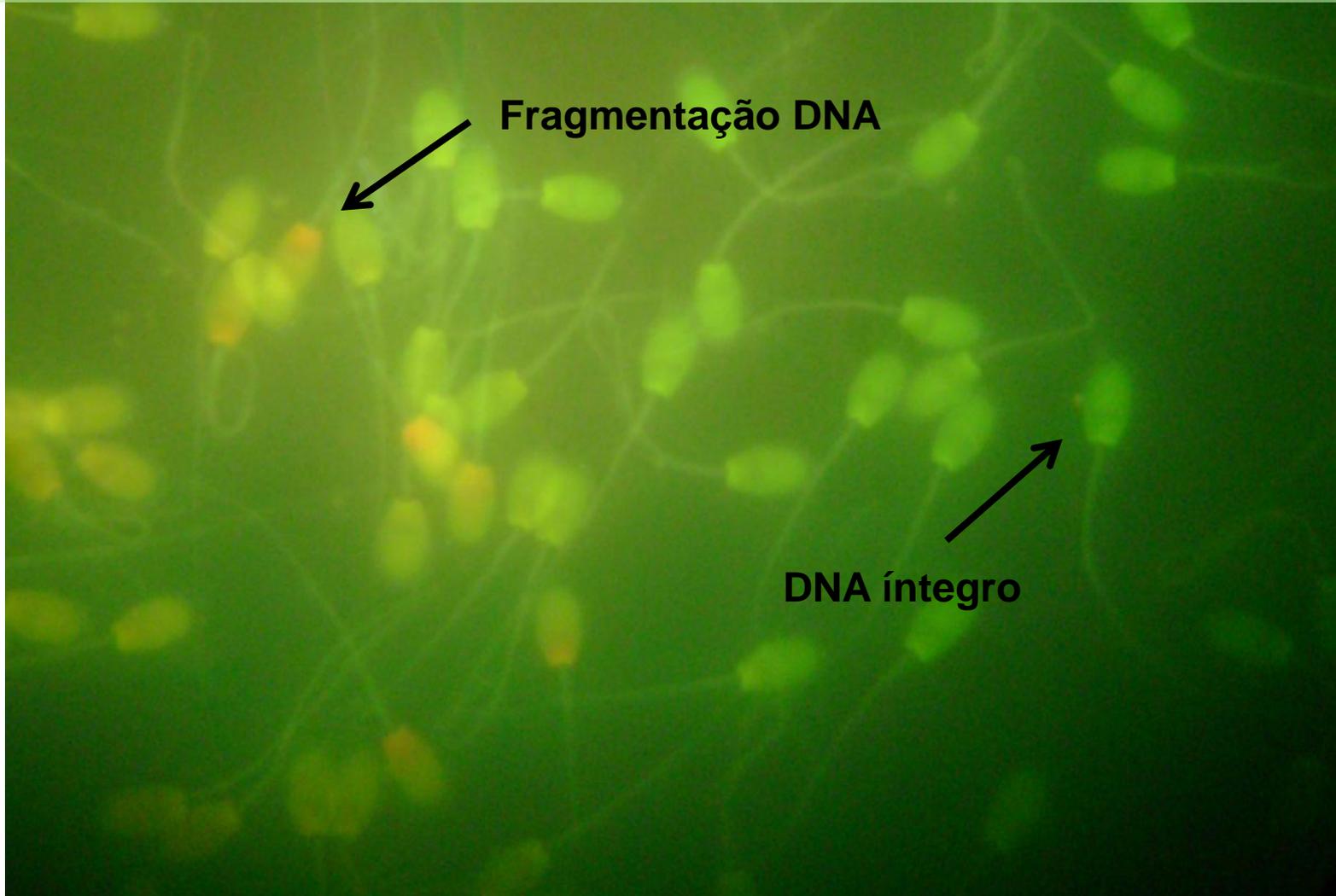
horas de incubação



# MATERIAIS E MÉTODOS



SCSA : estrutura da cromatina do espermatozóide



# MATERIAIS E MÉTODOS



## EMA: Etídio Monoazida

MP íntegra



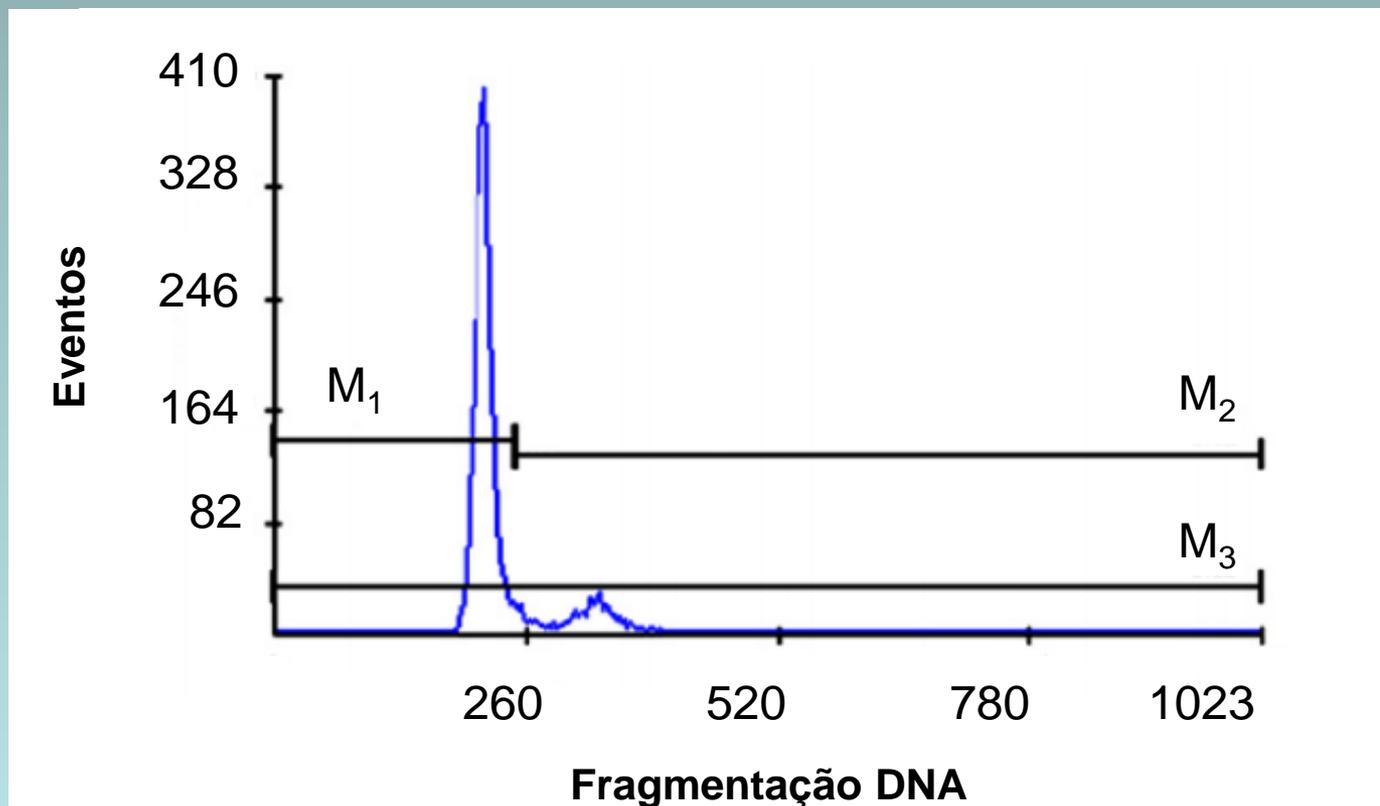
Lesão MP



# RESULTADOS



**Fig.1** - Histograma da fragmentação do DNA (DFI + fluorescência) do sêmen; regiões M1 – M3 foram usadas para determinar: (1) percentagem de espermatozóides com DNA intacto ( $M_1$ ), (2) percentagem de espermatozóides com fragmentação de DNA (% DFI,  $M_2$ ), e (3) grau (média DFI) e heterogêneo (SD DFI) da fragmentação do DNA do espermatozóide no total da população ( $M_3$ ).



# RESULTADOS



**Tabela. 1** - Valores médios da integridade do DNA do esperma nos três estágios, durante a rotina do processo de criopreservação do sêmen NFR em SMEY e TRILADYL®.

Sêmen n/diluído		Diluído 5°C		Descongelado	
		SMEY	TRILADYL®	SMEY	TRILADYL®
% DFI	4.8	7.7 ***	4.7	8.9 ***	6.2 **
MÉDIA DFI	222.8	221.7	221.7	225.3	225.6 *
SD DFI	48.8	44.1***	48.1	48.1	46.4

DFI – Fragmentação de DNA

MÉDIA DFI – Média de fragmentação DNA

SD DFI – Fragmentação heterogênea do DNA

\* P <0.05

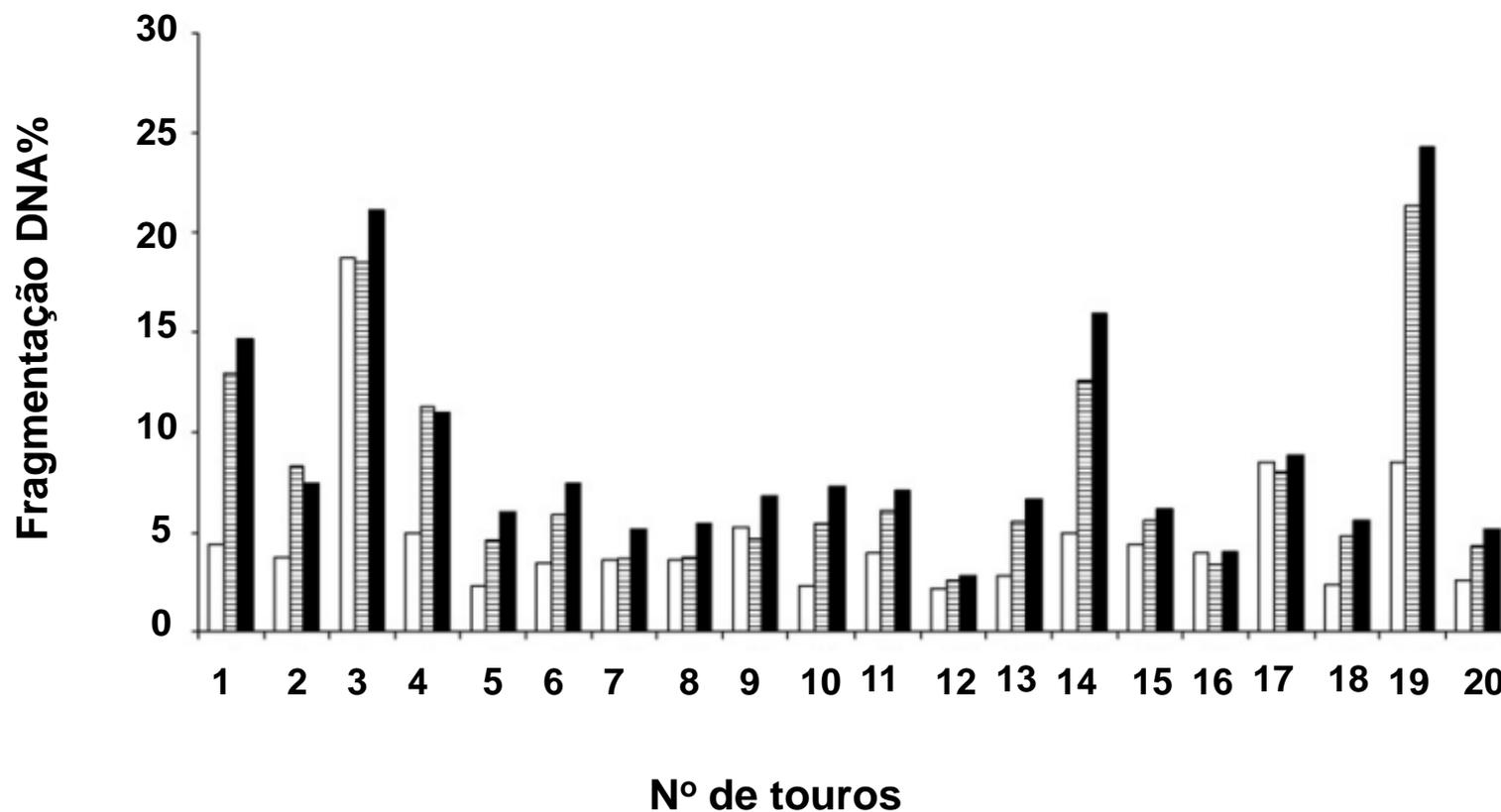
\*\* P <0.001

\*\*\* P <0.0001

# RESULTADOS



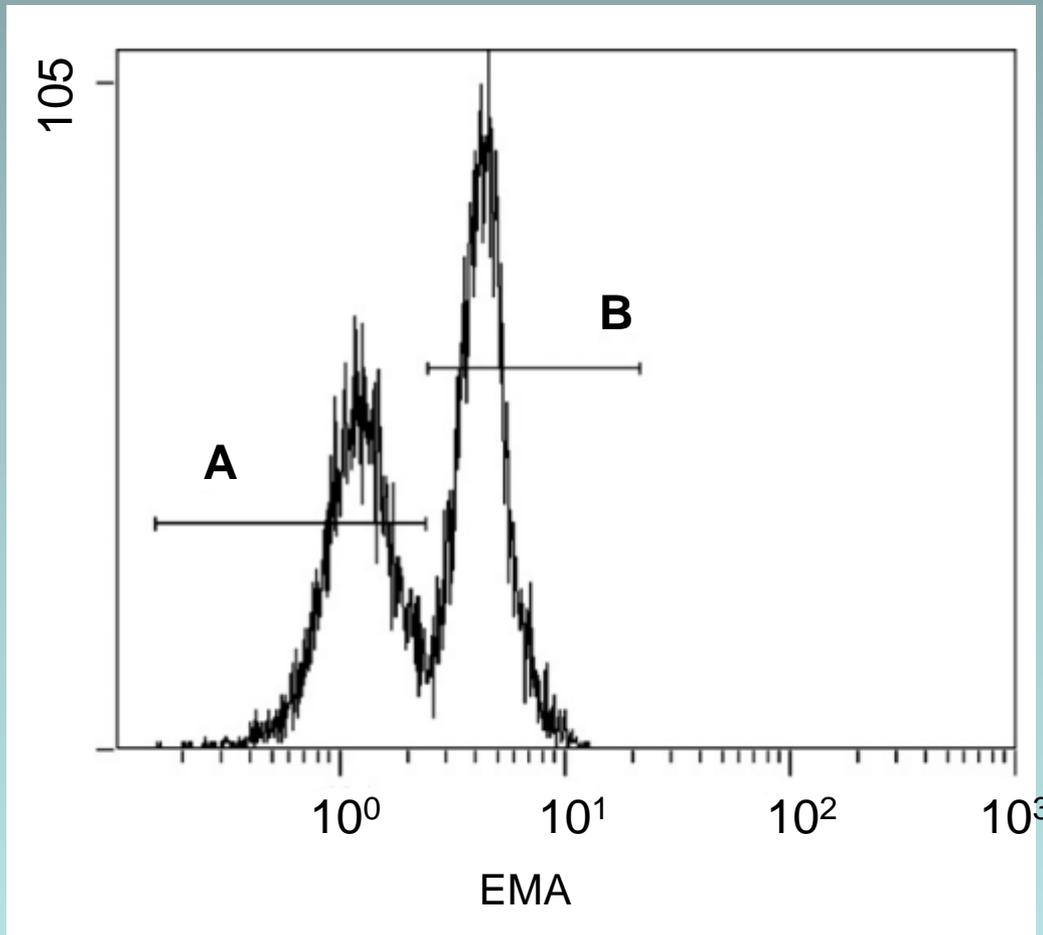
**Fig. 2** - A fragmentação do esperma (DFI,%) para cada um dos 20 NRF nos três estágios durante a rotina do processo de criopreservação do sêmen em leite desnatado e gema de ovo (SMEY). Branco, sêmen fresco congelado; linhas horizontais, sêmen diluído resfriado 5 °C; preto sêmen descongelado.



# RESULTADOS



**Fig. 3** - Histograma de EMA em sêmen descongelado; região A, MP do espermatozóide intacta, negativa com EMA; região B, MP do espermatozóide comprometida positiva com EMA.



**Tabela. 2** – Valores médios (SD) das variáveis da integridade do DNA do esperma e sobrevivência durante incubação *in vitro* de touros das raças NRF e Holandês em mSOF a uma temperatura de 38.5°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

HORAS DE INCUBAÇÃO					
	0	3	6	9	12
NRF SMEY					
% DFI	9.4	24.3	54.2	70.0	84.4
MÉDIA DFI	232.4	244.0	263.2	294.0	335.5
SD DFI	46.8	52.1	50.7	59.1	78.0
% VIVOS	51.5	38.8	31.9	26.6	16.0
NRF TRILADYL®					
% DFI	5.7	12.0	39.4	51.1	53.2
MÉDIA DFI	233.2	242.3	260.4	285.4	301.2
SD DFI	48.5	54.7	58.5	72.9	84.8
% VIVOS	44.8	33.0	31.9	29.9	19.8
H. TRILADYL®					
% DFI	5.1	21.2	51.7	57.1	61.2
MÉDIA DFI	232.3	245.0	275.9	304.4	330.4
SD DFI	39.1	46.8	62.0	81.2	102.3
% VIVOS	40.6	32.7	27.3	19.5	8.7

# CONCLUSÃO



- Lesão do DNA - Processo de CRIOPRESERVAÇÃO e INCUBAÇÃO *IN VITRO*;
- Alterações no sêmen NRF dependem do tipo de DILUENTE utilizado;
- Alteração do DNA durante incubação *in vitro* depende também da RAÇA do touro.



**OBRIGADO E BOA TARDE!**



[francibado@yahoo.com.br](mailto:francibado@yahoo.com.br)

[guintersdc@hotmail.com](mailto:guintersdc@hotmail.com)