



## ALTERAÇÕES NO COMPLEXO DNA-PROTEÍNA DO ESPERMATOZÓIDE DE ONÇA PINTADA APÓS CRIOPRESERVAÇÃO

Ronaldo Gonçalves Morato<sup>1,2,3</sup>, Alessandra Cunha Brandão<sup>4</sup>, Marina Galvão Bueno<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Associação Pró-Carnívoros, Av. Parada Pinto, 3420 12/74 São Paulo-SP, 02611-001 ([ronaldo@procarnivoros.org.br](mailto:ronaldo@procarnivoros.org.br)); <sup>2</sup>Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Guarulhos, SP, Brasil; <sup>3</sup> Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Bandeirantes; <sup>4</sup>Depto de Reprodução Animal - FMVZ-USP-SP, ([abrandao@usp.br](mailto:abrandao@usp.br))

As técnicas de reprodução assistida podem contribuir para a preservação da onça pintada através do desenvolvimento de um banco de material biológico, *in vitro*, contendo células somáticas, espermatozoides, óocitos e embriões. Os melhores protocolos para a criopreservação de amostras, incluindo sêmen, ainda estão por ser estabelecidos. A utilização de um único teste *in vitro*, não é capaz de prever o potencial fertilizante do sêmen descongelado. Além disso, a maioria dos testes *in vitro* são trabalhosos e caros tornando difícil a aplicação destes como rotina nas condições de campo. Alterações da estrutura do complexo DNA-Proteína do espermatozoide podem ser observadas como resultado da crioinjúria, afetando a interação oócito-espermatozoide. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi determinar a aplicabilidade de um método simples de coloração para a avaliação do complexo DNA-Proteína do espermatozoide de onça pintada após descongelação. Sêmen foi obtido de três machos, adultos de onça pintada por eletroejaculação e imediatamente avaliados quanto motilidade (0-100%), vigor (0-5) e morfologia. Para visualização de células com alterações no complexo DNA-Proteína, um esfregaço do sêmen foi fixado em ácido glacial acético e etanol (1:3/1 min.) e álcool 70% (3 min.), em seguida imerso em solução de HCl 4N (20 min.), corado com tampão de azul de toluidina e, imediatamente avaliado ao microscópio óptico (1000 células;1000x). O sêmen total foi diluído em meio Hepes (1:1) e centrifugado (300g/10 min.). O sobrenadante foi desprezado e o botão remanescente foi suspenso em meio contendo gema de ovo (20%) e lactose (11%), e levado para refrigeração por 1h. Após atingir a temperatura de equilíbrio (4°C) foi adicionado meio contendo gema de ovo (20%), lactose (11%) e glicerol (8%). O sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 ml e congelado sob vapor de nitrogênio. Entre 3 a 7 dias após a congelção, as amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C/2 min. e avaliadas como descrito anteriormente. O teste t pareado foi utilizado para verificar diferenças entre os valores antes e após congelção. A média  $\pm$  DP para motilidade ( $80.0 \pm 10.0$ ), vigor ( $4.0 \pm 0.5$ ) e morfologia normal ( $75.0 \pm 5.0$ ) do sêmen antes da congelção foram maiores ( $p < 0.05$ ) que os valores após a congelção ( $30.0 \pm 5.0$ ,  $2.0 \pm 0.5$  e  $50.0 \pm 6.0$ , respectivamente). Da mesma forma, as amostras avaliadas antes da congelção mostraram reduzido número ( $p < 0.05$ ) de espermatozoides com alterações no complexo DNA-Proteína ( $3.0 \pm 1.0\%$ ) quando comparados às amostras avaliadas após congelção ( $10.0\% \pm 1.0$ ). Sendo assim, podemos observar que há uma perda significativa da qualidade espermática após a congelção utilizando o protocolo descrito. Adicionalmente, a técnica de coloração do complexo DNA-Proteína mostrou-se um teste *in vitro* auxiliar na avaliação dos procedimentos de congelção, sendo este de fácil realização e de baixo custo, viabilizando seu uso rotineiro nas condições de campo. Estudos relativos a criopreservação de sêmen em onça pintada devem ser conduzidos, principalmente no sentido de obtermos melhores resultados após descongelção com métodos simplificados que possam ser facilmente aplicados a campo.

Apoio Financeiro: CESP, Associação Pró-Carnívoros