

“EFICIÊNCIA *IN VITRO* DE TRÊS DILUIDORES PARA A CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)”

OLIVEIRA, N.D. ¹; CAIRES, P.A. ¹; FERNANDES, F.C.F. ²; DIAS, J.C.O. ³

¹Discente do curso de Medicina Veterinária do IFNMG – *Campus* Salinas; ²Discente do mestrado profissionalizante de Medicina Veterinária do IFNMG – *Campus* Salinas; ³Docente do IFNMG – *Campus* Salinas.

Palavras chaves: Cunicultura, reprodução, inseminação artificial, diluidor.

Introdução

A técnica de criopreservação espermática, tem na sua aplicabilidade, a possibilidade de utilização por período relativamente longo (refrigeração) ou indeterminado (congelamento), reduz riscos e custos com aquisição e transporte de reprodutores, além de favorecer rápida difusão de material genético entre locais distantes (CASTELO; FROTA; SILVA, 2008).

Os diluentes atuais oferecem uma boa proteção à célula espermática, entretanto, com os últimos avanços nas biotécnicas de fecundação, tornou-se possível inferir a baixa fertilidade do sêmen congelado, fundamentalmente à composição dos diluentes, que podem favorecer modificações na distribuição e nas características dos componentes da membrana que cobrem o espermatozoide, resultando na sua desestabilização.

O coelho é um animal valioso tanto para a economia quanto para as ciências biomédicas. Portanto, a preservação de muitas linhagens de coelhos é de vital importância. Até agora, a criopreservação do sêmen é uma das maneiras mais eficientes de preservar cepas de coelhos, porque é fácil coletar repetidamente o ejaculado de um único macho e realizar inseminação artificial em várias fêmeas (NISHIJIMA *et al.*, 2021).

A criopreservação do sêmen de coelho é possível, mas deve-se dedicar muita atenção e cuidado a esta biotecnologia reprodutiva para a obtenção de taxas de concepção adequadas (MORRELL, 1995). Os diluentes e protocolos ainda não estão bem estabelecidos na cunicultura, como nas demais espécies domésticas, que por sua vez já possuem protocolos específicos, com produtos no mercado aprovados.

Nesse sentido, objetivou-se identificar, baseado nos parâmetros de motilidade e vigor, um diluente comercial para refrigeração do sêmen de coelhos acessível comercialmente ao técnico de campo e determinar o período (horas) de viabilidade máxima do sêmen para IA.

Material e métodos /Metodologia

Foram selecionados quatro machos reprodutores mestiços, clinicamente sadios, de nove a quatorze meses de idade, e com fertilidade comprovada por monta natural, e submetidos ao exame andrológico, conforme preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Os animais foram alocados no Setor de Cunicultura do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais – *Campus* Salinas.

Os reprodutores permaneceram sob condições de iluminação natural, confinados em gaiolas individuais, recebendo durante todo o período experimental água e uma alimentação volumosa composta de rami *in natura*, e ração para coelhos peletizada, de forma a atender às exigências

nutricionais da categoria. Foram realizadas dez colheitas de sêmen de cada animal com intervalo de dois dias, sempre pelo período da manhã, com vagina artificial, modelo descrito por Andrade et al. (2002), com o auxílio de um manequim vivo.

Após a colheita do sêmen, foi realizada a avaliação do volume, aspecto e cor do material. Os ejaculados coletados de cada coelho foram misturados em tubo de coleta tipo Falcon de 15 mL obtendo um pool de sêmen. O pool heterospérmico era encaminhado imediatamente ao Laboratório de Fisiologia e Reprodução do IFNMG-Campus Salinas para avaliação microscópica (motilidade, vigor e concentração) do sêmen acumulado. Em seguida, diluiu-se em uma concentração de 20 milhões de espermatozoides/mL em microtubos tipo Eppendorf de 1,5 mL e imergia-os em banho-maria (NT235® - NOVA TÉCNICA) a 37°C, contendo os seguintes diluidores (Tratamentos - T):

- Diluidor 1 (T1): Beltsville Thawing Solution - BTS® (diluyente comercial de suíno);
- Diluidor 2 (T2): BotuDog® (diluyente comercial de cachorro);
- Diluidor 3 (T3): BotuSemen® (diluyente comercial de equino);

As amostras seminais divididas nos tratamentos em microtubos tipo Eppendorf foram direcionadas ao interior de uma geladeira, permanecendo na posição vertical à temperatura de 5°C, por até 48 horas. Nos intervalos de zero, dezesseis, vinte e quatro, e quarenta e oito horas, as amostras passaram por avaliação quanto a motilidade e vigor, conforme realizado no sêmen fresco.

Os dados foram analisados por análise de variância (GLM Procedure, SAS University), e a comparação das médias realizada pelos Wilcoxon (Motilidade) ou pelo teste de Dunn (Vigor) com o nível de significância 5%.

Todos os procedimentos de manuseio foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais do Instituto Federal do Norte de Minas Gerais (processo nº001/2021) e foram realizados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e com a legislação vigente.

Resultados e discussão

A média dos valores de motilidade total e vigor espermático do sêmen fresco (pool heterospérmico) dos coelhos foi de 86,0% e 3,05, respectivamente. Após o início do resfriamento à 5°C, houve um comportamento linear decrescente para a motilidade espermática progressiva e vigor espermático do sêmen refrigerado em função do tempo, deferindo significamente ($P < 0,05$) entre os tratamentos, em todos os tempos analisados (Tabela 1). Destaca-se que o sêmen diluído em BTS (T1) apresentou a redução, na manutenção dos parâmetros avaliados de forma mais pronunciada ($P < 0,05$).

Quanto a motilidade progressiva, os valores encontrados em T2 e T3 foram superiores aos citados por Andrade et al. (2008), que compararam vários meios de diluição no sêmen de coelho: solução de ringer de lactato, citrato-gema de ovo e leite desnatado. Em seu estudo, eles encontraram valores de $64,5 \pm 8,7$ (ringer de lactato), $67,0 \pm 5,3$ (citrato-gema) e $65,9 \pm 5,3\%$ (leite desnatado) no início da incubação (0 min), e aos 120 minutos de incubação, encontraram valores de $50,3 \pm 16,9$ (ringer lactato), $57,5 \pm 14,0$ (citrato-gema) e $55,8 \pm 8,0\%$ (leite desnatado).

Analogamente, Romero et al. (2020) também encontraram valores inferiores ao avaliarem a qualidade seminal de coelhos alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de linhaça (*Linum usitatissimum*). Os ejaculados com vigor 3 e com 70% de motilidade foram submetidos ao processo de resfriamento, em meio de Tris-gema de ovo modificado. Eles encontraram valores de motilidade espermática progressiva de $63,80 \pm 1,60$ (0 h), $46,20 \pm 2,33$ (2 h), $30,40 \pm 1,47$ (12 h), $17,60 \pm 1,47$ (24 h), $11,60 \pm 0,83$ (48 h), e $5,18 \pm 2,54\%$ (72 h) e de vigor espermático de $2,20 \pm 0,08$ (0 h), $1,54 \pm 0,11$ (2 h), $1,15 \pm 0,07$ (12 h), $0,55 \pm 0,08$ (24 h), $0,22 \pm 0,05$ (48 h), e $0,06 \pm 0,05$ (72 h).

No manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013) não são apresentados os valores ideais de motilidade para coelhos após o processo de refrigeração. No entanto, se considerarmos as espécies canina, equina e suína (animais monogástricos como os coelhos) o CBRA recomenda que a motilidade progressiva e vigor espermáticos do sêmen refrigerado, nessas espécies, sejam $\geq 50\%$ e ≥ 3 , respectivamente. Se

comparado, os tratamentos 2 e 3, em todos os tempos, chegaram às 48 horas pós-resfriamento com motilidade progressiva acima do esperado para estas espécies (Tabela 1). Porém, em relação ao vigor espermático, após os períodos de resfriamento, nenhum tratamento apresentou valor ideal para as espécies monogástricas, sendo os tratamentos 2 e 3 aqueles que apresentaram os resultados mais próximos dos desejados.

Conclusão(ões)/Considerações finais

Dentro das condições de realização deste experimento, é possível concluir que os diluidores BotuDog® e BotuSemen® permitiram a melhor conservação do sêmen de coelho resfriado à 5 °C, por até 48 horas. De posse dessa análise, é possível utilizar mais amplamente essa biotecnologia reprodutiva, que traz enormes benefícios para a cunicultura nacional, como já aconteceu com outras espécies domésticas.

Referências

- ANDRADE et al. Eficiência in vitro de três diluidores para sêmen de coelho. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 45, 2008.
- CASTELO, T.S.; FROTA, T.R.; SILVA, A.R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, n.3, p.67-75, 2008.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3ed., Belo Horizonte: CBRA, 2013. 49p.
- MORRELL, J. M. Inseminação artificial em coelhos. **British Veterinary Journal**, v.151, n.5, p.477-488, 1995.
- NISHIJIMA, K. et al. Strategies for Highly Efficient Rabbit Sperm Cryopreservation. **Animals**, v. 11, n. 5, p. 1220, 2021.
- ROMERO, D. C. M. et al. Evaluation of the seminal quality of rabbits fed diets containing different inclusion levels of flaxseed (*Linum usitatissimum*). **Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, 2020.

ANEXO I

Tabela 1 - Motilidade progressiva (média ± epm) e vigor espermático (mediana ± primeiro e terceiro quartis) do sêmen de coelhos após 16, 24 e 48 hs de resfriamento, à 5 °C.

Tratamentos	16 hs de resfriamento		24 hs de resfriamento		48 hs de resfriamento	
	Motilidade	Vigor	Motilidade	Vigor	Motilidade	Vigor
BTS®	20,6 ± 7,28 ^A	0,75 (0,375 - 1,5) ^A	12,0 ± 6,80 ^A	0 (0 - 1,0) ^A	3,0 ± 2,13 ^A	0 (0 - 0,125) ^A
BOTUDOG®	80,0 ± 1,97 ^B	2,75 (2,5-3,0) ^{BC}	72,5 ± 2,01 ^B	2,75 (2,375-3,0) ^{BC}	71,0 ± 2,08 ^B	2,5 (2,0 - 3,0) ^{BC}
BOTUSÊMEN®	67,5 ± 1,86 ^C	2,5 (2,5-3,0) ^{BC}	64,0 ± 3,64 ^C	2,5 (2,375-3,0) ^{BC}	55,5 ± 4,25 ^C	2,5 (2,0 - 2,625) ^{BC}

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de Wilcoxon (Motilidade) ou pelo teste de Dunn (Vigor).