

Avaliação do efeito do meio diluente nas características estruturais e fisiológicas do espermatozóide com a sua fertilidade in vivo e in vitro

Lourrany Eduardo Souza¹ (IC), Raiany Paula¹ (PG), Beatriz Barbosa Coutinho¹ (IC), Klayto José Gonçalves dos Santos¹ (PQ), Aracele Pinheiro Pales dos Santos¹ (PQ)

1 Universidade Estadual de Goiás, Câmpus São Luís de Montes Belos/GO, Email: lourrany0401@gmail.com

Resumo: Esse trabalho teve como objetivo avaliar e correlacionar através de análises in vitro características fisiológicas e estruturais dos espermatozoides frescos e criopreservados em diferentes meios diluentes. Foram feitas coletas de sêmen de oito touros da raça Holandesa (*Bos tauros tauros*) através do eletroejaculador, após as coletas o material foi dividido em duas frações, sendo que a primeira fração foi utilizado fresco para avaliação da cinética espermática a outra fração foi diluída com os diluentes TRIS-gema e Botu-Bov Egg Free® e em seguida refrigerados a 4 °C por 90 minutos para testar a viabilidade dos diluentes em comparação ao sêmen a fresco. O sêmen fresco apresentou melhor viabilidade em comparação ao sêmen congelado, e o TRIS-gema apresentou melhor viabilidade em comparação ao Buto-Bov na diluição a fresco quanto na congelagem.

Palavras-chave: Criopreservação; Reprodução; Sêmen; Viabilidade;

Introdução

O desenvolvimento de biotecnologias da reprodução pode contribuir enormemente com os programas de melhoramento animal (Franco e Melo, 2006). Dentre estas, a IA é de grande importância na agroindústria por ser de mais fácil acesso à maioria dos produtores, tendo como principal objetivo reproduzir uma genética mais valiosa, além de melhorar o desempenho reprodutivo do rebanho, diminuindo o intervalo entre partos (IEP). Nota-se então, a importância da difusão desta e de outras biotecnologias reprodutivas para a região, visto que o emprego da IA com sêmen de touros provados geneticamente tem o objetivo de melhorar a eficiência reprodutiva, com conseqüente aumento na produção de bezerros de qualidade e na rentabilidade da propriedade.

O aperfeiçoamento de análises espermáticas como uma ferramenta para prever a fertilidade de reprodutores e assim poder aumentar a eficiência da IA e da produção in vitro de embriões, poderiam comprovar os resultados da literatura, ainda controversos, onde normalmente avaliam a motilidade espermática associada à fertilidade. Os testes de inseminação artificial (IA) ou fertilização in vitro (FIV)

representam as técnicas de maior sensibilidade para o acesso ao potencial de fertilização das amostras seminais (Crespilho et al., 2009), pois permitem a avaliação simultânea dos requisitos mais importantes da célula espermática para o processo de fertilização (Rodriguez-Martinez, 2005).

Além disto, há uma grande variação na fertilidade entre touros, o que poderia estar relacionado com a qualidade dos espermatozoides pós congelamento de cada animal. Segundo alguns autores (Farrel et al., 1996; Hallap et al., 2004; Cox et al., 2006) a associação de múltiplas variáveis de movimento e de características espermáticas mostram maior correlação com fertilidade in vivo em relação à utilização de apenas uma característica avaliada. Entretanto, alguns trabalhos não identificaram qualquer característica da fertilidade in vivo com diferentes avaliações espermáticas (Rodriguez-Martinez, 2003). Portanto, a existência desta correlação ainda é controversa, sendo necessários mais estudos para confirmar esta hipótese. Desta forma, a associação de vários testes espermáticos com diferentes técnicas de avaliação poderia fornecer uma maior confiabilidade entre a correlação da fertilidade in vivo do sêmen com diferentes parâmetros espermáticos.

Este trabalho teve como objetivo avaliar e correlacionar através de análises in vitro características fisiológicas e estruturais dos espermatozoides frescos e criopreservados em diferentes meios diluentes.

Material e Métodos

O estudo está sendo realizado no laboratório da Universidade Estadual de Goiás (UEG-UnU de São Luís de Montes Belos) e em propriedades localizadas no município. Serão utilizados oito touros da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*) sexualmente maduros. Os ejaculados de cada touro foi coletado utilizando ele por eletroejaculação, utilizando apenas os ejaculados com motilidade >70% e anormalidades morfológicas <30%. Após a coleta, cada ejaculado foi dividido em duas frações. Uma fração, a fresco, utilizada para avaliação da cinética espermática. A outra fração foi congelada, sendo diluída 1:1 com a fração I (sem glicerol) dos diluentes TRIS-gema e Botu-Bov Egg Free® (constituído de lecitina de soja), sendo refrigeradas à 4 °C por 90 min. Para avaliar as diferenças entre os meios diluentes foi acrescidas nas amostras 50% do volume com as respectivas frações II dos diluentes (com 13% de glicerol) padronizando a concentração final em 30×10^6 espermatozóides viáveis (adotando a motilidade espermática como critério), envasadas em palhetas de 0,5mL devidamente identificados os grupos e lacradas

com álcool polivinílico. Posteriormente congeladas em máquina de congelação TK 4000 compacta (TK, Uberaba, MG, Brasil). Ao final do programa de congelação, todas as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido. Parte do ejaculado que foi congelado, será descongelado posteriormente para produção de embriões in vitro, outra parte será avaliada quanto a cinética espermática pelo CASA, integridade das membranas espermáticas, capacitação e potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo, teste de termo-resistência (TTR) e taxa de prenhez na IA.

Resultados e Discussão

Os resultados referentes às análises gelamento em comum para o Experimento estão mostrados na TABELA 1. Houve perda da motilidade progressiva (MP) verificada imediatamente após a colheita e após congelação ($P < 0,05$) Para os experimentos a adição do meio diluente utilizado após centrifugação resultou em perda da MP, diferindo entre os tratamentos ($P < 0,05$). O vigor não foi alterado nos tratamentos utilizando os meios diluentes após congelação, mas sim comparado o sêmen fresco com congelado ($P < 0,05$). Verificou-se queda acentuada no percentual de células reativas ao teste hiposmótico (HO) entre as amostras avaliadas imediatamente após a colheita ou refrigeração passiva. A redução do pH foi acentuada entre os tratamentos, tanto nas amostras processadas imediatamente após a colheita quanto aquelas congeladas ($P < 0,05$).

TABELA 1 – Resultados das análises do sêmen utilizando TRIS GEMA e BUTO-BOV

| | TTM | Mot (%) | Vigor | Vivo s (%) | HO (%) | pH |
|-----------------|-----|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|------------------------|
| Sêmen Fresco | | 70,7 ± 5,9^a | 4 ± 0,5^a | 76,5 ± 7,8^a | 60,0 ± 14,0^a | 6,8 ± 0,4 |
| | 1 | 66,0 ± 5,5 ^A | 4 ± 0,5 ^A | | | 6,6 ± 0,5 ^A |
| | 2 | 66,7 ± 5,8 ^A | 4 ± 0,5 ^A | | | 6,0 ± 0,0 ^B |
| | 3 | 50,0 ± 8,2 ^B | 3 ± 0,5 ^B | | | 5,5 ± 0,5 ^B |
| Sêmen congelado | | 51,8 ± 4,0^b | 3 ± 0,5^a | 76,6 ± 8,1^a | 49,12 ± 12,2^b | 6,6 ± 0,5 |
| | 1 | 53,3 ± 11,5 ¹ | 3 ± 0,6 ^a | | | 6,6 ± 0,5 ¹ |
| | 2 | 50,0 ± 17,3 ¹ | 3 ± 0,6 ^{ab} | | | 6,0 ± 0,0 ² |
| | 3 | 40,0 ± 10,0 ¹² | 3 ± 0,0 ^{ab} | | | 5,5 ± 0,5 ³ |

Letras minúsculas, maiúsculas e números diferentes na mesma coluna indicam diferenças ($P < 0,05$).

TTM= Tratamento 1 (controle), 2 (TRIS GEMA), 3 (BUTO BOV)

Diferentes protocolos de congelamento têm sido utilizados para criopreservar espermatozoides. No entanto, como existe uma variação nos diluentes e nos

procedimentos utilizados em cada protocolo, a comparação direta dos resultados não é adequada.

A utilização do sêmen congelado tem como fatores limitantes o alto custo com equipamentos, necessidade de mão-de-obra especializada, bem como locais apropriados nos haras para manipulação do sêmen (CROCKETT et al., 2001), tendo como maior desvantagem em comparação ao sêmen fresco ou refrigerado a redução na viabilidade espermática (MOORE et al., 2005).

Durante o procedimento de congelamento de sêmen dois importantes processos acontecem, o primeiro é a produção de espécies reativas de oxigênio (BAUMBER et al., 2003; 2005) que induzem mudanças na função e estrutura da membrana (GADEA et al.; 2005).

Considerações Finais

Diante do presente estudo, conclui-se que:

O sêmen fresco apresenta melhor viabilidade que o sêmen congelado

O TRIS GEMA apresentou melhor viabilidade que o Buto-Bov na diluição a fresco quanto na congelação de sêmen.

Agradecimentos

Agradecimento a bolsa de iniciação científica PIBIC/UEG

Referências

BAUMBER, J.; BALL, A.B.; LINFOR, J.J.; MEYERS, S.A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.24, p.621-628, 2003.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. **American Journal of Veterinary Research**, v.66, p.772-779, 2005

Crespilho AM, Papa FO, Martins Junior A, Dell'Aqua Junior JA. Evaluation of frozen bovine semen: How do semen collection and processing centers evaluate the quality of commercialized samples? **Vet Zootec**, 16: 335-342, 2009.

CROCKETT, E.C.; GRAHAM, J.K.; BRUEMMER J.E.; SQUIRES, E.L. Effect of cooling of equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: Preliminary results. **Theriogenology**, v.55, p.793-803, 2001.

Farrel PB, Foote RN, Mcardle MM, Trouern-Trend VL, Tardif AL. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). *J Androl*, 17: 293-300, 1996.

Franco MM, Melo EO. Melhoramento animal: o uso de marcadores moleculares e da reprodução assistida. Documentos Embrapa, v. 188, 2006.

Hallap T, Haard M, Jaakma U, Larsson B, Rodriguez-Martinez H. Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? **Theriogenology**, 62: 702-713, 2004.

MOORE, A.I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 63, p. 2372-2381, 2005.

Rodriguez-Martinez H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reprod Domest Anim**, 38: 312-318, 2003.