



## **Avaliação de sêmen bovino em diferentes meios de criopreservação** **PAULA, C. S. FERREIRA <sup>1</sup>(IC)\*; KLAYTO, J. G. SANTOS <sup>2</sup>(PQ); JAQUELINE, F. D. SANTOS<sup>3</sup>;** **ESTHER, B. MACIEL<sup>4</sup>(IC)**

Universidade Estadual de Goiás, Câmpus São Luís de Montes Belos..

A criopreservação de sêmen bovino se tornou uma técnica recorrente para sua utilização em biotecnologias reprodutivas, de forma que o congelamento é uma das etapas para garantir a viabilidade e fertilidade do sêmen pós descongelamento, necessitando de um crioprotetor para alcançar esses objetivos, de forma que o crioprotetor deverá garantir proteção contra os choques térmicos e osmóticos que ocorrem durante o processo de congelamento e descongelamento. A qualidade espermática do sêmen bovino criopreservado com dois diluentes diferentes no pós descongelamento em 38° por 90 minutos pode ocorrer de forma distinta. O sêmen foi avaliado em dois meios de criopreservação, sendo eles lecitina de soja (Tolera-D) e gema de ovo (Botubov), e submetidos ao teste de termoresistência modificada, nas avaliações quanto as características que influencia na fertilidade o sêmen que possuiu o crioprotetor de origem animal apresentou bom desempenho, os resultados relacionados a cinética espermática como motilidade total e progressiva foi melhor, já o sêmen com lecitina nas características de trajeto, movimento linear, curvilíneo, largura da cabeça, amplitude de deslocamento lateral da cabeça, frequência de batimentos e linearidade foi melhor.

Palavras-chave: Termoresistência. Intermediário. Lecitina. Gema de ovo. Motilidade. Congelamento.

### **Introdução**

O sêmen bovino é um dos principais produtos a ser comercializado na utilização de biotecnologias reprodutivas como a Inseminação Artificial (IA) e Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), sendo submetido a um longo processo que consiste da coleta, preparo, avaliações, congelamento até ser descongelado para ser utilizado (ASBIA,2017).

Nesse longo processo cujo o qual o sêmen é submetido todas as fases são fundamentais, deve ser feita as avaliações de qualidade para estimar a fertilidade antes do congelamento, sendo que a fase com maior risco se encontra nos processos de resfriamento, congelamento e descongelamento, podendo prejudicar a integridade da célula espermática, afetando a viabilidade espermática, motilidade e sobrevivência (LEITE et al., 2011).

Desta forma para garantir o sucesso da criopreservação do sêmen com o



congelamento, é necessário que o diluente do crioprotetor utilizado garanta proteção contra os choques térmicos e osmóticos que ocorrem durante o processo de congelamento e descongelamento. Sendo que o estudo dos diluidores pode ser uma alternativa para garantir a melhoria efetiva nos índices de congelabilidade dos ejaculados para saber qual o meio diluidor que apresenta melhores resultados pós criopreservação, garantindo maior fertilidade do sêmen depois de processado e evitando desperdícios (WATSON, 2000).

Os diluentes alternativos como os de origem vegetal (extrato de soja) e animal (gema de ovo) podem ser uma alternativa viável para melhorar a fertilidade após o descongelamento.

O objetivo deste experimento foi comparar a ação de dois meios diluidores submetendo o sêmen ao teste de termoresistência modificada, e após analisadas no aparelho (CASA – *Computer Assisted Semen Analyses*) (AMANN; KATZ, 2014).

## Material e Métodos

O experimento foi efetuado na Universidade Estadual de Goiás, no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal. Foi efetuada a coleta de sêmen com auxílio de um eletroejaculador, para o experimento foram utilizados 21 mL de sêmen.

O sêmen coletado foi analisado com um microscópio, utilizando uma parcela representativa, com o intuito de através de uma análise subjetiva determinar a viabilidade do congelamento, apresentando 85 % de motilidade, 5 de turbilhonamento e 4 de vigor.

Sendo efetuado também o cálculo da concentração espermática, os 21 ml de sêmen foram divididos em duas partes, na proporção 1:1 utilizando desta forma 10,5 ml de sêmen e 10,5 ml do diluente gema de ovo, o mesmo com o restante mas utilizando a lecitina de soja.

O sêmen após diluído foi acondicionado no refrigerador por um período de duas horas à 5°C, durante o período que o sêmen ficou no processo de arrefecimento foi feito a concentração espermática, utilizando microscopia óptica



convencional com a câmara hematocitométrica de Neubauer resultando em um média de 14 células por quadrante, sendo fixada em 500.000000 espermatozoides/ml.

Ambos os sêmens que foram separados e diluídos na proporção 1:1 com o diluidor foram divididos em quatro frações com concentrações diferentes, sendo: O 1º utilizou 5 ml de sêmen com 4,5 ml de diluidor a base de gema de ovo ou lecitina de soja ( T1-Tratamento 1) e assim com os demais só modificando o volume de sêmen e diluidor, o 2º 4ml de sêmen + 2,38 ml (T2- Tratamento 2), 3º 5ml+ 1,10 ml (T3- Tratamento 3) e a 4º 5 ml+ 0,2 ml (T4- Tratamento 4).

O sêmen foi envasado em palhetas francesas de 0,5 ml, o envase ocorreu ainda na máquina de refrigeração (WORKSEMEN- TK). Enquanto o sêmen estava sendo envasado a máquina de congelamento estava fazendo o processo de estabilização da temperatura com o nitrogênio para evitar o choque térmico após a retirada da refrigeração.

A curva de estabilização permite o sêmen atingir temperaturas superiores de forma gradual, após a estabilização as amostras foram colocadas em uma caixa auxiliar de isopor por 10 minutos, promovendo o congelamento total e uniforme da palheta e para facilitar o raqueamento. Após o congelamento as raques foram colocadas nas “canecas” no botijão criobiológico, para armazenar o sêmen em nitrogênio.

As palhetas eram retiradas do nitrogênio e submetidas ao banho maria por 90 minutos o que consiste no teste de termoresistência modificado, mantendo a amostra em uma temperatura constante de 38°C. Após o descongelamento no teste de termoresistência modificado, as amostras foram retiradas gradativamente de acordo com o tratamento, iniciando do menor para o maior, o conteúdo de cada palheta era transferido para eppendorfs e com o auxílio de uma pipetadora digital uma pequena parte do tratamento ia ser avaliado no CASA.

O aparelho utilizado para avaliar o sêmen foi o CASA (*Computer Assisted Semen Analyses*), que permite uma avaliação objetiva do sêmen, permitindo prever a viabilidade e fertilidade do sêmen criopreservado.



As análises efetuadas avaliaram o sêmen quanto motilidade total (MT %) ou seja a movimentação dos espermatozoides, a motilidade progressiva (MP%) que corresponde aos movimentos progressivos das células, além da movimentação foram analisadas característica que correspondem ao sentido do trajeto e velocidade.

A velocidade de trajeto (VAP  $\mu\text{m/s}$ ) é a velocidade média ininterrupta do espermatozoide, a velocidade progressiva (VSL  $\mu\text{m/s}$ ) corresponde a velocidade em sentido linear entre pontos distintos percorridos pelo espermatozoide.

A velocidade curvilinear (VCL  $\mu\text{m/s}$ ) é a velocidade média mensurada de ponto a ponto do trajeto, a amplitude do deslocamento lateral de cabeças (AHL  $\mu\text{m}$ ) é a largura média mensurada das oscilações da cabeça do espermatozoide, a frequência de batimentos (BCF, Hz) e a constância que a cabeça do espermatozoide se move para frente e para trás em um trajeto. E por fim a linearidade (LIN %) que é o valor médio entre as características de VSL/ VCL x 100.

As avaliações em sistema computadorizado diminuem as chances de erro nas avaliações, permitindo identificar qual meio diluidor apresenta maior ou melhor desempenho, de forma que com informações sobre a cinética espermática permite traçar uma conclusão sobre as observações (GIL et al., 2000).

## Resultados e Discussão

No que se refere a qualidade espermática pós teste de termoresistência modificado, nas características de motilidade total dos tratamentos e motilidade progressiva o sêmen com a presença de diluidor a base de gema de ovo apresentou-se melhor, como demonstrado na tabela 1.

Nas demais características observadas o sêmen diluído com o diluidor a base de extrato de soja se apresentou melhor em todas as outras características. Alguns experimentos já testaram e compararam a cinética espermática após descongelamento e fertilidade do sêmen utilizado em bovinos.

Segundo Hinsch et al., (1997) o sêmen diluído em gema de ovo ou extrato de soja não apresentava diferença significativa para características como motilidade, vigor, e movimentos, e quando analisaram as taxa de prenhez não apresentava



diferença em nenhum dos casos, não influenciando na repetição de cio após com 60 e 90 dias, evidenciando que ambos os têm potencial para criopreservação.

Em experimento semelhante Gil et al., (2000) observou que mesmo alterando a composição do diluente (gema de ovo ou lecitina de soja) os resultados na fertilidade do sêmen não se diferenciavam significativamente, os sêmens com solução a base de gema de ovo apresentavam fertilidade de 69,1% e o a base de lecitina de soja 69,2%. Ressaltando que ambos têm viabilidade para utilização em condições adequadas de preparo, mas em condições desfavoráveis pode ocorrer dos desempenhos serem distintos.

Já Dell' Aqua Júnior et al., (2007) em experimento comparando as duas soluções como meio de diluição o meio livre de produtos de origem animal apresentou melhores resultados nos parâmetros de motilidade progressiva (gema de ovo 45%, lecitina 65%). Celeghini et al., (2008) em análises computadorizadas encontrou resultados distintos, as amostras que apresentavam meio diluidor a base de gema de ovo para todas as características, principalmente nas que dizem respeito à integridade celular, se sobressaiu, permitindo a célula manter suas funções mesmo após condições extremas, devido a capacidade de proteger a membrana plasmática mantendo a intacta.

**Tabela 1. Valores médios da cinética espermática avaliadas em concentrações diferentes.**

Característica	Gema	Lecitina	Média Geral
	MÉDIA	MÉDIA	
MT (%)	7 ± 3	2 ± 1	4 ± 4
MP (%)	2 ± 1	0 ± 1	1 ± 1
VAP (µm/s)	45 ± 3	61 ± 21	53 ± 11
VSL (µm/s)	37 ± 3	48 ± 23	42 ± 8
VCL (µm/s)	77 ± 7	100 ± 12	89 ± 17
ALH (µm)	5 ± 0	26 ± 40	16 ± 15
BCF (Hz)	20 ± 4	21 ± 5	20 ± 1



LIN (%)

49 ± 5

48 ± 17

48 ± 1

MOT: Motilidade Total; MP: Motilidade Progressiva; VAP: Velocidade de Trajeto; VSL: Velocidade Progressiva; VCL: Velocidade Curvilínea; ALH: Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça Espermática; BCF: Frequência de Batimentos; LIN: Linearidade.

## Considerações Finais

Os resultados encontrados podem ter sofrido influência do meio onde estão acondicionados, já que ambos os diluidores apresentavam a capacidade de fertilidade antes e após o processo mesmo que reduzida consideravelmente, ressaltando a capacidade dos crioprotetores de fazerem a preservação da integridade física do espermatozoide.

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao professor Klayto pela oportunidade de ser bolsista e efetuar o experimento no Centro de Biotecnologia Animal, contribuindo assim para o meu progresso pessoal e profissional, bem como o apoio de toda equipe responsável pelo funcionamento do laboratório.

## Referências

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL - ASBIA. Index ASBIA Qualidade do sêmen 2017. Disponível em <<http://www.asbia.org.br/novo/informacoes/semem>> Acesso em 20 out. 2017.

AMANN, R, KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. J Androl, n. 25, p.317-325, 2004.

CELEGRINI, E.C.C.; ARRUDA, R. P; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; ROFRIGUES, P.H.M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. Animal Reproduction Science, v.104, p 119-131,2008.

REALIZAÇÃO



DEEL´AQUA JR, J.A.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A.; MELO, C. M.; CRESPILO, A.; SIQUEIRA FILHO, E.R.; ALBERTI, K.; DE VITA, B.; BARCELOS, G.; MEDEIROS, A. S. L. Nova proposta de diluidor para sêmen bovino quimicamente definido. Acta Scientiae Veterinariae, Porto Alegre, 2007.

GIL, J., JANUSKAUSKAS, A., HAARD, M. C. H. et al. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biciphos-Plus® and Triladyl®. Reproduction in Domestic Animals, v.35, n.2, p.69-77, 2000.

HINSCH, E.; HINSCH, K. D.; BOEHM, J. G.; SCHILL, W. B.; MUELLER, S. F.; Functional parameters and fertilization success of bovine semen cryopreserved in egg-yolk free and egg-yolk containing extenders. Reproduction of Domestic Animals, 1997.

LEITE, P. A, SCHREDER, G. G, ALMEIDA, L. R, ZÚCCARI, C. E. S. N, SILVA, E. V. C. Criopreservação do Sêmen Bovino. UNOPAR. Cient Ciência Biol Saúde, 2011.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reproduction Science, v. 60, p. 481-492, 2000.