



## **EFEITO DA CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA NA MOTILIDADE APÓS CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE TOUROS DO APL LÁCTEO DO OESTE GOIANO.**

Autores: Jaqueline Ferreira Daniel Santos - Universidade Estadual de Goiás; Klayto José Gonçalves dos Santos – Universidade Estadual de Goiás - [klayto.santos@ueg.br](mailto:klayto.santos@ueg.br); Ana Carla Cavalcante-BIOTEC/Universidade Estadual do Goiás- [anacarlacavalcante5@gmail.com](mailto:anacarlacavalcante5@gmail.com)

Tipo de Artigo: científico; Tema: Outros temas

**RESUMO:** Dentre as tecnologias utilizadas na bovinocultura com o objetivo de melhorar os animais geneticamente, a maioria delas depende da utilização de sêmen criopreservado, e sua qualidade influencia diretamente na fertilidade do touro, o objetivo do presente experimento foi avaliar a qualidade do sêmen bovino criopreservado em diferentes concentrações espermáticas. O experimento foi realizado no BIOTEC localizado na Fazenda Escola da UEG Câmpus São Luís de Montes Belos - GO. Foram utilizados touros, com idade entre 24 e 36 meses. Foram realizadas duas coletas de sêmen de cada touro, por eletroejaculação, com intervalos de 20 dias. Foram criopreservadas 500 doses de sêmen em palhetas de 0,5 mL, nas concentrações espermáticas:  $10 \times 10^6$ ,  $20 \times 10^6$ ,  $30 \times 10^6$ ,  $40 \times 10^6$  e  $50 \times 10^6$ . Foram realizadas as avaliações de motilidade e vigor, TTR/R, TTR/L, CASA e morfologia espermática. O modelo experimental foi o DIC, foram realizados os testes Tukey e de correlação pelo programa estatístico SISVAR a  $p < 0,05$ . Dentre as concentrações espermáticas avaliadas a de  $30 \times 10^6$  e  $40 \times 10^6$  de espermatozoides por palheta foram as que apresentaram melhor qualidade espermática.

**Palavras-chave:** Dose inseminante. Espermatozoides. Viabilidade.

## 1. INTRODUÇÃO

O processo de criopreservação do sêmen bovino é um dos fatores que afetam adversamente a motilidade dos espermatozoides (ABUD et al., 2014; DUARTE JÚNIOR et al., 2015), o que, conseqüentemente, afeta sua fertilidade (MORRIS et al., 2012; KAKA et al., 2015; MARINHO et al., 2016), comprometendo a eficiência reprodutiva do touro e a rentabilidade produção pecuária (COJKIC et al., 2017).

As taxas de sobrevivência espermática pós-criopreservação são baixas para a maioria das espécies (MADEIRA et al., 2013). Nos bovinos, cerca da metade de todos os espermatozoides são danificados ou mortos no processo de congelamento, o que reduz a eficácia da preservação de sêmen (LEITE et al., 2011; CAMPANHOLI et al., 2013; SILVA et al., 2013).

A fertilidade é a condição essencial para o progresso genético e alta produtividade animal, podendo ser alterada por condições que afetem a libido ou a cópula e/ou habilidade dos espermatozoides fecundarem o ovócito (WEISS et al., 2015).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Os espermatozoides são células alongadas, recobertos pela membrana plasmática e são constituídos de uma cabeça que contém o núcleo e de uma cauda (flagelo) para motilidade celular. Eles desempenham um papel fundamental na fecundação devido ao DNA contido em seu núcleo (GARCIA e FERNÁNDEZ, 2001).

Segundo GARNER e HAFEZ (2004) o sêmen é definido como a suspensão celular líquida que contém os espermatozoides e as secreções dos órgãos acessórios do trato genital masculino, formando no momento da ejaculação o plasma seminal. Os componentes, volume do ejaculado, concentração espermática variam entre as espécies.

O sêmen liberado na ejaculação do touro é constituído por 10% de espermatozoides e líquido do canal deferente, cerca de 60% de líquido das vesículas seminais, 30% de líquido próstático e uma pequena quantidade de líquido das glândulas bulbouretais (GUYTON e HALL, 2002).

O material pode ser coletado por diferentes métodos levando em consideração o bem estar dos animais, um bom manejo e pessoas bem preparadas. Esses métodos utilizados são a eletroejaculação, a vagina artificial e a massagem das ampolas dos ductos deferentes (CARVALHO, 2014).

A criopreservação de gametas traz inúmeras vantagens para a produção e reprodução de diversas espécies animais, por isso vários métodos são empregados para avaliar a conservação seminal entre elas a motilidade, as morfopatologias, a morfometria e a fertilização (ARAÚJO, 2010).

A célula espermática durante o processo de criopreservação é submetida a estresse mecânico, químico, osmótico e térmico entre 5°C e -158°C (FUJITA et al., 2013); gerando danos à membrana celular pela desestabilização da bicamada lipídica, que ocorre à medida que a temperatura diminuí e a membrana sofre uma transição de fase, passando da fase fluída para a fase de gel (BOSCARATO et al., 2016).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no BIOTEC - Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal localizado na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Goiás Câmpus São Luís de Montes Belos. Foram utilizados três touros, com idade entre 24 e 36 meses, de valor genético comprovado, com atestado positivo do exame andrológico, em plena atividade sexual e após verificação da sanidade animal, mantidos sob as mesmas condições de manejo e alimentação.

O esgotamento das reservas espermáticas extragonadais foi realizado uma semana antes do início das coletas para criopreservação de sêmen. Foram realizadas duas coletas de sêmen de cada touro, por eletroejaculação (eletroejaculador TK 800<sup>®</sup>, Minitub do Brasil Ltda), com intervalos de 20 dias.

Imediatamente após a coleta eram realizadas as avaliações macroscópicas (volume, coloração, odor, movimento de massa, densidade e pH) e microscópicas (concentração, motilidade, vigor e turbilhonamento) do sêmen e só era criopreservado o sêmen que apresentasse no mínimo motilidade 70 % e vigor 3.

Era realizada uma diluição inicial de 1: 1 utilizando o diluente comercial BotuBov<sup>®</sup> (Botupharma Biotecnologia Animal). O sêmen diluído era refrigerado durante 4 horas a 5°C no balcão de refrigeração TK WorkSêmen<sup>®</sup> (Minitub do Brasil Ltda). Duas horas após o início do resfriamento era acrescentado o restante do diluente BotuBov<sup>®</sup> (Botupharma Biotecnologia Animal) para se obter as diferentes concentrações experimentais.

De cada coleta de sêmen eram preparadas palhetas de todas as concentrações experimentais. O sêmen era envasado de forma manual em palhetas francesas de 0,5 mL e então congeladas utilizando a máquina TK 3000<sup>®</sup> (curva de congelamento P1S2) e criopreservadas em botijões com Nitrogênio líquido.

Foram processadas no total 500 doses de sêmen e para determinar a concentração por dose, foi utilizado o Fotômetro Accucell<sup>®</sup> (modelo SDM6, Minitub do Brasil Ltda) que quantificou as células espermáticas. As doses de sêmen experimental foram divididas em cinco concentrações espermáticas diferentes:  $10 \times 10^6$ ,  $20 \times 10^6$ ,  $30 \times 10^6$ ,  $40 \times 10^6$  e  $50 \times 10^6$  de espermatozoides por palheta do mesmo ejaculado, sendo 100 doses para cada concentração espermática.

Para realizar as avaliações de motilidade (%) e vigor pós-descongelamento foram descongeladas de cada partida 20 palhetas de sêmen de cada concentração espermática em banho Maria à 37°C por 30 segundos, que foram avaliadas na lâmina em microscópio óptico.

O equipamento CASA utilizado foi o modelo IVOS<sup>®</sup>, Hamilton Thorne (Beverly, MA, USA) e foi utilizado o setup para bovinos. As palhetas de sêmen foram descongeladas em banho Maria a 37°C por 30 segundos e foi retirada uma alíquota 2  $\mu$ L de cada amostra e colocada em lâmina própria com oito câmaras LEJA<sup>®</sup> (Leja Products B.V., NieuwVennep, Holanda), que foi transferida ao CASA onde foram selecionados oito campos homogêneos para avaliação da cinética e das patologias espermáticas.

Os parâmetros avaliados pelo CASA foram: a Motilidade e a Progressividade (expresso em %); as velocidades de trajetória espermática (rápida, média, devagar e estático - expresso em %); os parâmetros de deslocamento do espermatozoide - Velocidade média da trajetória (VAP, expresso em  $\mu$ m/s); Velocidade linear progressiva (VSL, expresso em  $\mu$ m/s); Velocidade curvilínea (VCL, expresso em  $\mu$ m/s); Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH, expresso em  $\mu$ m); Frequência de batimento flagelar (BCF, expresso em Hz); Retilinearidade (STR, expresso em %); Linearidade (LIN, expresso em %); Elongação (%) e Área ( $\mu$ m).

O modelo experimental empregado foi o delineamento inteiramente casualizado e os dados tabulados em planilhas do aplicativo Excel<sup>®</sup> do pacote computacional Microsoft Office<sup>®</sup> e as análises estatísticas realizadas pelo programa estatístico SISVAR, através da análise de variância a 5% de significância ( $p < 0,05$ ). Os testes utilizados foram o teste Tukey e o teste de Correlação.

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A qualidade do sêmen depende da integridade e função de todas as estruturas que compõem a célula espermática, tais como a membrana plasmática, o flagelo, as mitocôndrias, o acrossoma e a cromatina, que geralmente são avaliadas por técnicas separadas, que nem sempre correspondem à capacidade real de fecundação do espermatozoide (ARRUDA et al., 2011; KARUNAKARAN e DEVANATHAN, 2017; CELEGHINI et al., 2017).

A avaliação da motilidade espermática do sêmen criopreservado no descongelamento é um parâmetro usado para determinar a qualidade do sêmen de touros destinados aos programas de IA (CASTELO BRANCO et al., 2017). Os ejaculados com maior proporção de espermatozoides de alta motilidade progressiva são considerados mais criorresistentes e possuem maior longevidade à incubação nas avaliações no descongelamento (ARRUDA et al., 2010).

A concentração espermática por palheta do sêmen criopreservado diferiu  $p < 0,05$  na avaliação da motilidade espermática do sêmen no descongelamento, (tabela 1).

Tabela 1: Avaliação da motilidade (%) do sêmen bovino em diferentes concentrações espermáticas.

Avaliação	10 x10 <sup>6</sup>	20 x10 <sup>6</sup>	30 x10 <sup>6</sup>	40 x10 <sup>6</sup>	50 x10 <sup>6</sup>	p	Cv%
<b>Sêmen fresco</b>	85,84 <sup>a</sup>	1,0000	5,42				
<b>Descongelamento 30 segundos</b>	54,58 <sup>c</sup>	59,58 <sup>bc</sup>	68,33 <sup>a</sup>	65,83 <sup>ab</sup>	63,33 <sup>ab</sup>	0,0000	8,89
<b>TTR/R</b>	29,17 <sup>b</sup>	30,83 <sup>b</sup>	52,08 <sup>a</sup>	54,58 <sup>a</sup>	50,83 <sup>a</sup>	0,0000	17,43
<b>TTR/L</b>	11,25 <sup>c</sup>	18,33 <sup>b</sup>	23,75 <sup>ab</sup>	25,83 <sup>a</sup>	22,92 <sup>ab</sup>	0,0000	28,63
<b>Motilidade CASA</b>	43,25 <sup>a</sup>	44,08 <sup>a</sup>	49,50 <sup>a</sup>	46,83 <sup>a</sup>	42,58 <sup>a</sup>	0,0898	15,05
<b>Progressividade CASA</b>	33,42 <sup>ab</sup>	32,58 <sup>ab</sup>	37,91 <sup>a</sup>	33,58 <sup>ab</sup>	29,83 <sup>b</sup>	0,0283	17,47

Sêmen fresco %; Descongelamento (30 segundos) %; TTR/R - Teste de Termorresistência Rápido (30 minutos); TTR/L - Teste de Termorresistência Lento (3 horas); Motilidade espermática (CASA) % e Progressividade espermática (CASA) %. <sup>a,b,c</sup> Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05) pelo teste Tukey.

A alta motilidade e vigor espermática inicial, observados no sêmen fresco, não garantem um bom desempenho no processo de criopreservação, entretanto, permite que o sêmen de touros com altas quedas da motilidade seja aprovado no pós-descongelamento (CHACUR et al., 2012b). Proporções de espermatozoides vivos e sua resistência durante o pós-descongelamento e incubação, são significativamente correlacionados com a incidência de um subpopulação de espermatozoides nos ejaculados frescos (COJKIC et al., 2017).

Embora os resultados dos testes de laboratório não permitam uma avaliação precisa do potencial de fertilização da amostra de sêmen, estes testes são importantes para permitir a eliminação de amostras de baixa qualidade, já que, espermatozoides com morfologia anormal podem falhar em diferentes etapas de fertilização, dependendo da natureza da anormalidade e do defeito do espermatozoide (CARREIRA et al., 2015).

Os parâmetros de cinética espermática, como a motilidade total e a progressividade espermática, possuem grande correlação com a fertilidade e com a viabilidade avaliada nos testes de integridade de membrana (CHACUR et al., 2012b; KAKA et al., 2015), que fornecem informações valiosas sobre a integridade estrutural e atividade bioquímica da membrana, e possuem alta correlação com a viabilidade da célula espermática (BOSCARATO et al., 2016).

Nas avaliações do sêmen realizadas neste estudo à  $p < 0,05$  foi constatada uma superioridade da concentração de  $30 \times 10^6$  de espermatozoides por palheta, que obteve a maior motilidade total (49,50 %) e progressividade espermática (37,91 %), seguida pela concentração de  $40 \times 10^6$  de espermatozoides por palheta, que obteve a maior motilidade total (46,83 %) e progressividade espermática (33,58 %). Esse resultado sugere que dentre as concentrações avaliadas, as de  $30 \times 10^6$  e  $40 \times 10^6$  de espermatozoides por palheta são as que apresentaram melhor qualidade espermática.

## **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As concentrações espermáticas de  $30 \times 10^6$  e  $40 \times 10^6$  de espermatozoides por palheta são as que apresentaram melhor qualidade espermática.

## **6. ÓRGÃO FINANCIADOR E/OU AGRADECIMENTOS (OPCIONAL)**



Agradecimento: Os autores o apoio financeiro dos Colégios Tecnológicos do Estado de Goiás (COTEC), Universidade Federal de Goiás (UFG), Centro de Educação, Trabalho e Tecnologia (CETT) da UFG, Fundação Rádio e Televisão Educativa e Cultural (FRTVE), em parceria com a Secretaria de Estado da Retomada (SER) e Governo do Estado de Goiás, através do Convênio no 01/2021 - SER (Processo nº. 202119222000153) por meio do Edital de Pesquisa COTEC/CETT/SER Nº 01/2022.

## 7. REFERÊNCIAS

ABUD, C. O. G.; ABUD, L. J.; OLIVEIRA NETO, J. C.; DODE, M. A. N.; SERENO, J. R. B.; MARTINS, C. F. Comparação entre os sistemas automatizado e convencional de criopreservação de sêmen bovino. *Ciênc. anim. bras.*, v. 15, n. 1, p. 32-37, mar. 2014.

BOSCARATO, A. G.; MARTINS, L. F.; PINHO, R. O.; SILVA, Y. F. R. S.; PAPA, F. O.; MACEDO, G. G. Efeito da adição de ciclodextrina carregada com colesterol sobre a qualidade do sêmen congelado/descongelado de touros adultos da raça Nelore. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.40, n.3, p.105-110, jul./set. 2016.

CAMPANHOLI, S. P.; MONTEIRO, F. M.; MERCADANTE, M. E. Z.; RIBEIRO, E. G. Efeito da remoção de plasma seminal na criopreservação de sêmen de touros bos indicus coletados por eletroejaculador utilizando diferentes métodos de separação. *Anais... VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica. Campinas – SP, ago. 2013.*

CARREIRA, J. T.; TREVIZAN, J. T.; KIPPER, B. H.; PERRI, S. H. V.; CARVALHO, I. R.; RODRIGUES, L. H.; SILVA, C.; KOIVISTO, M. B. Impaired protamination and sperm DNA

damage in a Nellore bull with high percentages of morphological sperm defects in comparison to normospermic bulls. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.67, n.2, p.417-423, 2015.

CARVALHO, J. O.; SARTORI, R.; LEMES, A. P.; MOURÃO, G. B.; DODE, M. A. N. Cinética de espermatozoides criopreservados de bovinos após sexagem por citometria de fluxo. *Pesq. agropec. bras.*, v.44, n.10, p.1346-1351, out. 2009.

CASTELO BRANCO, M. A.; CASTELO BRANCO, Y. N. T. C.; MORAES JUNIOR, F. J.; BARROS, F. N.; BARÇANTE, F. P. S.; CARVALHO, G. M. C.; MELO EVANGELISTA, L. S.; ABREU-SILVA, A. L.; SOUSA FILHO, M. A.; SOUZA, J. A. T. Plasminogen activator inhibitor 1 and Antipain preserve acrosome integrity of bovine spermatozoa during cryopreservation. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.69, n.5, p.1114-1124, 2017.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P. de; FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A.; SANTOS, F. B. dos; ALVES, M. B. R.; OLIVEIRA, B. M. M. de. Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.41, n.1, p.40-45, jan./mar. 2017.

CHACUR, M. G. M.; DIAS, H. S. D.; PAPA, F. O.; LOUVISON, B. A.; CALESCO, M. M.; PAPA, P. de M. Efeito de meios diluentes na viabilidade de sêmen congelado bovino. *Vet. e Zootec.*, v.19, n.1, p.346-355, mar. 2012b.

COJKIĆ, A.; DIMITRIJEVIĆ, V.; SAVIĆ, M.; JEREMIĆ, I.; VUKOVIĆ, D.; ČOBANOVIĆ, N.; OBRADOVIĆ, S.; PETRUJKIĆ, B. T. The correlation between selected computer assisted sperm analysis parameters and bull fertility. *Veterinarski Arhiv.*, v.87, n.2, p.129-137, 2017.

DUARTE JÚNIOR, M. F.; ZERVOUDAKIS, L. K. H.; ZERVOUDAKIS, J. T.; NICHI, M.; BERTOLLA, R. P.; TSUNEDA, P. P.; SENRA E SILVA, L. E.; WINGERT, F. M.;

MARINHO, W. A. dos S. Avaliação do tocoferol no congelamento do sêmen bovino e nas taxas de prenhez após inseminação artificial em tempo fixo. R. bras. Ci. Vet., v. 22, n. 2, p. 114-118, abr./jun. 2015.

GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; RAMÓN, M.; DEL OLMO, E.; JIMÉNEZ-RABADÁN, P.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; ANEL-LÓPEZ, L.; GARDE, J. J.; SOLER, A. J. Dynamics of sperm subpopulations based on motility and plasma membrane status in thawed ram spermatozoa incubated under conditions that support in vitro capacitation and fertilisation. Reprod. Fertil. Dev., v.26, p.725-732, 2014.

KAKA, A.; WAHID, H.; ROSNINA, Y.; YIMER, N.; KHUMRAN, A. M.; SARSAIFI, K.; BEHAN, A. A.; KAKA, U.; EBRAHIMI, M.  $\alpha$ -Linolenic acid supplementation in BioXcell® extender can improve the quality of post-cooling and frozenthawed bovine sperm. Anim. Reprod. Sci., v. 153, p. 1-7, fev. 2015.

KARUNAKARAN, M.; DEVANATHAN, T. G. Evaluation of bull semen for fertility-associated protein, in vitro characters and fertility. J. Appl. Anim. Res., v. 45, n. 1, p. 136-144, 2017.

LEITE, P. A.; SCHREDERA, G. G.; ALMEIDA, C. L. R. de; ZÚCCARIA, C. E. S. N.; COSTA E SILVA, E. V. da. Criopreservação do Sêmen Bovino. UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde, v. 13, n. 4, p. 279-286, 2011.

MADEIRA, E. M.; BIANCHI, I.; VIEIRA, M. B.; SCHNEIDER, A.; SEVERO, N. C.; PFEIFER, L. F. M.; CORRÊA, M. N. Avaliação de diferentes crioprotetores intra e extracelulares na criopreservação de sêmen de touros. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.65, n.2, p.415-420, 2013.



MARINHO, W. A. S.; HATAMOTO-ZERVOUDAKIS, L. K.; ZERVOUDAKIS, J. T.; ARGUELLO, F. A. P. B.; TSUNEDA, B. H.; DUARTE JUNIOR, M. F.; TSUNEDA, P. P.; BARBOSA, E. A. Características seminais e de membrana espermática em touros suplementados com tocoferol. Rev. Bras. Saúde Prod. Anim., v.17, n.2, p.322-330, abr./jun., 2016.

MORRIS, G. J.; ACTON, E.; MURRAY, B. J.; FONSECA, F. Freezing injury: The special case of the sperm cell. Cryobiology, v. 64, p. 71-80, 2012.

SILVA, N. C.; LEÃO, K. M.; MARQUES, T. C.; SILVA, R. P.; RODRIGUES, M. C. Uso de sêmen fresco e refrigerado em programas de inseminação artificial em tempo fixo em fêmeas bovinas. Enciclopédia Biosfera, v.9, n.17; p.2537-2551, 2013.