



EFEITO DA REMOÇÃO DE PLASMA SEMINAL NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE TOUROS *BOS INDICUS* COLETADOS POR ELETROEJACULADOR UTILIZANDO DIFERENTES MÉTODOS DE SEPARAÇÃO

Suzane Peres **Campanholi**^{1a}; Fabio Morato **Monteiro**^{2b}; Maria Eugênia Zerlotti **Mercadante**^{2c}; Enilson Geraldo **Ribeiro**^{2c}

¹ Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp; ² Instituto de Zootecnia - Centro Apta Bovinos de Corte

Nº13701

RESUMO - Muitos autores tem descrito a interferência do plasma seminal nas funções espermáticas, como a motilidade, viabilidade, fertilidade e no auxílio à capacitação. Uma alternativa para reduzir as concentrações de plasma seminal do ejaculado é a centrifugação do sêmen ou sua filtragem. Nesse sentido o objetivo deste trabalho foi investigar a congelabilidade do sêmen de touros colhidos por eletroejaculação na remoção do plasma seminal pelas técnicas de centrifugação e filtragem, avaliando suas consequências na cinética espermática e viabilidade ao teste de termorresistência rápido (TTR) por um sistema computadorizado de avaliação espermática (CASA). Foram utilizados 38 touros da raça Nelore (*Bos indicus*), sendo confrontadas três técnicas antes da criopreservação espermática: Tratamento N (criopreservação convencional, sem separação do plasma seminal), Tratamento C (criopreservação, separando o plasma seminal por centrifugação) e Tratamento F (criopreservação, separando o plasma seminal pelo Sperm Filter®). Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos na análise do sêmen fresco pelo CASA. Entretanto, no sêmen criopreservado, foi observado um aumento na VAP e VSL do tratamento F em relação ao N ($P < 0,05$), mas não houve diferença com o C ($P = 0,58$). Após passar pelo TTR, os valores de VAP, VSL, STR e LIN do sêmen do tratamento C e F foram maiores em relação ao N e quando foi avaliado VCL, BCF e ALH o tratamento C foi maior que N ($P < 0,05$). Portanto, a retirada do plasma seminal interfere positivamente na cinética espermática do sêmen bovino, independentemente do método utilizado.

Palavras-chaves: Bovino, CASA, centrifugação, filtragem, Nelore, TTR.

^a Bolsista CNPq: Graduação em Medicina Veterinária, supc@hotmail.com, ^b Orientador: monteiro@iz.sp.gov.br

^c Colaborador: mercadante@iz.sp.gov.br; enilson@iz.sp.gov.br



ABSTRACT – *Many authors have described the interference of seminal plasma in sperm functions such as motility, viability, fertility and aid training. An alternative to reduce the concentrations of seminal plasma of the ejaculate, is the semen centrifugation or filtration. In this sense, the objective of this study was to investigate the freezability of the bovine semen collected by electroejaculation at the removal of seminal plasma by centrifugation and filtration techniques, assessing their impact on the viability of sperm kinetics and rapid thermoresistance tests (TRT) by a computerized sperm assessment (CASA). We used 38 Nelore bulls (*Bos indicus*), being confronted three techniques before sperm cryopreservation: Treatment N (conventional cryopreservation, without separation of seminal plasma), Treatment C (cryopreservation, separating the seminal plasma by centrifugation) and treatment F (cryopreservation separating the seminal plasma Sperm Filter®). There was no significant difference between treatments in the analysis of fresh semen by CASA. However, semen cryopreserved, an increase was observed in the treatment VSL and VAP F to N ($P<0.05$), but no difference with the C ($P=0.58$). After passing through the TTR, the values of VAP, VSL, STR and LIN treatment of semen C and F were higher compared to when evaluated and N VCL and ALH BCF treatment C was greater than N ($P<0.05$). Therefore, the removal of seminal plasma interferes positively in sperm kinetics of bovine semen, regardless of the method used.*

Key-words: Bovine, CASA, centrifugation, filtration, Nelore, RTT.

1 INTRODUÇÃO

As taxas de sobrevivência espermática pós-criopreservação não são ótimas para a maioria das espécies. Em média, cerca da metade de todos os espermatozoides humanos e bovinos, são danificados ou destruídos pelo congelamento, limitando a total eficiência e eficácia da preservação de sêmen. Com outras espécies, os resultados podem ser até mesmo piores e mais variáveis (Leibo e Bradley, 1999; Watson, 2000).

Uma das estratégias bastante utilizadas em diversas espécies é a retirada do plasma seminal antes da criopreservação. Os efeitos prejudiciais do plasma seminal sobre os espermatozoides, durante a criopreservação pode ser relacionado a ação de enzimas específicas, como a atividade da lipase no plasma seminal de garanhões que prejudica a motilidade dos espermatozoides (Zahn et al., 2006). Segundo Tibary et al. (1990) grandes quantidades de plasma seminal no ejaculado de bovinos aumenta a permeabilidade na membrana celular espermática causando vulnerabilidade ao choque frio.

Para a retirada do plasma seminal a técnica mais usada é o método de centrifugação. Em garanhões, a centrifugação do sêmen é frequentemente realizada em programas de estação de



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

monta com a finalidade de reduzir a concentração de plasma seminal e melhorar a concentração do sêmen. Entretanto, vários trabalhos relatam aparente injúria ao espermatozóide prejudicando a fertilização pelo método de centrifugação (Knop et al., 2005; Sieme et al., 2006). Outro método de separação de fácil aplicabilidade é o Sperm Filter®. Este método consiste em um filtro de membrana sintética com porosidade que permite a passagem do plasma seminal e bactérias, retendo apenas os espermatozoides. O filtro elimina a necessidade de uso de centrífuga, sendo menos lesivo aos espermatozoides quando comparado com a centrifugação usualmente utilizada para a remoção do plasma seminal. Com isso, avaliar a separação do plasma seminal utilizando filtros pode melhorar a qualidade e viabilidade de sêmen congelado de touros coletados por eletroejaculador.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O sêmen de 38 touros da raça Nelore (*Bos indicus*), com idade entre 3 e 8 anos e previamente avaliados quanto a normalidade dos parâmetros andrológicos, foi coletado utilizando eletroejaculador. Foram realizadas as análises físicas e morfológicas de rotina (volume, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática), segundo as recomendações do CBRA (1998).

Foram confrontadas três técnicas antes da criopreservação espermática com o objetivo de verificar o efeito da remoção do plasma seminal pela centrifugação ou filtração pelo Sperm Filter® na cinética espermática pré e pós congelamento. Os ejaculados obtidos foram fracionados em três alíquotas, passando por três tratamentos. O tratamento N (Convencional) constitui-se na diluição do sêmen de modo convencional para a concentração final de 30×10^6 espermatozoides por palheta com o diluidor BotuBov® contendo 7% de crioprotetor glicerol. O tratamento C (Centrifugado) envolveu a diluição inicial do sêmen na proporção de 1:4 com diluidor BotuSemen® e centrifugação por 10 minutos a 600xg (2200 rpm) conforme descrito por Papa et al. (1998), para a remoção do plasma seminal. Após a centrifugação foi desprezado o sobrenadante e o “pellet” foi ressuspensionado com o diluidor BotuBov® na mesma concentração do tratamento N. O tratamento F (Filtrado) se caracterizou pela filtração pelo dispositivo Sperm Filter®. Após a filtração do sêmen, os espermatozoides foram ressuspensionados com diluidor BotuBov® na mesma concentração do tratamento N.

Após os tratamentos, o sêmen fresco foi avaliado por um sistema computadorizado de avaliação espermática (Computer Assisted Semen Analysis – CASA). Para realizar as análises, 10 µl de sêmen foi colocado em câmara de leitura Makler previamente aquecida, e em seguida esta foi inserida no aparelho IVOS (Versão 12.3, Hamilton-Thorne Bioscience). Foi realizada a escolha automática e padronizada de 5 campos de leitura e análise para todas as amostras. Foram



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

analisadas as seguintes características de movimento espermático: motilidade total (MOT, %), motilidade progressiva (PROG, %), velocidade do trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude de deslocamento lateral da cabeça espermática (ALH, μm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %) e velocidade rápida (RAP, %).

Após os tratamentos e análise inicial, o sêmen foi envasado à temperatura ambiente em palhetas de 0,5 mL que foram identificadas quanto ao tratamento e o número do animal. A curva de resfriamento foi programada em uma máquina de congelar (Tetakon®, TK 4000) e realizada a partir da temperatura ambiente (25°C), seguindo uma curva de resfriamento de 0,25°C/min até 5°C. Após 4 horas a uma temperatura de 5°C foi realizada a curva de congelamento de 15°C/min de 5°C até -80°C e 10°C/min até atingir -140°C. Após atingir esta temperatura, as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido e colocadas em racks devidamente identificadas e armazenadas em nitrogênio líquido (-196° C) até o momento de realização das análises pós-descongelamento.

O descongelamento foi realizado da mesma forma para todos os tratamentos, sendo em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Após o descongelamento o sêmen foi colocado em microtubos de 1,5 mL (tipo Eppendorf), homogeneizado e então avaliados quanto aos mesmos parâmetros do sêmen fresco mencionados anteriormente pelo CASA. Por fim, foi realizado o Teste de Termorresistência Rápido (TTR), onde o sêmen foi incubado em banho-maria a 46°C por 30 minutos e em seguida avaliado, mantendo o mesmo padrão de avaliação pelo CASA.

O delineamento foi inteiramente casualizado. A análise estatística foi realizada pelo procedimento GLM (SAS, Inst.; Inc.; Cary, NC) e os tratamentos foram comparados entre si pelo teste t.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação às análises do sêmen fresco, não houve diferença entre os tratamentos para nenhum dos parâmetros analisados (MOT, PROG, VAP, VSL, ALH, BCF, STR, LIN E RAP) (Tabela 1). Em estudo realizado por Aurich et al. (1996) em equinos, também foi relatado que a motilidade dos espermatozoides antes do congelamento não foi afetada pelo processo de centrifugação ou adição de plasma seminal e extensor de sêmen. Resultados semelhantes foram relatados por Pasquini et al. (2008) ao utilizarem sêmen epididimário de equino, que foi incubado com BotuSemen® ou plasma seminal e posteriormente centrifugado.

No presente estudo não ocorreu diferença entre os parâmetros de MOT, PROG, VCL, ALH, BCF, STR, LIN e RAP entre os três tratamentos confrontados no sêmen criopreservado (Tabela 2). Resultados semelhantes também foram observados por Pasquini et al. (2008) com sêmen de



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

garanhões que foram incubados somente com plasma seminal ou BotuSemen® e depois centrifugados, não apresentando diferença dos padrões de MOT, PROG e RAP pós-descongelamento. Os parâmetros para velocidade de trajeto (VAP) e velocidade progressiva (VSL) apresentaram diferença entre o tratamento convencional (N) e o filtrado (F), sendo que o sêmen que sofreu o processo de filtração apresentou valores maiores em relação ao convencional, mas não diferiram do centrifugado (Figura 1). Aurich et al. (1996) relataram em garanhões que a porcentagem de espermatozóides progressivamente móveis imediatamente após o descongelamento foi mais elevada na ausência do plasma seminal do que na sua presença.

Em estudo recente, foi comparado o uso do Sperm Filter® e o processo de centrifugação em sêmen equino e foi relatado que não ocorreu diferença entre os dois tratamentos nos parâmetros de cinética espermática, antes ou após a criopreservação (Ramires Neto et al., 2013), o que também foi observado neste estudo. Ramires Neto et al (2013) também relataram o fato do processo de filtração apresentar como vantagem em relação a centrifugação, maior taxa de recuperação de espermatozóides e praticidade, devido ser um processo mais rápido e eliminar a utilização de centrífuga.

Após o sêmen passar pelo teste de TTR, não houve alteração significativa nos parâmetros de MOT, PROG e RAP analisados. Entretanto, com relação aos valores de VAP, VSL, STR e LIN, foram observados maiores valores para os tratamentos centrifugado (C) e filtrado (F) em relação ao convencional. Estes resultados confirmam o fato de que a retirada do plasma seminal, melhora a cinética espermática independentemente do método utilizado. Em relação aos valores de VCL, BCF e ALH, o tratamento C foi maior que o N, mas o tratamento F não diferiu de C e N (Tabela 3).

Apesar de percebermos melhora considerável na cinética espermática dos tratamentos centrifugado e filtrado em relação ao normal após realização do TTR, outros testes devem ser feitos para avaliar a real viabilidade espermática, bem como seu potencial de fertilidade, já que foi relatado que o teste de termorresistência não prediz confiavelmente a fertilidade do sêmen de touros (Vianna, 2009).

Sendo assim, podemos ver que houve uma melhora na cinética espermática ao realizarmos a separação do plasma seminal, em relação ao tratamento convencional, após este passar pelo processo de criopreservação. Porém, ao compararmos o tratamento filtrado com o centrifugado não houve variação considerável entre eles, neste âmbito. Outros testes relativos à integridade de membrana e fertilidade devem ser feitos, para predizer se há alguma diferença significativa entre os tratamentos de filtragem e centrifugação do plasma seminal de touros.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Tabela 1. Média (\pm desvio-padrão) da motilidade total (MOT), motilidade progressiva (PROG) e parâmetros da cinética espermática (VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, LIN e RAP) no sêmen fresco

Sêmen fresco	TRATAMENTOS		
	N	C	F
MOT (%)	86,78 \pm 4,1 ^a	83,43 \pm 4,1 ^a	82,13 \pm 4,1 ^a
PROG (%)	59,47 \pm 3,3 ^a	59,52 \pm 3,3 ^a	58,56 \pm 3,3 ^a
VAP (μ m/s)	109,53 \pm 2,8 ^a	110,59 \pm 2,8 ^a	112,02 \pm 2,8 ^a
VSL (μ m/s)	83,08 \pm 2,3 ^a	85,88 \pm 2,3 ^a	86,75 \pm 2,3 ^a
VCL (μ m/s)	192,13 \pm 5,1 ^a	192,05 \pm 5,1 ^a	197,78 \pm 5,1 ^a
ALH (μ m)	7,76 \pm 0,2 ^a	7,63 \pm 0,2 ^a	7,94 \pm 0,2 ^a
BCF (Hz)	28,85 \pm 1,1 ^a	29,02 \pm 1,1 ^a	28,93 \pm 1,1 ^a
STR (%)	76,43 \pm 2,5 ^a	78,3 \pm 2,5 ^a	77,73 \pm 2,5 ^a
LIN (%)	45,17 \pm 1,7 ^a	47,04 \pm 1,7 ^a	45,69 \pm 1,7 ^a
RAP (%)	85,52 \pm 4,0 ^a	82,17 \pm 4,0 ^a	81,08 \pm 4,0 ^a

N: Convencional; C: Centrifugado; F: Filtrado; MOT: Motilidade Total; PROG: Motilidade Progressiva; VAP: Velocidade de Trajeto; VSL: Velocidade Progressiva; VCL: Velocidade Curvilínea; ALH: Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça Espermática; BCF: Frequência de Batimentos; STR: Retilinearidade; LIN: Linearidade; Rap: Velocidade Rápida. *Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Mesma legenda para as Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Média (\pm desvio padrão) da motilidade total (MOT), motilidade progressiva (PROG) e parâmetros da cinética espermática (VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, LIN e RAP) no sêmen criopreservado pós-descongelção

Sêmen criopreservado	TRATAMENTOS		
	N	C	F
MOT (%)	54,44 \pm 3,2 ^a	54,27 \pm 3,2 ^a	51,52 \pm 3,2 ^a
PROG (%)	41,47 \pm 2,6 ^a	42,72 \pm 2,6 ^a	42,19 \pm 2,6 ^a
VAP (μ m/s)	79,93 \pm 2,3 ^a	84,68 \pm 2,3 ^{ab}	86,49 \pm 2,3 ^b
VSL (μ m/s)	67,12 \pm 1,8 ^a	71,25 \pm 1,8 ^{ab}	74,49 \pm 1,8 ^b
VCL (μ m/s)	134,24 \pm 4,1 ^a	140,17 \pm 4,1 ^a	139,31 \pm 4,1 ^a
ALH (μ m)	5,71 \pm 0,1 ^a	5,81 \pm 0,1 ^a	5,58 \pm 0,1 ^a
BCF (Hz)	32,2 \pm 0,9 ^a	31,97 \pm 0,9 ^a	33,76 \pm 0,9 ^a
STR (%)	84,22 \pm 2,0 ^a	84,36 \pm 2,0 ^a	86,05 \pm 2,0 ^a
LIN (%)	52,58 \pm 1,4 ^a	53,33 \pm 1,4 ^a	55,44 \pm 1,4 ^a
RAP (%)	49,66 \pm 3,2 ^a	52,05 \pm 3,2 ^a	49,5 \pm 3,2 ^a

Tabela 3. Média (\pm desvio padrão) da motilidade total (MOT), motilidade progressiva (PROG) e parâmetros da cinética espermática (VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, LIN e RAP) no sêmen pós TTR

Sêmen pós TTR	TRATAMENTOS		
	N	C	F
MOT (%)	38,83 \pm 3,2 ^a	35,61 \pm 3,2 ^a	36,05 \pm 3,2 ^a
PROG (%)	30,94 \pm 2,6 ^a	30,66 \pm 2,6 ^a	31,5 \pm 2,6 ^a
VAP (μ m/s)	54,73 \pm 2,3 ^a	63,64 \pm 2,3 ^b	63,31 \pm 2,3 ^b
VSL (μ m/s)	47,73 \pm 1,8 ^a	56,85 \pm 1,8 ^b	57,29 \pm 1,8 ^b
VCL (μ m/s)	90,13 \pm 4,1 ^a	103,35 \pm 4,1 ^b	100,95 \pm 4,1 ^{ab}
ALH (μ m)	3,98 \pm 0,16 ^a	4,5 \pm 0,16 ^b	4,28 \pm 0,16 ^{ab}
BCF (Hz)	26,97 \pm 0,92 ^a	30,26 \pm 0,92 ^b	29,46 \pm 0,92 ^{ab}
STR (%)	73,08 \pm 2,06 ^a	89,3 \pm 2,06 ^b	90,55 \pm 2,06 ^b
LIN (%)	46,11 \pm 1,43 ^a	56,88 \pm 1,43 ^b	58,25 \pm 1,43 ^b
RAP (%)	35,63 \pm 3,2 ^a	33,83 \pm 3,2 ^a	34,27 \pm 3,2 ^a



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

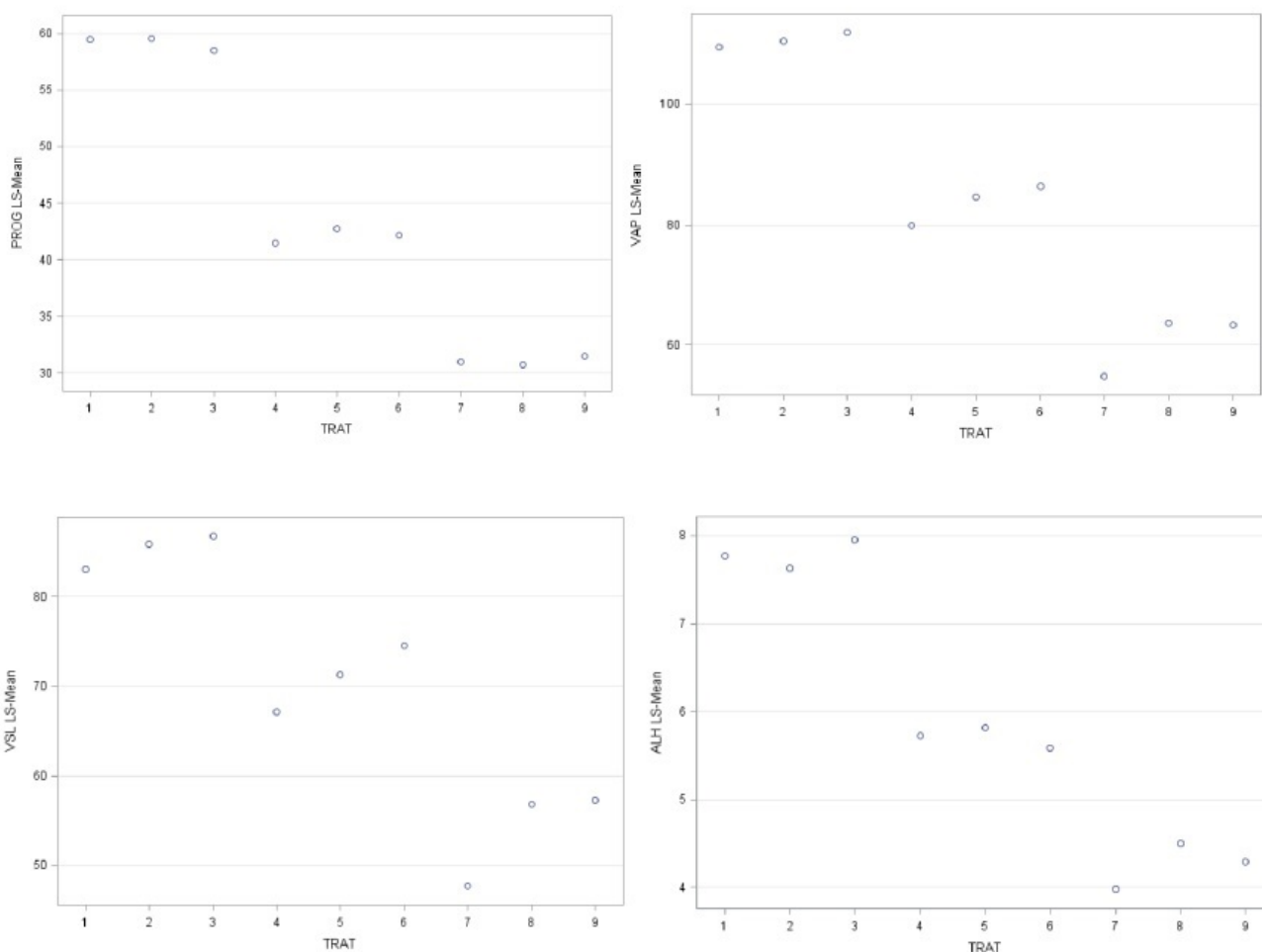


Figura 1. Gráficos das médias dos parâmetros de motilidade progressiva (PROG, %), velocidade do trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$) e amplitude de deslocamento lateral da cabeça espermática (ALH, μm) em seus respectivos tratamentos (N, C e F) nos três períodos analisados. 1: sêmen fresco convencional; 2: sêmen fresco centrifugado; 3: sêmen fresco filtrado; 4: sêmen criopreservado convencional; 5: sêmen criopreservado centrifugado; 6: sêmen criopreservado filtrado; 7: sêmen pós TTR convencional; 8: sêmen pós TTR centrifugado; 9: sêmen pós TTR filtrado.

4 CONCLUSÃO

A retirada do plasma seminal interfere positivamente na cinética espermática do sêmen bovino criopreservado, independentemente do método utilizado.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ (PIBIC) pela bolsa concedida e a FAPESP pelo apoio financeiro (Processo 2012/05555-8).



6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AURICH, J.E.; KÜHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v.46, p.791-797, 1996.

CBRA – COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte: 1998. 46p.

KNOP, K.; HOFFMANN, N.; RATH, D.; SIEME, H. Effects of cushioned centrifugation technique on sperm recovery and sperm quality in stallions with good and poor freezability. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.294-297, 2005.

LEIBO, S.P.; BRADLEY, L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa, GAGNON, C. (Ed.) **The Male Gamete**, Vienna; Cache River, p. 501-516, 1999.

PAPA, F.O.; NEVES NETO, J.R.; LEME, D.P.; FERREIRA, J.C.P. A comparative study between the freezability and fertility of stallion semen using different extenders. In: Annual Conference Of Society For Theriogenology., 1998, Baltimore. **ANAIS DO ANNUAL CONFERENCE OF SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY**, p. 149-151, 1998.

PASQUINI, D.F.; MELO, C.M.; PAPA, F.O.; FIORATTI, E.G.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; ALVARENGA, M.A.; DE VITA, B.; DELL'AQUA JR, J.A. Effects of seminal plasma and sperm motility factors on viability of epididymal sperm of stallions. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.338-339, 2008.

RAMIRES NETO, C.; MONTEIRO, G.A.; SOARES, R.F.; PEDRAZZI, C.; DELL'AQUA, J.A.; PAPA, F.O.; CASTRO-CHAVES, M.M.; ALVARENGA, M.A. New seminal plasma removal method for freezing stallion semen. **Theriogenology**, v. 79, p.1120-1123, 2013.

SIEME, H.; KNOP, K.; RATH, D. Effects of cushioned centrifugation on sperm quality in stallion semen stored cooled at 5 degrees for 24h, and stored cooled for 2 or 24h and then frozen. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.99-103, 2006.

TIBARY, A.; GRAHAM, E.F.; ASR, A.; BOUKHLIQ, R.; DEYO, R. Effect of dialysis or centrifugation on post-thaw motility and fertility of Santa Gertrudis bull semen collected by electroejaculation. **Theriogenology**, v.33, p.733-739, 1990.

VIANNA, F.P.; PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; MELO, C.M.; DELL'AQUA JR, J.A. Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen. **Animal Reproduction Science**, v.113, p.279-282, 2009.

ZAHN, F.S.; PAPA, F.O.; MELO, C.M. Blood serum, seminal plasma and sperm membrane protein profiles in stallions: are they correlated to semen freezability? **Animal Reproduction Science**, v.94, p.64–66, 2006.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p. 481-492, 2000.