



**10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC2016**  
**02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-135-6**

## **EFEITO DO SISTEMA DE REFRIGERAÇÃO NA CINÉTICA ESPERMÁTICA E INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA DE SÊMEN BOVINO**

Patricia Baltagim **Zacheo**<sup>1</sup>; Fábio Morato **Monteiro**<sup>2</sup>; Erika Aline Ribeiro **Dias**<sup>3</sup>; Letícia Zoocolaro **Oliveira**<sup>4</sup>; Maria Eugênia Zerlotti **Mercadante**<sup>5</sup>

**Nº 16704**

**RESUMO**—O ritmo de refrigeração pode diminuir o choque térmico e seus danos as células espermáticas, e os resultados na criopreservação podem ser melhorados utilizando-se curvas de refrigeração mais lentas e homogêneas. O objetivo do trabalho foi confrontar diferentes sistemas de refrigeração de sêmen bovino, e seus efeitos na cinética espermática e na membrana plasmática. Foram utilizados 25 ejaculados de 8 touros da raça Nelore, colhidos por meio de eletroejaculador. Os ejaculados foram diluídos em meio de fração única (BotuBov®) para concentração final de  $50 \times 10^6$  spz/ml, refrigerados e estabilizados por 4 horas a 5°C em 5 sistemas de refrigeração (R1: TK 4000® com curva de resfriamento de 0,25°C/minuto; R2: TK 4000® com curva de resfriamento de 0,5°C/minuto, R3: refrigerador Minitübe® com curva de refrigeração de 5°C/min, R4: BotuTainer® com curva de refrigeração de 3,5°C/min e R5: refrigerador doméstico comum com curva de refrigeração de 5°C/min). A cinética espermática foi avaliada pelo CASA (sistema de análise computadorizada de sêmen) e a integridade de membrana plasmática e acrossomal foi avaliada por uma associação de sondas fluorescentes. O sêmen fresco apresentou melhor resultado em todas variáveis avaliadas pelo CASA comparativamente aos 5 sistemas de refrigeração. Não foi observado diferenças na motilidade total, motilidade progressiva e nos parâmetros da cinética espermática entre os 5 sistemas de refrigeração. O sistema de refrigeração com curva de 0,25°C/min preservou melhor a membrana plasmática dos espermatozoides comparativamente ao refrigerador doméstico comum.

**Palavras-chaves:** CASA, Nelore, qualidade espermática, refrigeração.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Medicina Veterinária, UNIRP, São José do Rio Preto-SP; patriciabzacheo\_medvet@hotmail.com

2 Orientador: Pesquisador Centro de Pesquisas Bovinos de Corte - Instituto de Zootecnia - Sertãozinho - SP; monteiro@iz.sp.gov.br.

3 Instituto de Zootecnia, Centro APTA bovinos de corte, Sertãozinho-SP.

4 Professora de Medicina Veterinária, UNIRP, São José do Rio Preto-SP.

5 Instituto de Zootecnia, Centro APTA bovinos de corte, Sertãozinho-SP.



**ABSTRACT** – *The cooling rate can decrease the thermal shock and the damage to sperm cells, and best results in cryopreserving can be obtained using slower and homogeneous cooling curves. In this context, the objective of the present study was to confront simultaneously different bovine semen cooling systems and evaluate their effects on sperm quality. Twenty-five ejaculates from 8 bulls Nelore collected by electroejaculator, was used. Samples were diluted in cryopreservation extender BotuBov® (Botupharma®, Botucatu, Brazil) to final concentration of  $50 \times 10^6$  spz/ml. After filling 0.5 mL French straws, samples were cooled for 4 hours in 5 different cooling systems: System 1 (R1: TK 4000® with cooling curve of  $0.25^\circ\text{C}/\text{minute}$ ); System 2 (R2: TK 4000® with cooling curve of  $0.5^\circ\text{C}/\text{minute}$ ); System 3 (R3: Minitube® with cooling curve  $5^\circ\text{C}/\text{minute}$ ); System 4 [R4: portable isothermal Botutainer® box with cooling curve  $3.5^\circ\text{C}/\text{minute}$ ), and System 5 [R5: common household refrigerator with cooling curve  $5^\circ\text{C}/\text{minute}$ ). The sperm kinetics was evaluated by CASA (computer analysis of semen System) and plasma membrane integrity was evaluated using combination of fluorescent probes. The fresh semen showed better results in all parameters evaluated by CASA compared with the 5 cooling systems. No difference was observed in total motility and progressive motility of sperm and kinetic parameters between the 5 cooling systems after 4 hours stabilization at  $5^\circ\text{C}$ . The system with cooling curve of  $0,25^\circ\text{C}/\text{min}$  preserved better the plasma membrane and acrosome of sperm compared to the common household refrigerator.*

**Keywords:** CASA; Nelore; sperm quality; cooling.

## **1 INTRODUÇÃO**

Um dos objetivos da indústria de sêmen congelado é diminuir a quantidade de espermatozoides em cada dose inseminante, para que mais doses possam ser produzidas a partir de cada ejaculado (Vishwanath e Shannon, 2000), mas isso só pode ser alcançado melhorando a taxa de sobrevivência celular na congelação. O objetivo final das centrais de IA é a obtenção de taxas de fertilidade com sêmen congelado semelhante ao sêmen fresco, utilizando uma dose inseminante baixa e técnicas tradicionais de IA. Apenas quando esse objetivo for alcançado, o sêmen congelado será atraente tanto para os produtores quanto para as centrais (Mocé et al., 2010). Portanto, novas estratégias de congelação são necessárias para aumentar a quantidade e qualidade de espermatozoides vivos no pós-descongelamento.



**10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC2016**  
**02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-135-6**

A congelação do sêmen envolve vários fatores, e diluidores, protocolos, espécie animal, raça e reprodutores, individualmente dentro de cada raça, são apenas alguns dos muitos parâmetros que precisam ser incluídos no sucesso da congelação. Cada um desses parâmetros tem uma variedade de fatores e cada um pode influenciar outros parâmetros. Evidentemente, testar todos os fatores ao mesmo tempo para otimizar um protocolo de congelação é muito difícil. Portanto, várias estratégias (cada uma testando alguns fatores) foram utilizadas para resolver este problema. Algumas das estratégias incluem a mudança dos diluidores, dos crioprotetores e suas concentrações, assim como alteração das curvas de congelação e/ou descongelação do protocolo. Em geral, essas estratégias não atuam sobre o espermatozóide em si, mas no meio que o envolve, protocolos e sistemas de congelação.

Os métodos de congelar sêmen mais utilizado no campo, ou seja, fora de uma central de inseminação artificial, são sistemas que utilizam materiais simples como caixas de isopor com gelo e refrigeradores domésticos para a refrigeração, e caixas de isopor com nitrogênio líquido para a criopreservação. O maior problema desta técnica é a padronização da curva de refrigeração e suas consequências na criopreservação, uma vez que existe uma variação muito grande no tamanho do isopor e nos refrigeradores (condições e tempo de uso, marca, modelo e tamanho) e isso pode afetar e prejudicar muito os dois processos. Outro sistema bastante utilizado no campo e muito útil pela sua praticidade de transportar o sêmen diluído é o Botutainer® (Botupharma, Botucatu, Brasil), que, segundo fabricante, esse sistema mantém a temperatura a 5°C por até 24 horas. Atualmente, vários técnicos que trabalham no campo utilizam equipamentos para criopreservação de sêmen, cuja principal característica é estabelecer uma curva de resfriamento e criopreservação constante e padronizada. Esses equipamentos eletrônicos e portáteis fazem toda a curva positiva de forma lenta e homogênea, com refrigeração e queda de temperatura controlada de 0,25°C/min ou 0,5°C/min, partindo da temperatura ambiente. Essa etapa é de extrema importância porque a refrigeração rápida de 30°C para 0°C pode induzir choque térmico (Watson, 2000). Apesar da facilidade de aquisição desses equipamentos, o custo ainda é muito alto quando comparado com técnicas simples e baratas que utilizam refrigeradores e caixa de isopor. Tendo em vista que o ritmo controlado de refrigeração pode amenizar o choque térmico e seus danos às células espermáticas, acredita-se que melhores resultados na criopreservação poderiam ser obtidos utilizando-se curvas de refrigeração mais lentas e homogêneas, mas em alguns sistemas de refrigeração, como refrigeradores domésticos, isso não acontece.

O objetivo do trabalho foi confrontar sistemas de refrigeração de sêmen bovino, e seus efeitos na qualidade do sêmen antes da criopreservação. Na literatura já foram testados alguns sistemas de



refrigeração, mas de forma inédita o presente estudo comparou, simultaneamente, cinco sistemas de refrigeração e sua eficácia na manutenção da qualidade do sêmen bovino refrigerado.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Foram coletados de 1 a 5 ejaculados de 8 touros com eletroejaculador (Neovet<sup>®</sup>, Uberaba, Brasil), totalizando 25 ejaculados. Após a coleta foram realizadas as análises físicas e morfológicas de rotina (volume, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática). O volume foi determinado diretamente, a partir de um tubo de coleta de 15 ml. Para determinação da concentração espermática, uma alíquota de 20µL de sêmen foi avaliada pelo Fotômetro SDM 1 calibrado para bovinos (Minitube<sup>®</sup>, Tiefenbach, Germany), com auxílio de microcuveta apropriada.

Após a coleta e a avaliação inicial, os ejaculados obtidos foram diluídos de modo convencional, utilizando diluidor BotuBov (BotuFarma<sup>®</sup>, Botucatu, Brasil, contendo 7% de crioprotetor glicerol) para concentração final de 25x10<sup>6</sup>sptz/dose (50 x 10<sup>6</sup>sptz/mL). O sêmen fresco diluído foi avaliado por um sistema de análise computadorizada da cinética espermática (CASA; IVOS, Versão 14, Hamilton-Thorne Bioscience<sup>®</sup>, Beverly, USA) e integridade de membranas plasmática por fluorescência. Esta avaliação foi considerada como controle (R0) na comparação com o sêmen refrigerado nos cinco sistemas avaliados.

Após a diluição e a avaliação inicial, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL e, posteriormente, as palhetas foram vedadas com álcool polivinílico e identificadas com o número do animal e sistema de refrigeração. Foram refrigeradas 2 palhetas de cada sistema de refrigeração: R1; sistema de criopreservação (TK 4000<sup>®</sup>, Uberaba, Brasil) com curva de refrigeração de 0,25°C/min; R2; sistema de criopreservação (TK 4000<sup>®</sup>) com curva de refrigeração de 0,5°C/min; R3; refrigeradora Minitube (Minitube<sup>®</sup>, Tiefenbach, Germany) com curva de refrigeração de 5°C/min; R4; sistema portátil de refrigeração de sêmen (BotuTainer<sup>®</sup>, Botucatu, Brasil) com curva de refrigeração de 3,5°C/min e R5; refrigerador doméstico comum regulado a temperatura de 5°C (Eletrolux<sup>®</sup>, DC 45, 436 litros) com curva de refrigeração de 5°C/min. Após 4 horas de refrigeração a 5°C o sêmen foi retirado das palhetas e armazenado em tubo eppendorf de 1,5 ml por 5 minutos em banho maria a 34°C. Após esse período foi realizado as análises pelo CASA e integridade de membrana plasmática por fluorescência.

A análise espermática computadorizada foi realizada pelo sistema CASA em dois momentos, com o sêmen *in natura* após a diluição e com sêmen após refrigeração. Uma alíquota de 10µL foi colocada na câmara de Makler (SEFI Medical Instruments Ltda<sup>®</sup>, Haifa, Israel), previamente aquecida



**10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC2016**  
**02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-135-6**

(38°C), e inserida no aparelho IVOS (Versão 14, Hamilton-Thorne Bioscience®, Beverly, USA). As variáveis da cinética espermática analisadas foram: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), células com velocidade rápida (RAP, %), velocidade do trajeto (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade progressiva (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade curvilínea (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), amplitude lateral da cabeça (ALH,  $\mu\text{m}$ ), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

Para a avaliação de integridade de membrana plasmática e acrossomal foi utilizado uma fluorescência constituída através de associações de sondas fluorescentes (solução mãe) 70 $\mu\text{L}$  de iodeto de propídio, 20 $\mu\text{L}$  diacetato 6-carboxifluoresceína, 20 $\mu\text{L}$  formol salino, 1 ml de PBS). Em um microtubo de 1,5 mL será colocado uma alíquota de 50 $\mu\text{L}$  da solução mãe, 25 $\mu\text{L}$  PBS e 30 $\mu\text{L}$  da amostra seminal, homogeneizados e incubados por 8 minutos a 37°C ao abrigo da luz. Previamente às avaliações foram feitas sob lâmina e lamínula em microscopia de epifluorescência (Nikon®, Eclipse Ni-U, Tóquio, Japão) através do filtro fluorescente com excitação de 540–525 nm e emissão de 605–655 nm. Para cada amostra foram avaliados 200 espermatozóides (aumento de 400X) permitindo a identificação de espermatozóides com membrana plasmática e acrossomal lesadas (MPAL) e membrana plasmática e acrossomal integras (MPAI).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, totalizando 5 tratamentos. As análises foram feitas no PROC GLM (SAS Inst., Inc., Cary, USA) ajustando um modelo com o efeito fixo de tratamento e os efeitos aleatórios de touro e resíduo. As médias foram comparadas pelo teste de t de Student e diferença estatística foi declarada quando  $P < 0,05$ .

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O sêmen diluído fresco apresentou melhor resultado em todas variáveis avaliadas pelo CASA (MT, MP, VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN e RAP) em relação aos cinco sistemas de refrigeração avaliados após 4 horas de estabilização a uma temperatura de 5°C (Tabela 1).

A curva de refrigeração do sêmen é uma das principais etapas no processo de congelamento. A refrigeração do sêmen diluído parte de temperaturas ambientes para temperaturas em torno de 5°C, e este período é muito importante para o sêmen reduzir seu metabolismo (Mazur, 1984). Essa diminuição no metabolismo celular faz o sêmen diminuir vários parâmetros de cinética espermática antes do seu congelamento. Isto pode ser observado no presente estudo, as variáveis MT, MP, VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN e RAP apresentaram resultados inferiores nos cinco sistemas de refrigeração comparando com a avaliação inicial no sêmen fresco diluído.



**10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC2016**  
**02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-135-6**

No presente estudo foram avaliados cinco sistemas de refrigeração, sendo que dois sistemas (R1 e R2) apresentam curva de refrigeração lenta, um sistema com curva de refrigeração intermediária (R4) e dois sistemas com curva de refrigeração rápida (R3 e R5). Quando os espermatozóides passam por queda lenta da temperatura no processo de refrigeração, grande quantidade de água sai do interior das células espermáticas. Por outro lado, queda da temperatura muito rápida não permitiu a saída de água para fora da célula, o que pode ocasionar formação de cristais de gelo dentro da célula levando à morte celular. Boa taxa de refrigeração permite que a água saia da célula espermática, mas não em excesso, e que alguns cristais sejam formados sem causar danos às células espermáticas (Graham, 1995).

Na rápida refrigeração, os espermatozóides submetidos à variação brusca de temperatura, principalmente entre 30 e 0°C, sofrem perda prematura da motilidade, redução da produção de energia, aumento da permeabilidade da membrana e perda de íons e moléculas intracelulares, induzindo ao choque térmico (Watson, 2000; Medeiros et al., 2002, Leite et al., 2010). No presente estudo não foram observadas diferenças nas variáveis MT, MP, VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN e RAP entre os cinco sistemas de refrigeração após 4 horas de refrigeração a uma temperatura de 5°C. Com isso não foi relatado diferença entre as curvas consideradas lentas (0,25°C/min e 0,5°C/min) com as consideradas intermediária (R4) e rápidas (R3 e R5) nestas variáveis. Entretanto quando foi avaliada integridade de membrana plasmática e acrossomal, a curva de refrigeração mais lenta (R1; 0,25°C/min) apresentou melhor resultado comparando com a curva de refrigeração mais rápida (R5; 5°C/min), tanto para MPAL (R1: 61,4% vs R5: 67,7%) quanto para MPAL (R1: 38,6% vs R5: 32,3%) (Tabela 1). Não foram observadas diferenças para integridade de membrana plasmática e acrossomal entre os demais sistemas de refrigeração. A maior quantidade de membrana e acrossoma lesado e menor quantidade de íntegros no sistema de refrigeração R5 (refrigerador comum) provavelmente se deve a oscilação da temperatura dentro do refrigerador doméstico comum, ao contrário do que acontece com a refrigeradora minitube que apesar de apresentar uma curva de refrigeração rápida e semelhante ao refrigerador comum, a oscilação de temperatura não ocorre mantendo a temperatura de estabilização de 5°C constante durante todo o período.



**Tabela 1.** Média ( $\pm$  desvio-padrão) da MT, MP, parâmetros da cinética espermática (VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, LIN e RAP) e porcentagem de MPAL e MPAL no sêmen fresco (R0) e nos cinco sistemas de refrigeração (R1, R2, R3, R4 e R5).

Variáveis	Sistemas de refrigeração						EPM	P-value
	R0	R1	R2	R3	R4	R5		
MT (%)	81,4 <sup>a</sup>	59,4 <sup>b</sup>	61,8 <sup>b</sup>	66,1 <sup>b</sup>	61,5 <sup>b</sup>	66,9 <sup>b</sup>	8,1	0,0020
MP (%)	65,1 <sup>a</sup>	48,5 <sup>b</sup>	50,3 <sup>b</sup>	54,1 <sup>b</sup>	49,8 <sup>b</sup>	55,1 <sup>b</sup>	6,4	0,0114
VAP( $\mu$ m/s)	93,2 <sup>a</sup>	71,8 <sup>b</sup>	74,1 <sup>b</sup>	76,7 <sup>b</sup>	73,8 <sup>b</sup>	76,8 <sup>b</sup>	6,1	0,0004
VSL( $\mu$ m/s)	78,5 <sup>a</sup>	61,7 <sup>b</sup>	63,9 <sup>b</sup>	65,5 <sup>b</sup>	63,0 <sup>b</sup>	66,1 <sup>b</sup>	4,5	0,0006
VCL ( $\mu$ m/s)	139,5 <sup>a</sup>	107,1 <sup>b</sup>	110,7 <sup>b</sup>	114,6 <sup>b</sup>	110,1 <sup>b</sup>	114,1 <sup>b</sup>	15,3	0,0033
ALH ( $\mu$ m/s)	5,8 <sup>a</sup>	4,8 <sup>b</sup>	4,9 <sup>b</sup>	5,0 <sup>b</sup>	4,8 <sup>b</sup>	5,0 <sup>b</sup>	0,5	0,0390
BCF (Hz)	25,8 <sup>a</sup>	23,3 <sup>a</sup>	24,8 <sup>a</sup>	23,3 <sup>a</sup>	23,4 <sup>a</sup>	23,1 <sup>a</sup>	3,4	0,3929
STR (%)	82,1 <sup>a</sup>	80,5 <sup>a</sup>	84,5 <sup>a</sup>	80,0 <sup>a</sup>	80,1 <sup>a</sup>	80,5 <sup>a</sup>	4,5	0,8014
LIN (%)	59,5 <sup>a</sup>	58,0 <sup>a</sup>	60,7 <sup>a</sup>	57,6 <sup>a</sup>	57,8 <sup>a</sup>	57,9 <sup>a</sup>	6,5	0,8184
RAP (%)	79,0 <sup>a</sup>	55,7 <sup>b</sup>	57,6 <sup>b</sup>	62,4 <sup>b</sup>	58,0 <sup>b</sup>	62,6 <sup>b</sup>	8,5	0,0010
MPAL (%)	58,2 <sup>c</sup>	61,4 <sup>bc</sup>	63,5 <sup>abc</sup>	66,9 <sup>ab</sup>	64,8 <sup>ab</sup>	67,7 <sup>a</sup>	3,3	0,0251
MPAI (%)	41,8 <sup>a</sup>	38,6 <sup>ab</sup>	36,5 <sup>abc</sup>	33,1 <sup>bc</sup>	35,2 <sup>bc</sup>	32,3 <sup>c</sup>	3,3	0,0257

MT: 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; STR: Retilinearidade; LIN: Linearidade; RAP: Velocidade Rápida, MPAL: membrana plasmática e acrossomal lesada e MPAI: membrana plasmática e acrossomal íntegra. R1: TK 4000<sup>®</sup>, curva de 0,25<sup>o</sup>/min; R2: (TK 4000<sup>®</sup>, curva de 0,5<sup>o</sup>/min); R3; refrigeradora Minitube; R4: BotuTainer<sup>®</sup> e R5: refrigerador doméstico comum. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05).

#### 4 CONCLUSÃO

Não foi observado diferenças na motilidade total, motilidade progressiva e nos parâmetros da cinética espermática (VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, LIN e RAP) nos cinco diferentes sistemas de refrigeração avaliados após 4 horas de estabilização a 5<sup>o</sup>C. O sistema de refrigeração com curva de 0,25<sup>o</sup>C/min preservou melhor a membrana plasmática e acrossomal dos espermatozoides em relação ao refrigerador doméstico comum.



## **5 AGRADecIMENTOS**

Ao CNPQ (PIBIC) pela bolsa concedida e a FAPESP pelo apoio financeiro (Processo 2014/11304-3).

## **6 REFERÊNCIAS**

GRAHAM, J.K. Response of spermatozoa to freezing. In: Techniques for handling and utilization of transported cooled and frozen equine spermatozoa. Proceedings. **Colorado State University Fort Collins**, p.83-95, 1995.

LEITE, T.G.; VALE FILHO, V.R.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; EMERICK, L.L.; ZAFFALON, F.G.; MARTINS, J.A.M.; ANDRADE, V.J. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, v.120, p.31-38, 2010.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Physiological Society**, p. 125-142, 1984.

MEDEIROS, C.M.O., FORELL, F., OLIVEIRA, A.T.D., RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, p.327-344, 2002.

MOCÉ, E.; BLANCH, E.; TOMÁS, C.; GRAHAM, J.K. 2010. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: Present moment and perspectives to future. **Reproduction Domestic Animal**, v.45, p.57-66, 2010.

SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.77-111, 2000.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.23-53, 2000.

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