

## Efeito de diferentes diluidores e métodos de lavagem sobre a motilidade do espermatozoide caprino pós-descongelamento<sup>1</sup>

### Effect of different extenders and washing methods on the motility of the goat sperm post thawing

Claudio Avelino de Oliveira Lucena<sup>2</sup>, Marciane da Silva Maia<sup>3\*</sup>, Carlos Eduardo Bezerra de Moura<sup>4</sup>, George Lucas da Rocha Gurgel<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Parte do trabalho de conclusão de curso do primeiro autor

<sup>2</sup> Graduando em Zootecnia, UFRN, Natal -RN. E-mail: [claudioavelinozoo@gmail.com](mailto:claudioavelinozoo@gmail.com)

<sup>3</sup> Pesquisadora, Embrapa Semiárido/EMPARN, Natal-RN. E-mail: [marciane.maia@embrapa.br](mailto:marciane.maia@embrapa.br)

<sup>4</sup> Prof. Adjunto, Dep. de Ciências Animais, UFRSA, Mossoró– RN. E-mail: [carlos.moura@ufersa.edu.br](mailto:carlos.moura@ufersa.edu.br)

<sup>5</sup> Zootecnista, Autônomo, Natal-RN. E-mail: [george\\_lucas17@hotmail.com](mailto:george_lucas17@hotmail.com)

**Resumo:** O objectivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do método de remoção do plasma seminal antes da criopreservação, sobre os parâmetros espermáticos do sêmen caprino pós-descongelamento. Utilizou-se como doador, um bode da raça Alpina Americana. Dois ejaculados consecutivos foram coletados formando uma *pool* que em seguida era dividido em quatro partes iguais. As amostras foram diluídas a 37 ° C com solução de lavagem, e em seguida dois tubos foram centrifugados e os outros dois filtrados (*Sperm Filter*) para remover o plasma seminal (PS). Após a remoção do PS, duas partes foram diluídas com um diluidor à base de TRIS-Gema e as duas partes restantes com um diluidor à base de leite desnatado. O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,25 mL, congelado em sistema automatizado e armazenado em nitrogênio líquido até as avaliações. A motilidade espermática foi significativamente maior ( $P < 0,03$ ) nas amostras centrifugadas do que nas amostras filtradas, independente do tipo de diluidor utilizado. O percentual de espermatozoides viáveis foi maior nas amostras centrifugadas, exceto quando se utilizou o diluidor a base de TRIS- Gema, que não apresentou diferença nessa característica entre os métodos de remoção do plasma seminal. Ambos os métodos avaliados podem ser utilizada na remoção do PS caprino quando se utiliza diluidor a base de TRIS-Gema. Para o diluidor á base de leite desnatado a centrifugação deve ser o método de eleição.

**Palavras-chave:** caprino, criopreservação, filtro espermático, plasma seminal, sêmen

**Abstract:** The objective of this study was to evaluate the effects of seminal plasma removal method prior to cryopreservation on sperm parameters of post-thaw goat semen. It was used as a donor, a goat of the American Alpine breed. Two consecutive ejaculates were collected forming a pool that was then *split* into four equal parts. The samples were diluted at 37 °C with washing solution, and then two tubes were centrifuged and the other two filtrates (*Sperm Filter*) to remove seminal plasma (PS). After removal of the PS two portions were diluted with a TRIS-based extender and the two remaining parts with a extender based to the skimmed milk. The diluted semen was packaged in 0.25 mL straws, frozen in automatic machine and stored in liquid nitrogen until the evaluations. Sperm motility was significantly higher ( $P < 0.03$ ) in the centrifuged samples than in filtered samples, regardless of the type of extender used. The percentage of sperm viable was higher in the centrifuged samples, except when using the extender the base TRIS, which showed no difference in this parameter between the methods of removal of seminal plasma. Both tested methods can be used to remove the PS goat when using extender TRIS-yolk base. For skim milk-based extender the centrifugation should be the method of choice.

**Keywords:** cryopreservation, goat, semen, seminal plasma, sperm filter

### Introdução

O principal problema para a preservação do sêmen caprino são os componentes do plasma seminal, que prejudicam a viabilidade dos espermatozoides armazenados em meios que contenham leite ou gema de ovo (Maia, 2014). Como consequência, o plasma seminal tem de ser removida antes de utilizar diluentes que contenham esses ingredientes. Normalmente isso é feito por meio de centrifugação, no entanto, o processo é demorado e pode acarretar danos mecânicos ao espermatozoide (Sariözkan et al., 2010). Recentemente, Alvarenga et al. (2010) propuseram um novo método para a remoção do plasma seminal do sêmen de

ganhão, usando um filtro de membrana sintética hidrófila (*Sperm Filter*, BotuPharma, Botucatu, São Paulo, Brasil). O objetivo deste estudo foi comparar o efeito da centrifugação x *Sperm Filter* sobre a motilidade e viabilidade do espermatozoide caprino criopreservado.

#### Material e Métodos

Os ejaculados foram colhidos de um bode da raça Alpina Americana (n=8). Dois ejaculados consecutivos foram combinados e após avaliação, divididos em quatro partes iguais. As frações foram diluídas a 37°C com solução de lavagem (1:9) e em seguida dois tubos foram centrifugados (2 x 600 x g) e os outros dois foram filtrados para remover o plasma seminal (PS). Após a remoção do PS, as amostras foram diluídas para uma concentração de  $400 \times 10^6$  spz/ml, com um diluidor à base de Tris-glicose-gema (Tris-hidroximetil-aminometano 4,5375 g; ácido cítrico monohidratado 2,6057g; glicose anidra 0,7495 g; gentamicina 13,4 mg; gema de ovo 10% (v/v), Orvus es paste 0,5% (v/v); água destilada para 100 ml e glicerol 10 % (v/v) no meio II, pH 6,8) ou com o diluidor a base de leite desnatado-glicosado (Leite em pó desnatado 10g; glicose anidra 0,194g; gentamicina 20 mg; água destilada p/ 100ml, glicerol 7% (v/v) no meio II, pH 6,5), compondo os tratamentos: T1- Centrifugação + Leite; T2- centrifugação + TRIS; T3- Filtro + Leite; T4- Filtro + TRIS. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,25mL, lacradas com álcool polivinílico e então congelado em sistema automatizado, modelo Tetakon® -TK 3000 (TK Tecnologia em Congelação Ltda). As palhetas foram armazenadas em botijão criobiológico e antes das avaliações foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Os dados foram submetidos à ANOVA com comparação de médias pelo teste de Duncan a  $P < 0,05$ .

#### Resultados e Discussão

O método de remoção do PS teve um efeito significativo sobre os parâmetros espermáticos. A motilidade espermática pós-descongelação foi significativamente maior ( $P < 0,03$ ) nas amostras centrifugadas comparada às filtradas. Da mesma forma, o percentual de perda da motilidade após a criopreservação (TDM) foi significativamente ( $P < 0,02$ ) menor nas amostras centrifugadas. O percentual de espermatozoides vivos também foi maior nas amostras centrifugadas, exceto para o diluidor TRIS, cujos valores foram semelhantes, independente do método de remoção do PS (Tabela 1). Ramires Neto et al. (2013) avaliaram o efeito do método de remoção do plasma seminal (Filtro x Centrífuga) no sêmen equino criopreservado em meio a base de leite desnatado e não observaram diferença entre os métodos sobre os parâmetros da cinética espermática. Contrastando com essa informação, em no nosso estudo, nas amostras congeladas em meio à base de leite desnatado, houve uma queda significativa na motilidade espermática e no percentual de células viáveis quando o filtro foi usado para remover o plasma seminal. Possivelmente, resíduos de proteínas seminais podem ter permanecido na amostra e reagido com os componentes do diluidor, afetando particularmente, as amostras diluídas em leite desnatado. Estudos mais aprofundados precisam ser realizados para confirmar ou não esta hipótese.

Tabela 2. Médias  $\pm$  desvio padrão dos parâmetros espermáticos no sêmen caprino criopreservado em diferentes diluidores e métodos de processamento.

Parâmetro	CENTRIFUGA		FILTRO		P
	LEITE (T1)	TRIS (T2)	LEITE (T3)	TRIS (T4)	
MOT (%)	55,6 $\pm$ 18,4 <sup>a</sup>	55,0 $\pm$ 9,6 <sup>a</sup>	38,1 $\pm$ 6,5 <sup>b</sup>	42,5 $\pm$ 14,1 <sup>ab</sup>	0,0229
VIVOS (%)*	58,0 $\pm$ 17,4 <sup>a</sup>	72,9 $\pm$ 8,7 <sup>a</sup>	42,1 $\pm$ 16,0 <sup>b</sup>	61,0 $\pm$ 11,8 <sup>a</sup>	0,0016
TDM (%)	31,5 $\pm$ 19,5 <sup>b</sup>	31,0 $\pm$ 13,3 <sup>b</sup>	51,7 $\pm$ 11,8 <sup>a</sup>	45,2 $\pm$ 24,3 <sup>a</sup>	0,0216

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste Duncan. MOT = motilidade subjetiva; TDM = taxa de degradação da motilidade; \* = coloração vital

### Conclusões

Pode-se afirmar que o protocolo de centrifugação utilizado (600xg / 10min) não danifica a célula e não afeta a sua motilidade. Além disso, tanto a centrifugação quanto a filtragem do sêmen para remover o plasma seminal antes da criopreservação são eficazes quando se utiliza diluidor à base de Tris-glicose-gema. Já para o diluidor à base de leite desnatado o melhor método de remoção do PS é a centrifugação.

### Literatura citada

ALVARENGA MA, MELO CM, MAGALHÃES LCO, PAPA FO. A new method to concentrate equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 121S, p.186–7. 2010.

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

MAIA, M. da S. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial em caprinos. In: CONGRESSO NORTE NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CONERA), 7, 2014, Mossoró. **Acta Veterinaria Brasílica**. Mossoró: UFERSA, 2014. v.8 (Supl. 2), p. 389-395.

S. SARIÖZKAN, M.N. BUCAK, P.B. TUNCER, U. TAŞDEMİR, H. KINET, P.A. ULUTAS. Effects of different extenders and centrifugation/washing on postthaw microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of Angora buck sperm. **Theriogenology**, v. 73, p. 316–323, 2010.