

Avaliação da qualidade do sêmen bovino criopreservado com diluidores de origem animal e vegetal

Evaluation of the quality of cryopreserved bovine semen with diluents of animal and vegetal origin

DOI:10.34117/bjdv8n10-091

Recebimento dos originais: 05/09/2022

Aceitação para publicação: 06/10/2022

Vitor Hugo Alves Ribeiro

Graduando em Medicina Veterinária

Instituição: Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Xinguara

Endereço: Rua Alberto Santos Dumont, S/N, Jardim Universitário, CEP: 68557-335, Xinguara – PA

E-mail: vitorhugo@unifesspa.edu.br

Beatriz Vanderlei Ribeiro

Graduanda em Medicina Veterinária

Instituição: Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Xinguara

Endereço: Rua Alberto Santos Dumont, S/N, Jardim Universitário, CEP: 68557-335, Xinguara – PA

E-mail: byaribeiroo@unifesspa.edu.br

Cleidson Manoel Gomes da Silva

Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade de Brasília

Instituição: Embrapa Cerrados, Planaltina, DF

Endereço: Rua Alberto Santos Dumont, S/N, Jardim Universitário, CEP: 68557-335, Xinguara – PA

E-mail: cleidson@unifesspa.edu.br

Carlos Frederico Martins

Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Estadual do Ceará

Instituição: Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Xinguara, Pará, Brasil.

Endereço: BR 020, Km 18, Rodovia Brasília Fortaleza, Zona Rural, Planaltina – DF

E-mail: carlos.martins@embrapa.br

Cátia Oliveira Guimarães Abud

Mestre em Ciência Animal pela Universidade Federal de Goiás.

Instituição: Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Xinguara, Pará, Brasil.

Endereço: Rua Alberto Santos Dumont, S/N, Jardim Universitário, CEP: 68557-335, Xinguara – PA

E-mail: catia.abud@unifesspa.edu.br

Lucas Jacomini Abud

Doutor em Ciência Animal pela Universidade Federal de Goiás.

Instituição: Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Xinguara, Pará, Brasil.

Endereço: Rua Alberto Santos Dumont, S/N, Jardim Universitário, CEP: 68557-335,

Xinguara – PA

E-mail: lucas.abud@unifesspa.edu.br

RESUMO

A comercialização de sêmen bovino criopreservado é realizada em larga escala mundialmente. Entretanto, a utilização de diluidores com produtos de origem animal tem limitado a exportação de sêmen para outros países devido a possíveis riscos sanitários. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da substituição de diluidores contendo componentes de origem de animal por diluidor à base de lecitina de soja na criopreservação de sêmen bovino. O sêmen foi coletado por eletroejaculação a partir de seis touros Nelore com fertilidade comprovada. Após determinação da concentração espermática, as amostras de sêmen foram adicionadas em diferentes diluidores: diluidor comercial (Controle), à base de gema de ovo (TRIS-gema) e lecitina de soja (LS). Após o descongelamento, a cinética espermática foi avaliada pelo sistema CASA e a integridade de membrana citoplasmática e acrossomal foram avaliadas por epifluorescência. Não foi observada diferença significativa entre os diluidores TRIS-gema e LS para todos os parâmetros de cinética espermática avaliados ($P>0,05$). A avaliação de integridade de membrana e acrossoma após o descongelamento revelou taxas de viabilidade espermática significativamente superior ($P<0,05$) ao utilizar o diluidor comercial ($30,80\pm 10,0$). No entanto, não foi observada diferença significativa ($P>0,05$) entre os diluidores contendo TRIS-gema ($18,00\pm 7,1$) e LS ($14,60\pm 6,5$). Em conclusão, a criopreservação de sêmen bovino com diluidor à base de LS apresentou ação crioprotetora similar ao diluidor convencional TRIS-gema. Portanto, a lecitina de soja é uma alternativa que pode ser utilizada com sucesso na criopreservação de sêmen bovino.

Palavras-chave: touro, crioprotetor, lecitina de soja, Nelore, TRIS-gema de ovo.

ABSTRACT

The commercialization of cryopreserved bovine semen is performed on a large scale worldwide. However, the use of diluents containing animal origin products has limited the export of semen to other countries due to possible sanitary risks. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of replacing diluents containing animal components by soy lecithin-based diluents in the cryopreservation of bovine semen. Semen was collected by electroejaculation from six Nelore bulls with proven fertility. After determining the sperm concentration, the semen samples were added in different diluents: commercial diluent (Control), egg yolk based (TRIS-gema) and soy lecithin (LS). After thawing, sperm kinetics were evaluated by the CASA system and cytoplasmic and acrosomal membrane integrity were assessed by epifluorescence. No significant difference was observed between TRIS-gema and LS diluents for all sperm kinetics parameters evaluated ($P>0.05$). Evaluation of membrane and acrosome integrity after thawing revealed significantly higher sperm viability rates ($P<0.05$) when using the commercial diluent (30.80 ± 10.0). However, no significant difference ($P>0.05$) was observed between diluents containing TRIS-gem (18.00 ± 7.1) and LS (14.60 ± 6.5). In conclusion, cryopreservation of bovine semen with LS-based diluent showed similar cryoprotective action to conventional TRIS-gem diluent. Therefore, soy lecithin is an alternative that can be successfully used in cryopreservation of bovine semen.

Keywords: bull, cryoprotectant, soy lecithin, Nelore, TRIS-egg yolk.

1 INTRODUÇÃO

A comercialização de sêmen bovino criopreservado vem crescendo nos últimos anos, principalmente em decorrência da exportação e da utilização da IATF. Assim, é de grande importância estudos de agentes crioprotetores que atuem na preservação da célula de forma eficiente para se obter melhores resultados, com aumento das taxas de fertilização, redução dos custos para o produtor e por fim, um incremento na rentabilidade da pecuária bovina (LEMMA., 2011).

As taxas de fertilização são afetadas pelo processo de criopreservação dos espermatozoides, pois há danos nas células, que podem resultar em um significativo decréscimo da motilidade e integridade das membranas espermática (CELEGHINI et al., 2017). Os crioprotetores adicionados aos diluentes tem um papel fundamental na sobrevivência espermática no processo de congelamento e descongelamento, uma vez que o plasma seminal não consegue proteger adequadamente as células contra mudanças de temperatura. A gema de ovo é um agente crioprotetor efetivo e é recomendado pela excelente proteção dos espermatozoides. Entretanto, o uso de compostos de origem animal possibilita a transmissão de doenças, o que restringe a comercialização de sêmen para alguns países. Assim, a utilização de um diluidor bem definido, com ausência desses compostos, apresentaria uma valiosa contribuição para a indústria de tecnologia de sêmen.

Diversos produtos de origem vegetal têm sido adicionados em diluidores de sêmen visando testar seu possível efeito crioprotetor (BITTENCOURT et al., 2013; CAVALCANTE et al., 2014; CÂMARA et al., 2018; SOUSA et al., 2020.). Dentre esses produtos, destaca-se a lecitina de soja, um subproduto resultante da extração do óleo de soja, que possui em sua composição química fosfolípidos, triglicerídeos e glicolípidos além de carboidratos e carotenoides (SCHUCK, 2004). Entretanto, sua principal característica química é o poder emulsificante (SOARES, 2004). Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da substituição de diluidores contendo componentes de origem de animal por diluidor à base de lecitina de soja na criopreservação de sêmen bovino.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Seis touros adultos da raça Nelore, com idade entre três a cinco anos, foram selecionados por exame andrológico. Durante o experimento coletou-se por eletroejaculação um touro por dia. Após a colheita, o sêmen foi imediatamente levado ao laboratório, determinado o volume do ejaculado em tubo graduado, mantendo-o em banho-maria a 37°C até seu processamento final. A motilidade e o vigor foram analisados subjetivamente, em microscópio de contraste de fase (Nikon Biophot) com aumentos de 100 e 400x. Atribuiu-se a motilidade valores de 0-100%. O vigor foi classificado em uma escala de 0-5, sendo o escore 1 o mais lento e o escore 5 correspondendo ao mais rápido movimento. A concentração foi avaliada coletando-se uma amostra do sêmen e diluindo-a na proporção 1:200, em solução de formol-salina tamponada. A contagem espermática foi realizada em câmara de Neubauer em microscópio de contraste de fase com aumento de 400x. Para a avaliação da morfologia espermática uma alíquota de sêmen foi diluída em solução formol-salina tamponada, previamente aquecida (37°C), para fixação e posterior avaliação.

Amostras de sêmen foram adicionadas em diferentes diluidores visando avaliar a qualidade espermática após criopreservação. Três diluidores, com glicerol, foram testados: diluidor comercial (Controle), à base de gema de ovo (TRIS-gema) e lecitina de soja (LS). Após adição do sêmen em cada diluidor, foi realizado o envase em palhetas de 0,5ml, com concentração espermática final de 20×10^6 de espermatozoides por palheta. Após o envase as palhetas foram resfriadas e congeladas utilizando um sistema programável de criopreservação de sêmen portátil (modelo TK-3000). Inicialmente, as palhetas foram alocadas em porta-palhetas, o qual foi adicionado ao tubo de resfriamento, permanecendo até alcançar 5°C. O equipamento de congelação foi programado para realizar o resfriamento a partir da temperatura ambiente, seguindo uma curva de resfriamento de 0,25°C/min. até 5°C, com duração em torno de 1h e 30 min. e com tempo de equilíbrio de 2 horas. Ao final do tempo de equilíbrio, o porta-palhetas foi removido para a caixa térmica contendo nitrogênio líquido (nível de 7 cm), na qual realizou-se a curva de congelação com uma taxa de -20°C/min. de 5°C até -120°C. Após atingir a temperatura de -120°C, as palhetas foram removidas do porta-palhetas e imersas em nitrogênio líquido. Por fim, as palhetas foram acondicionadas em “racks” e então armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C).

Após a criopreservação foram avaliadas a cinética de movimento pelo sistema computadorizado (CASA), e a integridade das membranas plasmática e acrossomal por

microscopia de epifluorescência (AxiophotZeiss). A análise computadorizada da motilidade (CASA) foi realizada nas amostras após o descongelamento em banho maria a 37°C/ 30 segundos. Em seguida, o material foi transferido para um microtubo de 1,5 ml que foi mantido na mesma temperatura para posteriores avaliações. Retirou-se 2µL da amostra que foi colocada na lâmina de leitura (Makler) previamente aquecida a 37°C. Utilizou-se o aparelho modelo Ivos-Ultimate 12 da Hamilton Thorne Biosciences, previamente ajustado para análise de sêmen bovino. As características de movimento espermático analisadas foram: Motilidade Total (MT, %), Motilidade progressiva (MP, %), velocidade do trajeto (VAP µm/s), velocidade progressiva (VSL µm/s), velocidade curvilínea (VCL µm/s), deslocamento lateral da cabeça (ALH µm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

Para avaliação da integridade da membrana plasmática utilizou-se o diacetato de 6-carboxifluoresceína (C-FDA) e iodeto de Propídio (IP) conforme descrição de HARRISON & VICKERS (1990). Uma amostra de sêmen (10µl) foi adicionada a 40 µl de solução de corante e incubadas por 10 minutos em microtubos protegidos da luz. Uma alíquota de 7 µl de solução corante com o sêmen foi adicionada sobre lâmina e coberta por uma lamínula e observada em microscópio de epifluorescência (AxiophotZeiss: filtro com comprimento de onda de 395/420 nm de excitação/emissão). Foram contadas 200 células espermáticas, sendo classificadas de acordo com a coloração das células em: Membrana íntegra (coloração verde) e membrana danificada (as células com coloração vermelha, bem como as que se apresentaram coradas em verde e vermelho).

Para avaliação da integridade do acrossoma utilizou-se uma conjugação de isotiocianato de Fluoresceína – FITC (sonda fluorescente) com lecitina de amendoim (peanutaglutinin – PNA) e IP, como descrito por KLINC & RATH (2007). Amostra de sêmen (10µL) foi diluída em uma solução de corante (30 µL) e incubada por 10 minutos. Uma alíquota de 7 µl de solução corante com o sêmen foi colocada em uma lâmina e coberta por uma lamínula e observada em microscópio de epifluorescência (AxiophotZeiss: filtro com comprimento de onda de 494/517 nm de excitação/emissão). Foram contadas 200 células espermáticas, sendo classificados em duas categorias: espermatozoides inviáveis (morto com acrossoma íntegro - coloração vermelha na cabeça e ausência de coloração no acrossoma; morto com acrossoma reagido - coloração vermelha na cabeça e verde na região acrossomal); vivo com acrossoma reagido - ausência de coloração na cabeça e presença de coloração verde na região acrossomal) e

espermatozoides viáveis (vivo com acrossoma íntegro - ausência de coloração na cabeça e acrossoma).

Os dados foram analisados em delineamento de blocos ao acaso, com três tratamentos e cinco blocos (bovinos). A análise estatística foi realizada utilizando o programa Bio Estat versão 5.0. O efeito dos tratamentos sobre os parâmetros de motilidade espermática, integridade de membranas plasmática e acrossomal foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias pelo teste de Tukey com nível de significância $p>0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das avaliações realizadas pelo sistema CASA estão apresentados na Tabela 1. Não houve efeito do diluidor ($p>0,05$) sobre os parâmetros de motilidade total, motilidade progressiva, velocidade do trajeto, velocidade curvilínea, deslocamento lateral da cabeça, frequência de batimento e retilinearidade. No entanto, a velocidade progressiva de espermatozoides criopreservados utilizando diluidor à base de TRIS-gema ($50,98\pm 7,2$) foi inferior ($p<0,05$) em comparação ao diluidor comercial ($64,50\pm 7,1$), porém similar em relação ao diluidor à base de LS ($53,98\pm 4,5$). Além disso, foi verificado que a linearidade de espermatozoides criopreservados com LS ($41,20\pm 5,0$) foi inferior ($p<0,05$) em comparação ao diluidor comercial ($53,40\pm 8,1$), porém não diferiu do diluidor à base de TRIS-gema ($45,00\pm 6,4$). Estes achados demonstram que a adição de LS no diluidor de sêmen bovino apresentou efeito similar sobre a cinética espermática em comparação ao diluidor contendo TRIS-gema, bem como ao diluidor comercial para a maioria dos parâmetros avaliados. Resultados similares tem sido relatados em estudos prévios comparando diluidores de origem animal e vegetal (CAVALCANTE et al. 2014; MURPHY et al., 2018; ADEYANJU et al., 2018).

Tabela 1. Avaliação da cinética espermática de sêmen bovino criopreservado com diluidor comercial, TRIS-gema e Lecitina de soja (LS).

Variável	DILUIDOR		
	Comercial	TRIS-gema	LS
MT (%)	61,40±17,10 ^a	53,80±1,79 ^a	52,60±18,58 ^a
MP (%)	40,60±15,39 ^a	24,80±15,39 ^a	25,20±9,20 ^a
VAP (µm/s)	73,48±5,83 ^a	67,36±8,89 ^a	71,40±6,99 ^a
VSL (µm/s)	64,50±7,10 ^a	50,98±7,23 ^b	53,98±4,51 ^{ab}
VCL (µm/s)	127,32±17,31 ^a	121,28±15,48 ^a	134,86±19,37 ^a
ALH (µm)	5,38±1,26 ^a	5,96±0,72 ^a	6,36±1,02 ^a
BCF (Hz)	33,04±6,81 ^a	26,12±3,77 ^a	30,18±5,45 ^a
STR (%)	84,00±5,66 ^a	77,20±6,50 ^a	75,20±4,97 ^a
LIN (%)	53,40±8,14 ^a	45,00±6,44 ^{ab}	41,20±5,07 ^b

Letras diferentes na mesma linha indica diferença significativa (p<0,05).

MT = motilidade total; MP = motilidade progressiva; VAP = velocidade do trajeto; VSL = velocidade progressiva; VCL = velocidade curvilínea; ALH = deslocamento lateral da cabeça; BCF = frequência de batimento; SRT = retilinearidade; LIN = linearidade

Os resultados da integridade de membrana plasmática e integridade do acrossoma dos espermatozoides marcados pela técnica de microscopia de epifluorescência estão apresentados na Tabela 2. Após o descongelamento, a taxas de viabilidade espermática foi significativamente superior (p<0,05) ao utilizar o diluidor comercial (30,80±10,0). No entanto, não foi observada diferença significativa (P>0,05) entre os diluidores contendo TRIS-gema (18,00±7,1) e LS (14,60±6,5). Estes resultados indicam que o diluidor comercial ofereceu melhor proteção contra possíveis danos inerentes ao processo de criopreservação espermática em relação ao TRIS-gema e LS. Resultados semelhantes foram descritos previamente por (ADEYANJU, et al., 2018). Possivelmente, a integridade da membrana plasmática e acrossomal foi melhor preservada no diluidor comercial por conter maior concentração de componentes químicos benéficos à estabilização das membranas espermática. Portanto, ainda existe a necessidade de adequação da concentração ou proporção de compostos de origem vegetal na preparação de diluentes a fim de conferir proteção na membrana espermática durante o processo de criopreservação. Acredita-se que a facilidade de armazenamento da matéria prima de origem vegetal poderá facilitar a padronização de diluidores de sêmen e eliminar possíveis riscos de transmissão de patógenos.

Tabela 2 - Avaliação da integridade de membrana e acrossoma de espermatozoides bovinos após o descongelamento.

Parâmetro	DILUIDOR		
	Comercial	TRIS-gema	LS
Viabilidade	30,80±10,08 ^a	18,00±7,14 ^{ab}	14,60±6,58 ^b

LS: Lecitina de Soja. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05).

4 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados no presente estudo demonstraram que o diluidor à base de LS apresentou ação crioprotetora para espermatozoides bovino similar ao diluidor convencional TRIS-gema. Entretanto há necessidade de futuros estudos visando otimizar a concentração ou proporção desta base de origem vegetal na preparação de diluidores.

REFERÊNCIAS

- A. LEMMA, Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility, Artificial Insemination in Farm Animals, 2011.
- C. F. A. FARIAS, A. L. P. TORK, A. S. RIQUE, A. F. QUEIRÓS, S. V. SILVA, Estudo da eficácia da Aloe vera como crioprotetor vegetal na refrigeração de espermatozoides epididimários de bovinos, *Rev Bras Reprod Anim* v.43, n.3, p.787-794, jul./set. 2019.
- DR. G. SISY, W. S. EL-NATTAT, R. I. EL-SHESHTAWY, A. M. A. EL-MAATY, Substitution of egg yolk with different concentrations of soybean lecithin in tris-based extender during bulls' semen preservability, *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 2016.
- E.C.C. Celeghini¹, R.P. Arruda, S.A. Florez-Rodriguez, F.B. Santos, M.B.R. Alves, B.M.M. Oliveira, Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos, *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.40-45, jan./mar. 2017.
- E.M. MURPHY, C. O'MEAR, B. EIVERS, P. LONERGAN, S. FAIR, Comparison of plant- and egg yolk-based semen diluents on in vitro sperm kinematics and in vivo fertility of frozen-thawed bull sêmen, *Animal Reproduction Science*, 2018.
- J.M. CAVALCANTE, O.O. BRASIL, C.C.M. SALGUEIRO, C.S.B. S.VANDERLEY, J.F. NUNES, CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN OVINO EM MEIO DILUENTE À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP102c), *Cienc. anim. bras.*, Goiânia, v.15, n.3, p. 344-353, jul./set. 2014.
- M. SCHUCK. Degomagem de Óleo de Soja por Ultrafiltração. 2004. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.
- M.S. SOUSA, B. F. BRITO, L.A.R. CABRAL, N.A.B. NEGREIROS, K.S. PONTES, C. C.M. SALGUEIRO, J.F. NUNES. Criopreservação do sêmen de caprinos em diluidores alternativos e análise da viabilidade. *Brazilian Journal of Development*, Curitiba, v.6, n.8, p.56478-56485, 2020.
- M.S. SOARES. Processamento de óleo de soja utilizando ultrafiltração em miscela na etapa de degomagem e na obtenção de lecitina. 2004. 185 f. Tese (Doutorado) - Curso de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- P. KLINC, D. RATH, Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting, *Reproduction in domestic animals*, vol. 42 1 pag. 63-7, 2007.
- R.F. BITTENCOURT, E. OBA; A.L.R. FILHO; M. CHALHOUB; H.C AZEVEDO; S.D. BICUDO. Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: Diluidores e crioprotetores. *Ciência Animal Brasileira*. v.14, n.4, p.522-536, 2013
- S. O. ADEYANJU, J. O. DARAMOLA, J. A. OLANITE, O. S. AWOKOLA, Effect of sunflower lecithin on Kalahari Red goat semen during cryopreservation, *AGRICULTURA TROPICA ET SUBTROPICA*, 51/1,21-28, 2018
- T.S. CÂMARA.; T.G.P. NUNES; R. TONIOLLI. Diluentes seminais para pequenos ruminantes. *Ciência Animal*, v.28, n.2, p.67-83, 2018.