



### **Efeito do diluente na qualidade espermática após a preparação de sêmen bovino criopreservado para ser utilizado na produção in vitro de embriões**

Nayara da Fonseca Conceição<sup>1</sup>, José de Oliveira Carvalho<sup>2</sup>, Ivo Pivato<sup>3</sup>, Margot Alves Nunes Dode<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Graduanda em Medicina Veterinária - UnB, Brasília, DF. Bolsista do CNPq.

<sup>2</sup>Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens – USP/ESALQ

<sup>3</sup>Universidade de Brasília, UnB, Brasília, DF, Brasil

<sup>4</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil. e-mail: margot@cenargen.embrapa.br

**Resumo:** Este trabalho objetivou avaliar o efeito de dois diferentes diluentes na qualidade dos espermatozoides criopreservados, antes e após a passagem pelo gradiente de Percoll, e três horas após incubação em meio de fecundação (FEC) utilizado para a co-incubação de espermatozoides e ovócitos durante o processo de FIV. Ejaculados de quatro touros foram diluídos com Botu-Bov<sup>®</sup> ou com citrato-gema, sendo posteriormente criopreservados. Foi descongelada uma palheta de cada touro/tratamento e formado um pool, sendo realizadas análises em três momentos: pré e pós passagem em gradiente de Percoll, e três horas após a incubação em FEC. Em todos os momentos foram avaliados parâmetros de motilidade pelo CASA e integridade de membrana plasmática (IMP) por três métodos: coloração com eosina-nigrosina, coloração com iodeto de propídeo (IP) associado à diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA) e teste hiposmótico (HOS). Os dados foram analisados por ANOVA ( $P \leq 0,05$ ). Não foram observadas diferenças entre os parâmetros de motilidade avaliados para os dois diluentes, com exceção da amplitude lateral de cabeça (AHL), que foi maior no citrato-gema após 3 horas em FEC. Apesar do método utilizado para avaliar a IMP afetar a porcentagem de células íntegras detectadas, o uso de diferentes diluentes não influenciou esse parâmetro. Conclui-se que não há efeito dos diluentes utilizados neste estudo na qualidade espermática após a manipulação do sêmen para ser utilizado na PIV. Entretanto, estudos avaliando o desenvolvimento embrionário são necessários para confirmar que o diluente utilizado para criopreservar o sêmen não afeta os resultados da produção in vitro de embriões (PIV).

**Palavras-chave:** Botu-bov<sup>®</sup>, citrato-gema, criopreservação, viabilidade espermática, PIV

### **Effect of the extender on sperm quality after preparation of bovine semen cryopreserved used for in vitro embryo production**

**Abstract:** This study aimed to evaluate the effect of extender on quality of cryopreserved sperm used for in vitro embryo production (IVP). Ejaculate from four bulls were diluted with Bot Bov and Citrate and cryopreserved. One straw from each bull from each treatment were thawed and one pool/treatment was formed. Sperm analysis were made at three moments, before and after passing through percoll gradient and 3 h after incubation on media used for in vitro fertilization (FEC). In all moments, sperm was evaluated for motility parameters by CASA and plasma membrane (PM) integrity by three methods: eosin-nigrosin stain, a combination of fluorescent probes 6-carboxy-fluorescein diacetate (C-FDA) and propidium iodide and hyposmotic test. Data were analyzed by ANOVA. No differences were observed ( $P > 0.05$ ) in motility data obtained by CASA between the extenders, except for the of amplitude of lateral head displacement (AHL), which was higher in sperm cryopreserved with citrate 3 h after incubation in FEC. Although the method used affect the percentage of cells detected with intact PM ( $P < 0.05$ ), the extender had not ( $P > 0.05$ ). In conclusion, extender used to cryopreserved sperm in this study have not affect the sperm quality after being manipulated to be use for IVP. However, additional studies evaluating embryo development are needed to confirm that extender used to cryopreserve semen have no effect of IVP results.

**Keywords:** Botu-bov<sup>®</sup>, citrate, cryopreservation, IVP, sperm viability

### **Introdução**

A criopreservação de sêmen bovino esta bem estabelecida e tem sido extensivamente utilizada por mais de quatro décadas. Entretanto, 40 a 50% dos espermatozoides ainda perdem a sua integridade física e/ou funcionalidade quando submetidos à criopreservação (Holt, 2000; Celeghini et al., 2008; Vera-Munoz et al., 2009). Melhoras significativas nestes parâmetros podem ser obtidas através do uso de diferentes diluidores, que interagem com os espermatozoides, protegendo seus componentes celulares durante os processos de resfriamento, congelamento e descongelamento (Celeghini et al., 2008; Vera-Munoz et al., 2009; Akhter et al., 2011). Visando garantir a mínima alteração da estrutura dos espermatozoides e manter sua maior viabilidade, vários diluentes têm sido desenvolvidos e estão comercialmente disponíveis. Entretanto, com o crescente aumento do uso de sêmen criopreservado na produção in vitro de embriões, não se sabe se o diluidor utilizado pode influenciar na seleção



espermática, realizada antes da fecundação in vitro (FIV), ou mesmo na viabilidade espermática durante esse processo. Dentre os métodos utilizados para a seleção de espermatozoides para a FIV, o gradiente de Percoll é um dos mais utilizados. Portanto, este estudo teve como objetivo comparar a qualidade do sêmen criopreservado com dois diluentes diferentes antes e após a passagem pelo gradiente de Percoll, e três horas após incubação em meio (FEC) utilizado para a co-incubação de espermatozoides e ovócitos durante o processo de FIV.

#### Material e Métodos

Um ejaculado de cada touro (n=4) foi colhido e separado em duas frações, que foram diluídas com Botu-Bov<sup>®</sup> ou citrato-gema. Após a composição dos grupos, todas as amostras foram congeladas em palhetas de 0,5 mL com uma concentração de aproximadamente  $30 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Após o congelamento, uma palheta de sêmen de cada tratamento foi descongelada, formando um pool, sendo retirada uma amostra para avaliação da motilidade e cinética espermática em sistema computadorizado (CASA, duas réplicas) e integridade de membrana plasmática (IMP, três réplicas). Os métodos para avaliação de IMP incluíram: eosina-nigrosina (EO), combinação dupla de corantes fluorescentes com iodeto de Propídeo (IP) e diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA) e teste hiposmótico (HOS). O restante da amostra foi depositado em gradiente de Percoll 45:90% e centrifugado a 5400 X g por cinco minutos. O pellet resultante foi homogeneizado sendo retiradas amostras para as mesmas avaliações realizadas pré-Percoll. O restante do pellet foi colocado em 800µL de meio FEC, na concentração de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL, e incubado por três horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em ar. Após incubação, os espermatozoides recuperados foram utilizados para as mesmas avaliações feitas pré e pós gradiente de Percoll. Para comparação entre os grupos, foi utilizado ANOVA com teste t ( $P \leq 0,05$ ).

#### Resultados e Discussão

Não houve diferença na motilidade e cinética espermática entre os dois diluentes antes ou após a passagem pelo gradiente de Percoll (Tabela 1). Na avaliação após 3 horas de incubação em meio de fecundação, foi observado efeito do diluente apenas no valor de amplitude lateral de cabeça (ALH; Tabela 1). Entretanto, esta diferença não é suficiente para interferir na viabilidade dos espermatozoides, além de não haver um valor máximo ou mínimo para caracterizar alguma interferência na viabilidade espermática (Celeghini et al., 2008).

Tabela 1. Valores (média±DP) dos parâmetros de motilidade e cinética espermática fornecidos pelo sistema CASA, em sêmen criopreservado com dois diferentes diluentes, pré e pós passagem pelo gradiente de Percoll e após 3 horas de incubação em meio de fecundação (FEC).

Parâmetros	Pré-percoll		Pós-percoll		3 horas	
	Citrato-gema	Botu-bov <sup>®</sup>	Citrato-gema	Botu-bov <sup>®</sup>	Citrato-gema	Botu-bov <sup>®</sup>
Motilidade (%)	63±14,1	57,5±0,7	79±4,2	74,5±17,7	26,5±26,2	10,5±3,5
Motilidade progressiva (%)	34,5±2,1	41±11,3	65,5±7,8	63,5±14,5	17±15,6	8±4,2
VAP (µm/s)	75,3±3,7	78,3±10,8	125±4,6	123,1±16,4	102,3±27,4	82,9±5,6
VSL (µm/s)	57,9±6,2	66,5±14,3	109,4±1	111,9±11,5	94,6±27,6	80,2±5,9
VCL (µm/s)	136,3±5,7	128,1±2,6	199,3±7,0	179,6±15,5	145,1±22,0	104,3±13,5
BCF (Hz)	27,3±1,0	31,5±4,7	37,6±1,7	38,1±7,4	41,5±1,5	36,6±5,7
ALH (µm)	6,8±0,3	5,7±0,1	7,2±0,1	6,3±1,1	5,6±0,6 <sup>a</sup>	4,0±0,3 <sup>b</sup>
LIN (%)	44,5±2,1	54±10,0	55±1,4	62±1,4	64±8,5	76±7,0
STR (%)	76,5±3,5	84,5±6,4	85,5±2,1	89,5±2,1	86,5±1,0	96,5±1,0

<sup>a,b</sup>Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si, pelo teste t. VAP, velocidade de trajeto; VSL, velocidade retilínea; VCL, velocidade curvilínea; BCF, frequência de batimentos; ALH, amplitude lateral de cabeça; LIN, linearidade; STR, retilinearidade.

A tabela 2 apresenta a avaliação de IMP utilizando três diferentes técnicas, antes e após o Percoll e com 3 horas de incubação. Nenhuma diferença foi observada entre os dois diluentes. Entretanto, na avaliação com EO,



após a passagem pelo gradiente de Percoll foi encontrada uma maior porcentagem de células com membrana íntegra nos espermatozoides criopreservados com citrato-gema. A comparação entre os métodos de avaliação de IMP nos diferentes grupos e momentos (Tabela 2) mostrou que o teste HOS apresentou uma menor porcentagem de células com membrana íntegra antes e após passagem pelo gradiente de Percoll quando comparado a EO e CFDA. Já na avaliação após 3 horas de incubação, os testes HOS e CFDA apresentaram resultados semelhantes, sendo inferiores aos valores encontrados na avaliação com EO. Estas diferenças entre as técnicas podem ser devidas ao mecanismo de ação de cada uma. O teste HOS além de considerar a célula espermática por sua integridade física, também considera sua funcionalidade. O CFDA é permeável à membrana íntegra e no interior da célula é rapidamente convertido por esterases em uma molécula impermeável a membrana, sendo mantido no interior da célula, o que também indica alguma funcionalidade da mesma. Já a EO possui a capacidade de penetrar a membrana plasmática somente quando esta se encontra lesada, se liga a estruturas ácidas no interior da célula e, muitas vezes, pode superestimar a proporção de células com membrana íntegra (Brito et al. 2003). Estas diferenças entre as técnicas poderiam influenciar na identificação de uma lesão na membrana plasmática.

Tabela 2. Porcentagem (média±DP) de espermatozoides com membrana íntegra avaliados por três diferentes técnicas, sendo: coloração com eosina-nigrosina, coloração com Diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA) e teste hiposmótico (HOS).

Técnica	Pré-Percoll		Pós-Percoll		3 horas	
	Citrato-gema	Botu-bov <sup>®</sup>	Citrato-gema	Botu-bov <sup>®</sup>	Citrato-gema	Botu-bov <sup>®</sup>
CFDA (%)	39,2±10,4 <sup>a.A</sup>	37,5±24,7 <sup>a.A</sup>	48,5±12,3 <sup>a.A</sup>	38,3±2,5 <sup>a.A</sup>	27,3±9,5 <sup>a.A</sup>	25,5±4,8 <sup>a.A</sup>
Eosina (%)	45,3±12,5 <sup>a.A</sup>	46,8±5,4 <sup>a.A</sup>	60,0±8,4 <sup>b.A</sup>	48,2±10,8 <sup>b.B</sup>	48,2±6,4 <sup>b.A</sup>	42,8±7,6 <sup>b.A</sup>
HOS (%)	19,2±13,8 <sup>b.A</sup>	15,0±12,0 <sup>b.A</sup>	17,1±9,3 <sup>c.A</sup>	14,2±1,8 <sup>a.A</sup>	25,7±14,2 <sup>a.A</sup>	25,6±2,9 <sup>a.A</sup>

<sup>a,b</sup>Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si, pelo teste t.

<sup>A,B</sup>Médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem entre si, pelo teste t.

### Conclusões

Conclui-se que não há efeito dos dois diluentes utilizados neste estudo na qualidade espermática antes ou após a passagem pelo gradiente de Percoll e em três horas de incubação em meio de fecundação. Entretanto, o método de avaliação de IMP pode sub ou superestimar a proporção de células com membrana íntegra nos diferentes momentos. Mais estudos avaliando o desenvolvimento embrionário são necessários para confirmar que o diluente utilizado para criopreservar o sêmen não afeta os resultados da PIV.

### Literatura citada

- Akhter S.; Ansari M.; Andrabi S.; Rakha B.; Ullah N.; Khalid M. Soya-lecithin in extender improves the freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, Dec 29, DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01973.x, 2011.
- Brito, L. F. C.; Barth, A. D.; Bilodeau-Goeseels, S. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v. 60, p. 1539-1551, 2003.
- Celeghini, E. C. C.; Arruda, R. P.; Andrade, A. F. C. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 119-131, 2008.
- Holt W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-22, 2000.
- Vera-Munoz O.; Amirat-Briand L.; Diaz T.; Vásquez L.; Schmidt E.; Desherces S.; Anton M.; Bencharif D.; Tainturier D. Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: comparison to Triladyl and Bioxcell. **Theriogenology**, v. 71, p. 895-900, 2009.