EFEITO DE MEIOS DILUENTES E SISTEMAS DE TRANSPORTE NO SÊMEN CONGELADO ANALISADO PELO MÉTODO COMPUTACIONAL CASA EM TOUROS NELORE

Talita Raquel Cavichioli Sebastião, Camila Dutra de Souza Francisquini, Marcelo George Mungai Chacur

Universidade do Oeste Paulista, PRPPG – Lab. Reprodução Animal, Presidente Prudente, SP. E-mail: talita__cavichioli@hotmail.com, marcelo.chacur@uol.com.br
Agência de fomento: CNPq e CAPES

RESUMO

Objetivou-se avaliar meios diluentes e sistemas de transporte na qualidade do sêmen congelado pelo CASA em touros Nelore. Foram realizadas cinco coletas de sêmen de 6 touros, diluídas com os meios TRIS e BotuBOV®, refrigeradas em dois tipos de sistemas de transporte BotuBOX® e BotuFLEX®; congeladas e analisadas pelo CASA. A MT foi maior (p<0,05) na associação do meio BotuBOV® + BotuFLEX® (47,3%) quando comparado ao TRIS + BotuBOX® (9%). A MP foi maior (p<0,05) BotuBOV® + BotuFLEX® (37%) quando comparada a TRIS + BotuBOX® (5,9%). O mesmo para VSL, BCF e RAP, os quais foram maiores (p<0,05) em BotuBOV® + BotuFLEX® (65,1µm/s; 30Hz; 44,5%, respectivamente) quando comparados ao sêmen na associação TRIS + BotuBOX® (47,6µm/s;21,5Hz;6,9%, respectivamente). Conclui-se que o BotuBOV® em associação ao sistema de transporte refrigerado de sêmen BotuFLEX®, foi considerada pelo CASA, a melhor associação quando se refere a cinética espermática para a criopreservação de sêmen bovino.
Palavras-chave: touro zebu; biotecnologia de sêmen; refrigeração passiva; cinética espermática; criopreservação de sêmen.

EFFECT OF EXTENDERS AND TRANSPORTATION SYSTEMS IN FROZEN SEMEN ANALYZED BY COMPUTATIONAL METHOD HOME IN NELORE BULLS

ABSTRACT

The objective was to evaluate diluents and transport systems on semen quality frozen by CASA in Nellore bulls. Five semen collections of six bulls, diluted with the TRIS and BotuBOV®, were transported out on two types of BotuBOX® and BotuFLEX® systems; frozen and analyzed by CASA. TM was higher (p <0.05) in the association of BotuBOV® + BotuFLEX® (47.3%) when compared to TRIS + BotuBOX® (9%). The PM was higher (p <0.05) BotuBOV® + BotuFLEX® (37%) when compared to TRIS + BotuBOX® (5.9%). The same for VSL, BCF and RAP, which were higher (p <0.05) in BotuBOV® + BotuFLEX® (65.1µm/s, 30Hz, 44.5%, respectively) when compared to semen in the TRIS + BotuBOX® (47.6µm/s, 21.5Hz, 6.9%, respectively). It is concluded that BotuBOV® in association with the refrigerated system of semen BotuFLEX® was considered by CASA to be the best association when referring to sperm kinetics for cryopreservation of bovine semen.
Keywords: zebu bull; semen biotechnology; passive refrigeration; spermatic kinetics; semen cryopreservation.

INTRODUÇÃO

Os protocolos para criopreservação do sêmen bovino, geralmente incluem o resfriamento lento do sêmen para 4 a 5°C, seguido por um intervalo variável de equilíbrio (de 30 minutos a 24 horas) sob temperatura de refrigeração e posteriormente a congelação seminal (LEITE et al., 2010). A fase de refrigeração representa o início do estresse térmico submetido às células espermáticas durante o processo de criopreservação.

Segundo Crespilho e Papa (2010) o sêmen refrigerado por 24 horas representa uma estratégia eficiente para aumentar a taxa de concepção de vacas inseminadas em tempo fixo. O sêmen congelado apresenta uma fertilidade

significativamente reduzida quando comparado ao sêmen fresco, devido ao processo de criopreservação, que compreende diluição, resfriamento, adição e penetração do crioprotetor, envase, congelação, armazenamento e descongelação (WATSON, 2000).

O termo choque térmico define um conjunto de alterações ocorridas na célula espermática de mamíferos, tendo em vista que o sêmen bovino após a coleta apresenta temperatura semelhante a corpórea (± 38ºC) e quando submetido à refrigeração rápida, atinge temperaturas próximas a 5ºC, resultando no decréscimo irreversível da motilidade espermática, assim como em mudanças na bioquímica e no funcionamento destes gametas, incluindo: redução da taxa de glicólise, respiração celular e frutólise, aumento da degeneração do ácido desoxirribonucleico e liberação de material intracelular (WATSON, 2000).

O CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) é um sistema automático (*hardware* e *software*) utilizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas, fornecendo informações acuradas, precisas e significativas do movimento individual de cada célula bem como de subpopulações de células espermáticas (AMANN; KATZ, 2004).

O objetivo do estudo é avaliar o efeito de meios diluentes e sistemas inovadores de transporte na qualidade do sêmen congelado pelo método computacional CASA em touros Nelore (*Bos taurus indicus*), criados extensivamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNOESTE) sob o protocolo nº 3808.

Animais, local e época do experimento

Foram utilizados 6 touros da raça Nelore com idades de 36 meses, de uma propriedade do município de Anaurilândia - MS, mantidos em pasto de *Urochloa decumbens*, com mistura mineral e água à vontade.

Colheita e processamento do sêmen

Foram realizadas cinco coletas de sêmen para cada um dos seis touros, pelo método de eletroejaculação (Eletroejac®, Neovet, Brasil) com intervalo de 15 dias, totalizando 30 amostras de sêmen coletadas, diluídas com os meios TRIS gema - ácido cítrico (3,28g TRIS, 1,78g ácido cítrico, 1,25g D-frutose, 6% glicerol, 20% gema de ovo, água destilada para 100mL de meio) produzido no Laboratório de Reprodução Animal da Unoeste e BotuBOV® (Botupharma, Botucatu, Brasil), refrigeradas em dois tipos de sistemas de transporte BotuBOX® (Botupharma, Botucatu, Brasil), e BotuFLEX® (Botupharma, Botucatu, Brasil), congeladas e estocadas em nitrogênio líquido para posterior análise da cinética espermática pelo método computacional CASA.

Colheita e processamento do sêmen fresco

Logo após a coleta, os ejaculados foram mantidos em banho-maria entre 32 e 37ºC, avaliado o volume do ejaculado (mL) e a análise ao microscópio de motilidade (0 a 100%), vigor (0 a 5) e turbilhão (0 a 5). Em uma solução de formol salino tamponado, o sêmen foi diluído na proporção de 1:100, para posterior contagem em câmara de Neubauer. A morfologia espermática foi analisada em microscopia de contraste de fase (E200®, Nikon, Japão), levando-se em consideração 200 espermatozoides. As análises do sêmen foram realizadas conforme normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

Refrigeração de sêmen

Após a colheita do sêmen, o mesmo foi fracionado em alíquotas de mesmo volume e diluído em dois meios: TRIS-gema-ácido cítrico e BotuBOV® na proporção de 1:1, e posteriormente, foram acondicionados em dois tipos de sistemas de transporte refrigerado BotuBOX® e BotuFLEX® para o laboratório.

Cada um dos tratamentos teve o volume final pós-diluição padronizado em 8,0mL com envase em palhetas francesas (IMV®, França) de 0,5 mL; sendo considerado $50x10^6$ espermatozoides/palheta, mantidas em refrigerador comercial a 5^0C / 4 h.

Congelação de sêmen

Imediatamente após o final do período de refrigeração, as palhetas foram dispostas horizontalmente, expostas ao vapor de nitrogênio a -120^0C a 4 cm do nível do nitrogênio líquido por 15 min, e mergulhadas no nitrogênio líquido a -196^0C, raqueadas, identificadas e armazenadas em botijão de nitrogênio.

Análise computacional com CASA no sêmen congelado

Na pós-descongelação, foi realizada a análise computadorizada da cinética espermática pelo método CASA com o aparelho fabricado pela "Hamilton Thorne Research", versão IVOS 10, onde após a descongelação das doses de sêmen uma gota da amostra foi colocada na câmara de

Makler aquecida a 38°C, para as análises das variáveis da cinética espermática. As análises foram realizadas em "*setup*" ajustado para as características seminais de bovinos e avaliadas três campos de cada amostra. As seguintes variáveis cinéticas espermáticas foram analisadas: motilidade espermática total (MT), motilidade espermática progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP), velocidade linear (VSL), velocidade curvilinear (VCL), deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento da cauda (BCF), retilinearidade (STR), linearidade (LIN) e porcentagem de espermatozoides rápidos (RAP).

Análise estatística dos dados

Para o tratamento estatístico dos dados do sêmen congelado nos dois sistemas de transporte e com os dois meios diluentes foi utilizada análise de variância, com posterior comparação de médias pelo teste de Tukey a 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o experimento, os seis touros durante as cinco coletas obtiveram amostras seminais satisfatórias, onde nenhuma amostra foi descartada ou apresentou volume insuficiente. Os touros apresentavam-se calmos e aclimatados ao ambiente e eram coletados, um por vez, respeitando o tempo adequado para uma boa contenção física, proporcionando o bem estar e minimizando o estresse para posterior realização das etapas dos procedimentos de coleta, diluição e refrigeração do sêmen. Os resultados das características seminais dos touros são apresentados abaixo na tabela 1.

Tabela 1. Características quantitativas e qualitativas (média±desvio-padrão) do sêmen fresco de touros Nelore.

Características do Sêmen	Sêmen Fresco
Volume do Ejaculado (mL)	9.1±3
Motilidade Espermática Progressiva (%)	79.3±12
Vigor Espermático (0 a 5)	3.6±0.6
Turbilhão (0 a 5)	2.5±1.2
Defeitos Maiores (%)	7.2±4.9
Defeitos Menores (%)	5.4±5.9
Defeitos Totais (%)	12.1±8.1

A qualidade do sêmen dos touros ao longo do experimento classificou-os como aptos à atividade reprodutiva segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), que preconiza que o sêmen fresco de bovinos deve ter motilidade ≥ 60% (0 a 100%), vigor ≥ 3 (0 a 5) e turbilhão ≥ 3 (0 a 5), defeitos totais ≤ 30%, defeitos menores ≤ 20%, e para os defeitos maiores ≤10%.

No presente experimento foram utilizadas os sistema de transporte de sêmen refrigerado BotuBOX® e BotuFLEX®, a primeira possui curva de refrigeração que realiza um decréscimo da temperatura até 15° C pois utiliza um único gelo no seu sistema. Enquanto a BotuFLEX®, com dois gelos, a curva de temperatura abaixa até 5°C. Squires et al. (1999) relataram que a cada 10°C reduzidos na temperatura das células, ocorre uma redução em 50% no metabolismo espermático.

Destaca-se a superioridade da BotuFLEX®, pois quando o sêmen é refrigerado a 5ºC ocorre uma redução no metabolismo espermático o que resulta em aumento da longevidade dos espermatozoides permitindo mais flexibilidade no uso do sêmen refrigerado quando comparado ao fresco (VISHWANATH; SHANNON, 2000).

O período de transporte do sêmen no presente experimento foi de 3 horas, da fazenda ao laboratório de Reprodução Animal da Unoeste. De acordo com a curva de refrigeração apresentada pelo fabricante dos presentes sistemas de transporte de sêmen utilizados, o sêmen transportado na BotuBOX®, atingiu a temperatura de 18°C, enquanto que o sêmen transportado na BotuFLEX®, atingiu temperatura de 12,5°C. Graham (1996) relata que para minimizar os efeitos deletérios gerados pela congelação é preciso controlar a taxa de resfriamento e utilizar um diluente que contenha lipídeos (gema de ovo). Destaca ainda que se o resfriamento for feito de maneira inadequada, ocorrerá no espermatozoide o choque-frio, o que induz danos irreversíveis ao espermatozoide, alterando padrões de motilidade, redução do metabolismo e danos ao acrossomo e membrana plasmática.

Os dados da análise cinética espermática nas amostras do sêmen diluídos nos TRIS e BotuBOV®, submetidas ao transporte prévio à congelação nos sistemas BotuBOX® e BotuFLEX® estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros de cinética espermática (média±desvio-padrão) avaliados pelo método computacional CASA do sêmen criopreservado nos meios diluentes TRIS e BotuBOV® e acondicionados nos sistemas de transporte refrigerado BotuBOX® e BotuFLEX®.

Parâmetros de cinética espermática	BotuBOX® + TRIS	BotuBOX® + BotuBOV®	BotuFLEX® + TRIS	BotuFLEX® + BotuBOV®
MT (%)	9±10.8c	21.2±21.6bc	25±18.7b	47.3±22.9ª
MP (%)	5.9±7.4c	16±15.7b	17.8±12.9b	37±18.1ª
VAP (µm/s)	60.2±27	69.4±22.7	70.6±20.3	76.4±25.1
VSL (µm/s)	47.6±21b	58.5±19.3a	57.1±16.6a	65.1±21.3ª
VCL (µm/s)	106.3±49.8	115.9±38.9	118.4±33.6	121.1±40.4
ALH (µm)	5.1±2.8	4.9±1.8	5.1±1.5	4.6±1.5
BCF (Hz)	21.5±10.9b	26.2±9.3ab	23±8.4ab	30±8.3ª
STR (%)	69.5±29	77.3±23.8	76.8±20.3	80.5±21.1
LIN (%)	41.3±18.8	50.4±16.1	47.8±13.2	53.1±14.5
RAP (%)	6.9±9.1c	19.8±20.8b	22.9±17.2b	44.5±22.2ª

Letras minúsculas diferentes na linha, diferem entre si com P<0,05, pelo teste de Tukey; MT (motilidade espermática total), MP (motilidade espermática progressiva), VAP (velocidade de trajeto), VSL (velocidade linear), VCL (velocidade curvilinear), ALH (deslocamento lateral da cabeça), BCF (frequência de batimento da cauda), STR (retilinearidade), LIN (linearidade) e RAP (espermatozoides rápidos).

Para MT (%), a população de células em movimento com velocidade mínima determinada pelo equipamento (VERSTEGEN et al., 2002) e MP (%), se refere as células espermáticas que estão se movendo progressivamente (VERSTEGEN et al., 2002) houveram diferenças (p<0,05) entre as associações, sendo superior ao utilizar o meio diluente BotuBOV® no sistema de transporte refrigerado BotuFLEX®, quando comparados aos demais, e a associação entre o TRIS e BotuBOX® apresentou menores porcentagens. Celeghini et al. (2008) comparando os resultados de MT e MP entre os meios diluentes BotuBOV® e Bioxcell, observaram a superioridade do meio BotuBOV®, e sugere que esse resultado possa estar relacionado com o aumento da motilidade em diluentes com maior densidade, cuja na formulação tenha gema de ovo. No entanto, no presente experimento, os dois diluentes são a base de gema de ovo, o que nos faz sugerir que exista algum componente no diluidor BotuBOV® que estimule a motilidade.

Para os valores de VSL na associação de TRIS e BotuBOX® foi inferior as outras associações (p<0,05), e o associação entre BotuBOV® e BotuFLEX® que apresentou maior velocidade linear. Esse parâmetro representa a velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide (VERSTEGEN et al., 2002). Esses resultados corroboraram com Verberckmoes et al. (2005), que também apresentou valores aumentados de VSL e BCF, e afirma estar relacionado com o maior vigor e retilinearidade dos espermatozoides criopreservados. Sugerimos que a composição do meio diluente TRIS e o sistema de transporte refrigerado de sêmen BotuBOX®, não foram eficientes para suprir a demanda de energia necessária para os processos de refrigeração, congelação e pós-descongelação.

Para BCF, que representa o número de vezes que a cabeça dos espermatozoides cruza a direção do movimento (VERSTEGEN et al., 2002), houve diferença (p<0,05) na combinação do BotuBOV® com BotuFLEX®, sendo esse valor superior quando comparado à utilização do meio diluente TRIS com a BotuBOX®. Verstegen et al. (2002), ressalta a alta correlação positiva com BCF e a taxa de prenhez em bovinos. Em seu experimento, Crespilho e Papa (2006), destacou que valores superiores de BCF, STR e VSL foram encontrados no sêmen bovino criopreservado no diluidor BotuBOV® o que indica que os espermatozoides congelados com esse diluidor apresentam seus movimentos com linearidade superior quando comparado ao diluidor TRIS-gema de ovo-frutose. Sugerimos que esse

diluente possua algum componente que estimula o batimento flagelar, visto que as amostras congeladas com diluidor TRIS não apresentaram resultados superiores significamente ao BotuBOV®.

Houve diferença significativa para RAP, entre os meios diluente e sistemas de transporte, no qual, na associação do meio BotuBOV® com a BotuFLEX®, foi maior (p<0,05) quando comparado ao TRIS transportado na BotuBOX®. O que corrobora aos resultados de maior batimento flagelar, maior motilidade total, maior motilidade progressiva e maior velocidade progressiva.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, podemos concluir que o diluidor comercial BotuBOV® em associação ao sistema de transporte refrigerado de sêmen BotuFLEX®, foi considerada pela análise computadorizada de sêmen (CASA), a melhor associação quando se refere a cinética espermática para a criopreservação de sêmen bovino, pois preservou melhor a motilidade espermática e a porcentagem de espermatozoides rápidos.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à CAPES pelas bolsas de estudo concedidas.

REFERÊNCIAS

AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 317-325, 2004. https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02793.x

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; RODRIGUES, P. H. M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two diferente extenders has a on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.119-131. 2008. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.02.001

CBRA. Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. **Belo Horizonte,** Brasil. 2013.

CRESPILHO, A.M.; PAPA, F.O.; ALBERTI, K. et al. Eficiência comparativa entre dois diluidores para a congelação de sêmen bovino sobre os padrões de motilidade e integridade de membrana plasmática. **ARS Veterinária,** v.22, n.3, p.229-235, 2006.

CRESPILHO, M. A.; PAPA, O. F. **Uso do sêmen bovino refrigerado como estratégia para o aumento da taxa de concepção dos programas de inseminação artificial em tempo-fixo**. 2010. 97f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2010.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.12, n.1, p.131-147, 1996. https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30300-0

LEITE, T.G.; VALE FILHO, V.R.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; EMERIC, L.L.; ZAFFALOM, 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. **Anim. Reprod. Sci.,** v. 120, p.31–38, 2010. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.04.005

SQUIRES, E. L.; PICKETT, J. K.; GRAHAM, D. K.; VANDERWALL, D. K.; MCCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Cooled and frozen stallion sêmen. In: **Animal Reproduction and Biohecnology laboratory**. Colorado: College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences - Colorado States University, 1999.

VERBERCKMOES, S.; SOOM, A. V.; DEWULF, J. et al. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. **Theriogenology**, v.63, n.3, p.912-922, 2005. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.05.011

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary pratice. **Theriogenology,** v.57, n.1, p.149-179, 2002. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00664-1

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.23-53, 2000. https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00153-6

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60, p.481-492, 2000. https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3

Recebido para publicação em 03/08/2018
Revisado em 14/08/2018
Aceito em 02/09/2018