

COMPARAÇÃO ENTRE O TRIS-GEMA E CITRATO-GEMA COMO DILUIDORES NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO

Bruno Abdo Siman Corrêa¹
Gilberto Lopes Miranda Filho¹
Jéssica Danúbia de Jesus Gonçalves¹
Vanessa Lopes Dias Queiroz de Castro²
vanessalopq@gmail.com

ÁREA DE CONHECIMENTO: Ciências Agrárias

PALAVRAS-CHAVE: criopreservação, diluente, gema de ovo, glicerol, sêmen.

INTRODUÇÃO

Ainda que seja nítido o crescente aumento na comercialização do sêmen criopreservado, ainda são observadas perdas consideráveis do potencial de fertilização provocada pelo processo de criopreservação espermática (CURTIS *et al.*, 1998; MEDEIROS *et al.*, 2002; FUERST-WALTL *et al.*, 2016; CELEGHINI *et al.*, 2008). O processo de criopreservação pode causar danos aos espermatozoides, representando uma diminuição de aproximadamente 50% da motilidade espermática (THOMAS *et al.*, 1998; CELEGHINI *et al.*, 2008) e quando considera a integridade das membranas espermáticas esta queda pode ser mais acentuada, atingindo a mais de 60% (CELEGHINI *et al.*, 2008). Apenas o plasma seminal não é capaz de preservar adequadamente os espermatozoides contra mudanças de temperaturas. Para que o sêmen seja estocado em baixas temperaturas é necessário que o mesmo seja diluído em diluidores especiais e apropriados (SALAMON & MAXWELL, 1995). Na criopreservação o aspecto mais importante é a necessidade de remover o máximo possível de água das células antes da congelação. Não procedendo à desidratação, grandes cristais de gelo causam lesões à estrutura intracelular, e frequentemente, provocando a morte celular (MUNAR, 1988). Diante desses pressupostos, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os parâmetros seminais de sêmen bovino criopreservado com dois diluidores, tris-gema e o citrato-gema, a fim de verificar qual apresentaria menores perdas celulares que normalmente ocorrem durante o processo de congelação.

METODOLOGIA

O experimento foi conduzido em uma fazenda criadora de gado Nelore localizada no estado de Mato Grosso do Sul. Os animais foram mantidos em pastagem de *Brachiaria brizantha*, água e mistura mineral em cocho foi disponibilizada “*ad libidum*”.

Foram submetidos a exame andrológico completo, cinco touros Nelore adultos, com aproximadamente 3 anos de idade, com peso médio de 550 kg. Os parâmetros físicos e morfológicos dos cinco ejaculados foram avaliados conforme os padrões de julgamento de sêmen para espécie, de acordo com o manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Utilizou-se para o experimento um ejaculado de cada touro obtido por eletroejaculação que atendeu previamente os padrões mínimos de julgamento (CBRA, 1998) e cada ejaculado foi dividido e acrescido de dois diferentes diluentes constituindo dois tratamentos para cada animal. O tratamento 1

(T1) correspondeu ao diluente à base de Citrato-gema utilizado tradicionalmente para sêmen bovino e o tratamento 2 (T2) foi usado o diluente TRIS-gema. A diluição inicial foi realizada com o diluente previamente aquecido em banho-maria a 37°C, utilizando uma proporção de 1:1 (sêmen: diluente). Após a congelação, as amostras devidamente identificadas foram descongeladas e avaliadas quanto à motilidade espermática e vigor de cada partida de sêmen diluído em T1 e T2. Os padrões mínimos adotados para sêmen pós-descongelamento para a espécie bovina esteve de acordo com o manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Motilidade espermática: $\geq 30\%$; vigor: ≥ 3 . A variável quantitativa motilidade espermática e vigor foram submetidas ao teste não paramétrico de Wilcoxon (SAEG, 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença significativa de motilidade e vigor espermático pós-descongelamento entre os dois meios diluidores. O sêmen fresco apresentou motilidade de $75 \pm 2,2\%$ e vigor de $3,6 \pm 0,2$. No T1 a motilidade foi de $51 \pm 3,3\%$ e o vigor de $3,4 \pm 0,2$, já no T2 foi de $43 \pm 3,7\%$ e $3,0$, respectivamente. Os meios tampões mais utilizados nos diluentes para sêmen de bovinos são o citrato e o tris (BORGES, 2008). No entanto o citrato é reconhecido devido suas propriedades tamponantes melhorarem a solubilidade das frações proteicas da gema do ovo (LEITE *et al.*, 2011). Já o tris atua na redução do metabolismo da frutose pela célula espermática contribuindo para a economia de sua energia (BORGES, 2003). Contudo, no presente trabalho ambos os diluentes proporcionaram proteção às células espermáticas, as quais apresentaram parâmetros seminais pós-descongelamento satisfatórios de acordo com os padrões mínimos impostos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal: motilidade espermática: $\geq 30\%$ e vigor: ≥ 3 . Purdy e Graham (2003) relataram que sêmen bovino diluído com o citrato-gema apresentou 53% de motilidade pós-descongelamento, o que está de acordo com os achados do trabalho em questão. O diluente tris-gema vem sendo largamente utilizado em várias espécies por apresentar bons resultados após a criopreservação (DE LEEUW *et al.*, 2000; THUN *et al.*, 2002). Leite *et al.* (2010) avaliou a integridade das membranas plasmática e acrossomais e a função mitocondrial do sêmen criopreservado com Tris-gema, e ressaltou que a função mitocondrial não sofreu qualquer alteração. Vale ressaltar que as mitocôndrias na célula espermática se localizam na peça intermediária e o transporte na cadeia de elétrons é a fonte de produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) sendo então, especialmente, susceptível à peroxidação (BROUWERS & GADELLA, 2003). O glicerol é o crioprotetor intracelular mais utilizado em diferentes espécies. Ele é capaz de reduzir a concentração de eletrólitos do meio extracelular permitindo a saída de forma gradual de água do meio intracelular durante a congelação evitando a formação de cristais de gelo (MUIÑO *et al.*, 2007). Enquanto a gema de ovo fornece lipoproteínas de baixa densidade que interagem com os fosfolipídios da membrana espermática, restaurando aqueles perdidos durante o choque térmico, conferindo resistência (NASCIMENTO, 2016).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização do diluente tris-gema e citrato-gema foram eficazes na criopreservação do sêmen bovino em estudo. Ambos proporcionaram proteção às células espermáticas que apresentaram os parâmetros mínimos para a sua utilização nas biotecnologias reprodutivas.

REFERÊNCIAS

- BORGES, J. C. **Efeito da utilização de antioxidante no diluidor para a criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares, inseminação artificial e fecundação in vitro.** Jaboticabal, 2008. 70f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.
- BORGES, J.C. **Utilização de antioxidantes associados ou não a emulsificante na criopreservação de sêmen bovino.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2003.
- BROUWERS, J.F.; GADELLA, B.M. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v.35, p.1382–91, 2003.
- CBRA. **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2 ed., Belo Horizonte: 1998. 49p.
- CELEGHINI ECC, ARRUDA RP, ANDRADE AFC, NASCIMENTO J, RAPHAEL CF, RODRIGUES PHM. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Anim Reprod Sci**, v.104, p.119-131, 2008.
- CURTIS GG, VISHWANATH R, PITT C, GARNER DL, CASEY PJ. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. **J Androl**, v.19, n.6, p.704-709, 1998.
- DE LEEUW AMVW, HARING RM, KAAL-LANSBERGEN LMTE, DEN DAAS JHG. Fertility results using bovine sêmen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soybean extract. **Theriogenology** ; V 54 ; p. 57-67, 2000.
- GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; GRAVANCE, C.G.; MARSHALL, C.E.; DEJARNETTE, M.J.; ALLEN, C.H. Seminal Plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. **Theriogenology**, v. 56, p. 31-40, 2001.
- LEITE TG, FILHO VRV, ARRUDA RP, ANDRADE AFC, EMERICK LL, ZAFFALON FG, MARTINS JAM, ANDRADE VJ. 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.
- MUIÑO R, FERNANDEZ M, PEÑA AI. Post-thaw survival and longevity of Bull spermatozoa frozen with na egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18h. **Reprod Domes Anim**; v. 42: p.305-311 2007.
- MUNAR, C. J. Criopreservação, tópicos atuais. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, UFSM, v.18, p. 17-19, 1988.
- PURDY, P.H.; GRAHAM, J.K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**. v.48; p. 36–45, 2004.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 37, n. 3-4, p. 185-249, 1995.
- SILVA, T. F. P.; ACKERMANN, C. L.; PINHEIRO, F. T. S.; SILVA, L. D. M. Uso da água de coco em pó (ACP-117) na criopreservação de sêmen de gato doméstico. In:

Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, v.17, p.22 Curitiba, PR. Anais... Belo Horizonte: CBRA, 2007.

SAEG. **Sistema de análise estatística e genética** , UFV, Central de processamento de dados, Viçosa- M.G., 1999.

THUN R, HURTADO M, JANETT F. **Comparison of Biociphos-Plus® and TRIS egg-yolk extender for cryopreservation of bull semen**. Theriogenology; v.57: p.1087-1094, 2002.