



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS UTILIZANDO SÊMEN CONGELADO COM OU SEM A PRESENÇA DO PLASMA SEMINAL

Erika Aline Ribeiro **Dias**¹; Suzane Peres **Campanholi**²; Roberta **Vantini**³; Joaquim Mansano **Garcia**³; Fabio Morato **Monteiro**⁴

Nº 14701

RESUMO – O plasma seminal que se mistura com os espermatozoides na ejaculação já foi descrito como benéfico e prejudicial para o espermatozóide. Este trabalho avaliou a taxa de embriões bovinos produzidos *in vitro* utilizando sêmen congelado com ou sem a presença do plasma seminal. O sêmen de 21 touros da raça Nelore colhido por eletroejaculação foi utilizado para compor três tratamentos antes da congelação: T1 - congelação padrão, T2 - separação do plasma seminal por centrifugação e T3 - separação por filtragem através do Sperm Filter®. Os oócitos utilizados foram provenientes de abatedouro. Não foram encontradas diferenças entre os tratamentos na taxa de clivagem sobre a quantidade total de oócitos, T1 = 82,8 ± 1,5% (2540/3067), T2 = 81,2 ± 1,5% (2455/3024) e T3 = 84,9 ± 1,50% (2583/3043), P < 0,05. A taxa de embriões avaliada no D7 (blastocisto) foi menor no T2 comparado a T1 e T3, que foram semelhantes entre si, sendo T1 = 28,4 ± 1,56% (870/3067), T2 = 23,7 ± 1,56% (717/3024) e T3 = 29,8 ± 1,56% (908/3043), P < 0,001. Contudo, a taxa de embriões avaliada no D9 (blastocisto eclodido) foi maior no T3 comparado a T1 e T2, sendo T1 = 21,7 ± 1,47% (665/3067), T2 = 20,2 ± 1,4% (612/3024) e T3 = 26,4 ± 1,43% (803/3043), P < 0,001. Portanto, a utilização de sêmen congelado com o plasma seminal separado pelo Sperm Filter® melhorou a produção de embriões *in vitro* avaliada no D9.

Palavras-chaves: centrifugação, filtragem, Nelore, produção de embriões *in vitro*, sêmen.

1 Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Medicina Veterinária, UNIRP, São José do Rio Preto – SP; erikaaline.rd@gmail.com.

2 Colaboradores: Mestranda em Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal – SP.

3 Colaboradores: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal – SP.

4 Orientador: Pesquisador do Instituto de Zootecnia – Centro Apta Bovino de Corte, Sertãozinho – SP, monteiro@iz.sp.gov.br.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

ABSTRACT – *Seminal plasma mixed with sperm in ejaculation has been described as both, beneficial and detrimental to spermatozoon. This study evaluated the rate of bovine embryos produced in vitro using frozen semen with or without the presence of seminal plasma. Semen from 21 Nellore bulls, collected by electroejaculation was used to compose three treatments before freezing: T1 - standard freezing, T2 - separation from seminal plasma by centrifugation, and T3 - separation by filtration through Sperm Filter®. Oocytes were obtained from a slaughterhouse. No differences were detected among treatments in cleavage rate on total number of oocytes, T1 = 82.8 ± 1.5% (2540/3067), T2 = 81.2 ± 1.5% (2455/3024) and T3 = 84.9 ± 1.50% (2583/3043), P <0.05. Embryos rate evaluated in D7 (blastocyst) was lower in T2 compared to T1 and T3, which were similar: T1 = 28.4 ± 1.56% (870/3067), T2 = 23.7 ± 1.56% (717/3024) and T3 = 29.8 ± 1.56% (908/3043), P <0.001. However, embryos rate evaluated on D9 (hatched blastocyst) was higher in T3 compared to T1 and T2, being T1 = 21.7 ± 1.47% (665/3067), T2 = 20.2 ± 1.4% (612/3024) and T3 = 26.4 ± 1.43% (803/3043), P <0.001. Therefore, the removal of seminal plasma with Sperm Filter® is beneficial for bovine in vitro embryos production, improving the embryos rate in D9.*

Key-words: centrifugation, filtration, Nellore, production of in vitro embryos, semen.

1 INTRODUÇÃO

As taxas de sobrevivência espermática pós-criopreservação não são ótimas para a maioria das espécies. Em média, cerca da metade de todos os espermatozoides humanos e bovinos, são danificados ou destruídos pelo congelamento, limitando a total eficiência e eficácia da preservação de sêmen. Com outras espécies, os resultados podem ser até mesmo piores e mais variáveis (Leibo e Bradley, 1999; Watson, 2000). Uma das estratégias bastante utilizada em diversas espécies é a retirada do plasma seminal antes da criopreservação. Os efeitos prejudiciais do plasma seminal sobre os espermatozoides, durante a criopreservação pode ser relacionado a ação de enzimas específicas, como a atividade da lipase no plasma seminal de garanhões que prejudica a motilidade dos espermatozoides (Zahn et al., 2006). Segundo Tibary et al. (1990) grandes quantidades de plasma seminal no ejaculado de bovinos aumenta a permeabilidade na membrana celular espermática causando vulnerabilidade ao choque frio.

Para a retirada do plasma seminal a técnica mais usada é o método de centrifugação. Em garanhões, a centrifugação do sêmen é frequentemente realizada em programas de estação de



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

monta com a finalidade de reduzir a concentração de plasma seminal e melhorar a concentração do sêmen. Entretanto, vários trabalhos relatam aparente injúria ao espermatozóide prejudicando a fertilização pelo método de centrifugação (Knop et al., 2005; Sieme et al., 2006). Outro método de separação de fácil aplicabilidade é o Sperm Filter®. Este método consiste em um filtro de membrana sintética com porosidade que permite a passagem do plasma seminal e bactérias, retendo apenas os espermatozoides. O filtro elimina a necessidade do uso de centrífuga, sendo menos lesivo aos espermatozoides quando comparado com a centrifugação, usualmente utilizada para a remoção do plasma seminal.

As técnicas de produção *in vitro* de embriões (PIV) têm permitido a exploração da fertilidade *in vitro* em touros, e apresenta correlações positivas entre a produção *in vitro* e a fertilidade do touro *in vivo* (Marquant-Le Guienne et al., 1990; Lonergan, 1994; Zhang et al., 1997; Larsson e Rodriguez- Martinez, 2000; Ward et al., 2001; Sudano et al., 2011).

O aprimoramento da PIV, a partir de oócitos recuperados de folículos de ovários de vacas abatidas, tem sido fundamental para o estudo e a compreensão de vários fenômenos e mecanismos biológicos que ocorrem durante o período desde a maturação dos oócitos, capacitação espermática e fertilização até o início do desenvolvimento embrionário em fase de pré-implantação (Garcia et al., 2004). Com isso, o objetivo do trabalho foi avaliar a taxa de embriões bovinos produzidos *in vitro* utilizando sêmen congelado com ou sem a presença de plasma seminal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de sêmen utilizadas no experimento foram coletadas por eletroejaculação em 21 touros da raça Nelore (*Bos indicus*), com idade entre 3 e 8 anos e previamente avaliados quanto a normalidade dos parâmetros andrológicos. Foram realizadas as análises físicas e morfológicas de rotina (volume, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática), segundo as recomendações do CBRA (1998).

Foram confrontadas três técnicas antes da criopreservação espermática com o objetivo de verificar o efeito da remoção do plasma seminal pela centrifugação ou filtragem pelo Sperm Filter® na PIV. Os ejaculados obtidos foram fracionados em três alíquotas, passando por três tratamentos. O tratamento T1 (Convencional) constitui-se na diluição do sêmen de modo convencional para a concentração final de 60×10^6 espermatozoides por palheta com o diluidor BotuBov® contendo 7% de crioprotetor glicerol. O tratamento T2 (Centrifugado) envolveu a diluição inicial do sêmen na



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

proporção de 1:4 com diluidor BotuSemen® e centrifugação por 10 minutos a 600xg (2200 rpm) conforme descrito por Papa et al. (1998), para a remoção do plasma seminal. Após a centrifugação foi desprezado o sobrenadante e o “pellet” foi ressuspensionado com o diluidor BotuBov® na mesma concentração do tratamento T1. O tratamento T3 (Filtrado) se caracterizou pela filtração pelo dispositivo Sperm Filter®. Após a filtração do sêmen, os espermatozoides foram ressuspensionados com diluidor BotuBov® na mesma concentração do tratamento T1. Após os tratamentos e análise inicial, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL identificadas, resfriadas e congeladas em uma máquina de congelamento (Tetakon®, TK 4000). O descongelamento foi realizado em banho-maria a 37°C por 30 segundos.

Os oócitos bovinos foram obtidos por aspiração folicular de ovários provenientes de abatedouro. Foram selecionados oócitos com aspecto homogêneo de citoplasma e compactação das células do *cumulus*, com pelo menos três a quatro camadas de células de revestimento. Em seguida, os oócitos foram transferidos para microgotas de 100 µL de meio de maturação (20-25 oócitos/gota), cobertas por óleo mineral e colocados em estufa a 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

Para a fecundação foi utilizado o sêmen dos três tratamentos experimentais. O sêmen foi descongelado em água a 37°C por 30 segundos e colocado em um tubo eppendorf de 1,5 mL contendo gradiente descontínuo de 45% e 90% de Percoll. Para a fecundação, sêmen e oócitos foram co-incubados por 18 a 20 horas em atmosfera de 5% de CO₂, umidade relativa de 95% e temperatura de 38,5°C. Os grupos experimentais foram separados de forma equivalente em número de gotas e sempre divididos dentro da mesma placa.

Os prováveis zigotos foram removidos das gotas de fecundação e lavados em três diferentes gotas de meio TL Sêmen, onde tiveram parte das células do *cumulus* removidas por sucessivas pipetagens. Depois foram lavados uma vez em meio de cultivo e transferidos para microgotas de 100 µL de meio SOFaa. A taxa de clivagem foi avaliada 24 horas depois dos prováveis zigotos terem sido colocados em cultivo. A quantificação das taxas de clivagem e de desenvolvimento de embrião de duas a quatro células 32 a 36 horas pós-fertilização foram considerados clivados, e no 7º dia da fecundação foi verificada a taxa de embriões formados e as classificações quanto o estágio de desenvolvimento (mórula compacta, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido). No 9º dia foi avaliado somente formação de blastocisto eclodido.

O delineamento foi inteiramente casualizado. A análise estatística foi realizada pelo procedimento PROC GLM (SAS, Inst.; Inc.; Cary, NC) usando 5% para significância.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de clivagem sobre a quantidade total de oócitos não diferiu entre os três tratamentos conforme tabela 1, sendo que T1 = $82,8 \pm 1,5\%$ (2540/3067), T2 = $81,2 \pm 1,5\%$ (2455/3024) e T3 = $84,9 \pm 1,50\%$ (2583/3043), $P < 0,05$. Entretanto, a taxa de embriões avaliados no D7 (blastocisto) foi menor no tratamento que foi utilizado sêmen congelado separando o plasma seminal por centrifugação (T2) comparado com os tratamentos T1 e T3, e os tratamentos T1 e T3 não diferiram entre si. No D7, T1 = $28,4 \pm 1,56\%$ (870/3067), T2 = $23,7 \pm 1,56\%$ (717/3024) e T3 = $29,8 \pm 1,56\%$ (908/3043), $P < 0,001$. Contudo, a taxa de embriões avaliados no D9 (blastocisto eclodido) foi maior no tratamento que foi utilizado sêmen congelado utilizando o Sperm Filter® (T3) comparado com os tratamentos T1 e T2. A taxa de blastocistos eclodidos avaliados no D9 para T1 foi de $21,7 \pm 1,47\%$ (665/3067), T2 = $20,2 \pm 1,4\%$ (612/3024) e T3 = $26,4 \pm 1,43\%$ (803/3043), $P < 0,001$.

Tabela 1. Taxa de clivagem (%), D7 (%) e D9 (%), em relação aos tratamentos T1, T2 e T3.

| | TRATAMENTOS | | | |
|------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|-------|
| | T1 | T2 | T3 | P |
| Taxa de clivagem | $82,8 \pm 1,5$ (2540/3067) | $81,2 \pm 1,5$ (2455/3024) | $84,9 \pm 1,50$ (2583/3043) | 0,23 |
| D7 | $28,4 \pm 1,56^a$ (870/3067) | $23,7 \pm 1,56^b$ (717/3024) | $29,8 \pm 1,56^{ac}$ (908/3043) | 0,006 |
| D9 | $21,7 \pm 1,47^a$ (665/3067) | $20,2 \pm 1,4^a$ (612/3024) | $26,4 \pm 1,43^b$ (803/3043) | 0,03 |

T1: Convencional; T2: Centrifugado; T3: Filtrado. *Letras diferentes na mesma linha indicam diferença ($p < 0,05$).

Através dos resultados apresentados, acredita-se que a retirada do plasma seminal pelo método de filtragem cause menor lesão à membrana do espermatozoide, comparado com o método de centrifugação que causa aparente injúria ao espermatozoide bovino prejudicando a fecundação e desenvolvimento embrionário (Knop et al., 2005; Sieme et al., 2006). Isto pode ser evidenciado principalmente na taxa de embriões no D9, a qual apresentou melhor resultado



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

quando comparado com os demais tratamentos. Anzar e Graham (1995) observaram que ao retirar o plasma seminal pelo método de filtração em coluna de sefadex/filtro de troca iônica juntamente com diluidor a base de Tris, melhorou a motilidade pós-descongelação afetando de forma positiva a cinética espermática. Campanholi et al. (2013) relataram que a retirada do plasma seminal interfere positivamente na cinética espermática do sêmen bovino criopreservado. Esses autores avaliaram o sêmen criopreservado com a presença ou ausência do plasma seminal (pelas técnicas de filtração e centrifugação) de 38 touros Nelore e relataram que houve melhora na cinética espermática ao realizar a separação do plasma seminal, em relação a congelação convencional. Entretanto, recentemente, Ramires Neto et al. (2013) compararam o uso do Sperm Filter® e o processo de centrifugação em sêmen equino e foi relatado que não ocorreu diferença entre os dois tratamentos nos parâmetros de cinética espermática, antes ou após a criopreservação. Os autores relataram que a maior vantagem do processo de filtração em relação à centrifugação é a maior taxa de recuperação de espermatozóides e praticidade no processo, devido à rapidez e o fato de não ser necessário o uso de centrifuga (Ramires Neto et al., 2013).

Sendo assim, podemos observar que houve uma melhora na produção *in vitro* de embriões no D7 e D9 quando utilizamos o sêmen que passou pelo tratamento de filtragem (T3). Porém, outros testes relativos à integridade de membrana e fertilidade *in vivo* devem ser feitos para avaliar se há alguma diferença entre os tratamentos de filtragem e centrifugação do plasma seminal de touros.

4 CONCLUSÃO

A utilização de sêmen congelado retirando o plasma seminal com o Sperm Filter® melhorou a produção de embriões *in vitro* avaliado no D9.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ (PIBIC) pela bolsa concedida e a FAPESP pelo apoio financeiro (Processo 2012/05555-8).

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANZAR, M.; GRAHAM, E.F. Effect of filtration on post-thaw quality of bull semen. *Theriogenology*, v.43, p.439-449, 1995.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

CAMPANHOLI, S. P.; MONTEIRO, F. M.; MERCADANTE, M. E. Z.; RIBEIRO, E. G. Efeito da remoção de plasma seminal na criopreservação de sêmen de touros *Bos indicus* coletados por eletroejaculador utilizando diferentes métodos de separação. . ANAIS, VII CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – CIIC, 7., Campinas, 2013. **Anais...** Campinas, p.1-8, 2013.

GARCIA, J.M.; AVELINO, K.B.; VANTINI, R. Estado da arte da fertilização in vitro em bovinos. *Biotecnologia da Reprodução em bovinos. 1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada.* p.223-230, 2004.

KNOP, K.; HOFFMANN, N.; RATH, D.; SIEME, H. Effects of cushioned centrifugation technique on sperm recovery and sperm quality in stallions with good and poor freezability. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.294-297, 2005.

LARSSON, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility. **Animal Reproduction Science**, v.60/61, p.327–336, 2000.

LEIBO, S.P.; BRADLEY, L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa, GAGNON, C. (Ed.) **The Male Gamete**, Vienna; Cache River, p. 501-516, 1999.

LONERGAN, P. The application of in vitro fertilization techniques to the prediction of bull fertility. **Reproduction Domestic Animal**, v.29, p.12–21, 1994.

MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P.; THIBIER, M.; THIBAUT, C. Evaluation of bull semen fertility by homologous in vitro fertilization tests. **Reproduction Nutrition Development**, v.30, p.259–266, 1990

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

SIEME, H.; KNOP, K.; RATH, D. Effects of cushioned centrifugation on sperm quality in stallion semen stored cooled at 5 degrees for 24h, and stored cooled for 2 or 24h and then frozen. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.99-103, 2006.

SUDANO, M.J.; CRESPILO, A.M.; FERNANDES, C.B.; MARTINS JUNIOR, A.; PAPA, F.O.; RODRIGUES, J.; MACHADO, R.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Use of bayesian inference to correlate in vitro embryo production and in vivo fertility in zebu bulls. **Veterinary Medicine International**, v.1–6, doi:10.4061/436381, 2011.

TIBARY, A.; GRAHAM, E.F.; ASR, A.; BOUKHLIQ, R.; DEYO, R. Effect of dialysis or centrifugation on postthaw motility and fertility of Santa Gertrudis bull semen collected by electroejaculation. **Theriogenology**, v.33, p.733-739, 1990.

WARD, F.; RIZOS, D.; CORRIDAN, D.; QUINN, K.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. **Molecular Reproduction Development**, v.60, p.47–55, 2001.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p. 481-492, 2000.

ZAHN, F.S.; PAPA, F.O.; MELO, C.M. Blood serum, seminal plasma and sperm membrane protein profiles in stallions: are they correlated to semen freezability. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.64–66, 2006.

ZHANG, B.R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N. RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Relationship between embryo development in vitro and 56-day nonreturn rates of cows inseminated with frozen-thawed semen from dairy bulls. **Theriogenology**, v.48, p.221–231, 1997.