



## **Universidade dos Açores**

Departamento de Ciências Agrárias

**Mestrado em Engenharia Zootécnica**

# **Adição de Ácido Linoleico conjugado (CLA) no diluidor de congelação de sémen de touro, recolhido Post-Mortem, das raças Holstein Frísia, Aberdeen Angus, Charolês e Limousine**

**Michelle René Pamplona Silva**

**Orientadores:**

Prof. Joaquim Fernando Moreira da Silva

**Angra do Heroísmo**

**2015**

## **Agradecimentos**

- À minha família por todo o incentivo ao longo da minha vida académica.

- Aos meus orientadores, professor Doutor Joaquim Fernando Moreira da Silva e Doutor António Chaveiro e a toda a equipa, pela sua pronta disponibilidade, incentivo, material facultado e conhecimentos ministrados. A forma como se envolveram na execução deste trabalho, nas suas diferentes fases, foi fundamental para o sucesso do mesmo.

- A todas as restantes pessoas que por algum motivo contribuíram para que tudo fosse possível.

## Resumo

O setor agro-pecuário tem uma grande importância a nível mundial e tem vindo a desenvolver-se levando os produtores, cada vez mais, a um maior profissionalismo e eficiência, havendo um maior investimento em tecnologias que incrementam os ganhos genéticos dos animais, sendo que a inseminação artificial, recorrendo a sémen congelado, uma ferramenta essencial em qualquer exploração de animais. Desta forma o objectivo deste trabalho foi adicionar ácido linoleico conjugado (CLA), em diferentes concentrações, (0, 100 e 200  $\mu\text{M}$ ) no diluidor de congelação de sémen de touro das raças Holstein Frísia, Aberdeen Angus, Charolês e Limousine e avaliar a motilidade espermática, a integridade dos acrossomas e a viabilidade do sémen antes e depois de congelar/descongelar. Para isso, foram recolhidos dezoito testículos de bovinos, das raças Holstein Frísia, Charolês, Limousine e Aberdeen Angus, para criopreservação de sémen obtido a partir do epidídimo. As análises laboratoriais avaliaram a motilidade por microscopia ótica de contraste de fase e por citometria de fluxo, a vitalidade e integridade da membrana plasmática (usando a técnica de coloração dupla com os fluorocromos PI e SYBR-14) e a vitalidade e integridade acrossómica (usando os fluorocromos PI e FITC-PSA). Para a análise estatística foi realizada uma análise de variância simples ANOVA, em que diferenças com  $P < 0,05$  foram consideradas significativas.

Relativamente à motilidade espermática, do sémen congelado, observou-se que, depois da descongelação, a motilidade diminuiu à medida que a concentração de CLA foi aumentando, tendo-se observado um decréscimo de motilidade do controlo ( $46,1\% \pm 2,5$ ), para ( $14,3\% \pm 1,3$ ) na concentração de

100 $\mu$ M e (5,2%  $\pm$  0,5), na concentração de 200 $\mu$ M. A viabilidade diminuiu consideravelmente após a criopreservação, observando-se que o sémen com 100  $\mu$ M de CLA não prejudicou a viabilidade, obtendo-se 39,0%  $\pm$  2,2 de SPZ vivos, descendo para 32,0%  $\pm$  2,9 com 200 $\mu$ M. No teste da integridade acrossômica, observou-se uma tendência para o aumento do número de acrossomas danificados ao adicionar-se CLA: no controlo observou-se o valor de 8,7%  $\pm$  0,5, aumentando para 11,2%  $\pm$  0,7 (100 $\mu$ M) ( $P < 0,05$ ) e 11,9%  $\pm$  0,9 (200 $\mu$ M), não sendo estatisticamente diferente entre os 100 e os 200  $\mu$ M. O número de gâmetas masculinos com membrana plasmática e acrossoma intactos manteve-se em aproximadamente 46%  $\pm$  1,4 independentemente da concentração de CLA utilizada.

Na comparação entre as raças Holstein Frísia, Charolês, Limousine e Aberdeen Angus, perante diferentes concentrações de CLA, no sémen fresco, a raça Holstein com 56,7%  $\pm$  2,3 foi o que apresentou menor motilidade relativamente às restantes raças (Charolês 72,5%  $\pm$  1,3; Limousine 75,0%  $\pm$  3,4 e Aberdeen Angus 75,0%  $\pm$  1,5). No sémen depois de congelado, as raças Aberdeen Angus e Limousine apresentam menor número de espermatozóides móveis do que as raças Holstein Frísia e Charolês. Por exemplo, no sémen com 200 $\mu$ M de CLA a raça Holstein teve o resultado de 6,7%  $\pm$  0,6, a Charolês 5,5%  $\pm$  1,4, a Limousine 3,0%  $\pm$  1,1 e a Angus 3,0%  $\pm$  0,7 de espermatozóides móveis. Quanto à viabilidade espermática, a raça Angus obteve valores superiores às restantes raças no sémen fresco (em média 70,9%  $\pm$  1,3) e congelado (em média 56,2%  $\pm$  2,1), e no sémen fresco, a Charolês, Limousine e Aberdeen Angus apresentaram valores semelhantes com uma média de 61,0%  $\pm$  3,3 de SPZ vivos. Quanto ao número de SPZ vivos após a

criopreservação, ao adicionar-se as concentrações de 100 e 200 $\mu$ M do ácido gordo em estudo este número foi diminuindo sendo a raça mais afetada a Holstein com 9,3%  $\pm$  1,3 nos 200 $\mu$ M de CLA. Estudando a integridade acrossômica, observou-se que no sémen fresco o número de espermatozóides com membrana e acrossoma intactos foi semelhante entre as raças rondando os 60,9%  $\pm$  1,9, em média. No sémen congelado, as raças Holstein e Charolês obtiveram piores resultados em comparação com as raças Limousine e Angus à medida que a concentração de CLA aumentava.

A realização de mais estudos, no que diz respeito à concentração de CLA e a comparação entre raças, será fundamental para ampliar a informação existente. Entre o “controle” e os 100  $\mu$ M de CLA poderá haver uma concentração ótima para a criopreservação e poderá vir-se a confirmar que o ácido gordo em estudo apenas tem efeito negativo em certas raças. Em fresco, e independentemente dos testes realizados a diferença de concentração de CLA não afeta significativamente os espermatozóides nas condições experimentais apresentadas.

**Palavras-chave:** espermatozóide, criopreservação, epidídimo, CLA, fertilidade

## **Abstract**

The agricultural sector has a great importance worldwide, and has been developing, leading producers to greater professionalism and efficiency, increased investment in technologies that increase genetic gains of animals, while artificial insemination using frozen semen is considered an essential tool in any farm. The objective of this work was to add conjugated linoleic acid (CLA) in different concentrations (0, 100 and 200  $\mu$ M) of semen in the freezing dilutor of Holstein Frisian bull, Aberdeen Angus, Charolais and Limousine and evaluate sperm motility, acrosomes integrity and viability of the semen before and after freeze/thaw. For that, we collected eighteen bovine testicles of the Holstein Frisian, Charolais, Limousine and Aberdeen Angus, for cryopreservation of semen obtained from the epididymis. The laboratory tests have assessed the motility by optical phase contrast microscopy and flow cytometry, the vitality and integrity of the plasma membrane (using the technique of double staining with fluorochromes PI and SYBR-14) and the vitality and acrosome integrity (using the PI fluorochromes and FITC-PSA). For statistical analysis was conducted a simple analysis of variance ANOVA, in which differences with  $P < 0.05$  were considered significant.

Regarding the sperm motility of the frozen semen, it was observed that, after thawing, motility decreased as the concentration of CLA was increasing, having been observed a decrease of motility ( $46,1\% \pm 2,5$ ), to ( $14,3 \pm 1,3$ ) at a concentration of 100  $\mu$ M ( $5,2 \pm 0,5$ ), at a concentration of 200  $\mu$ M. The viability considerably decreased after cryopreservation, observing that the semen with 100  $\mu$ M didn't hurt the viability of CLA,  $39,0\% \pm 2,2$  of SPZ alive, dropping to  $32,0\% \pm 2,9$  with 200  $\mu$ M. On the acrosome integrity test, it was observed a

tendency for an increase in the number of damaged acrosomes added CLA: in control it was observed the value of  $8,7 \pm 0,5$ , increasing to  $11,2\% \pm 0,7$  (100  $\mu\text{M}$ ) ( $P < 0.05$ ) and  $11,9\% \pm 0,9$  (200  $\mu\text{M}$ ), not statistically different between the 100 and the 200  $\mu\text{M}$ , the number of male gametes with plasma membrane and acrosome remained intact at approximately  $46,0\% \pm 1,4$  regardless of the concentration of CLA used.

On comparison between the races Holstein Frisian, Charolais, Limousine and Aberdeen Angus, faced with different concentrations of CLA, in fresh semen, the Holstein breed with  $56,7\% \pm 2,3$  was what showed lower motility with respect to the remaining races (Charolais  $72,5\% \pm 1,3$ ; Limousine  $75,0\% \pm 3,4$  and Aberdeen Angus  $75,0\% \pm 1,5$ ). In semen after frozen, Aberdeen Angus breeds and Limousine feature fewer motile spermatozoa than the Holstein Frisian and Charolais breeds. For example, in the semen with 200  $\mu\text{M}$  CLA race Holstein had the result of  $6,7\% \pm 0,6$ ,  $5,5\% \pm 1,4$  Charolais, Limousine  $3,0\% \pm 1,1$  and Angus  $3,0\% \pm 0,7$  of motile spermatozoa. Sperm viability, the Angus breed obtained values superior to other races in fresh semen ( $70,9\%$  average  $\pm 1,3$ ) and frozen (average  $56,2\% \pm 2,1$ ), and in the fresh semen, the Charolais, Limousine and Aberdeen Angus presented similar values with an average of  $61,0\% \pm 3,3$  of alive SPZ's. As for the number of alive SPZ after cryopreservation, to add the concentrations of 100 and 200  $\mu\text{M}$  fatty acid in studying this number has been decreasing and the affected Holstein breed with  $9,3\% \pm 1,3$  200  $\mu\text{M}$  us of CLA. Studying the acrosome integrity, it was observed that in fresh semen the number of sperm with intact acrosome and membrane was similar between the races around  $60,9\% \pm 1,9$ , on average. In frozen

semen, Holstein and Charolais breeds obtained worse results in comparison to the Limousine and Angus breeds as the CLA concentration increased.

The completion of further studies as regards the concentration of CLA and the comparison between races will be essential to enlarge the existing information. Between "control" and 100  $\mu\text{M}$  CLA can be a great concentration for the cryopreservation and could confirm that the studied fatty acid only has negative effects in certain races. When fresh, and regardless of the tests, the difference in concentration of CLA does not affect significantly the sperm in experimental conditions.

**Keywords:** spermatozoa, cryopreservation, epididymis, CLA, fertility



## Lista de Figuras

<b>Figura 1-</b>	Aparelho reprodutor masculino (Swenson e Reece, 1996) .....	18
<b>Figura 2-</b>	Fases da Espermatogénese (Huleihel e Lununfeld, 2004).....	24
<b>Figura 3 -</b>	Composição do Espermatozoide (Flesch e Gadella, 2000).....	25
<b>Figura 4-</b>	Recolha de testículos no matadouro.....	44
<b>Figura 5 -</b>	Caixa termorreguladora utilizada para manter a temperatura ambiente durante o transporte.....	44
<b>Figura 6-</b>	Separação do epidídimo do testículo.....	45
<b>Figura 7-</b>	Remoção da cauda do epidídimo.....	45
<b>Figura 8-</b>	Incisão e pressão sobre a cauda do epidídimo para a libertação do sémen na solução "Tris".....	45
<b>Figura 9-</b>	Câmara de Neubauer.....	47
<b>Figura 10-</b>	Esquema de contagem de espermatozoides utilizado.....	47
<b>Figura 11-</b>	Camara de congelação onde foram colocadas as palhinhas.....	48
<b>Figura 12-</b>	Curva de diminuição da temperatura das palhinhas.....	48
<b>Figura 13-</b>	Colocação das palhinhas em azoto líquido após congelação.....	48
<b>Figura 14-</b>	Avaliação da motilidade espermática.....	50
<b>Figura 15-</b>	Típico gráfico que mostra a distribuição de citometria de fluxo de eventos e as intensidades de fluorescência de SYBR-14 (FL1-H) e iodeto de propídio (PI) (FL3-A).....	51
<b>Figura 16-</b>	Típico gráfico que mostra a distribuição de citometria de fluxo de eventos e as intensidades de fluorescência do iodeto de propídio e FITC (PI).....	53
<b>Figura 17-</b>	Motilidade Espermática para as diferentes concentrações de CLA. As diferentes letras em cada coluna indicam as diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) para cada concentração.....	54
<b>Figura 18-</b>	Viabilidade Espermática para as diferentes concentrações de CLA. As diferentes letras em cada coluna indicam as diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) para cada concentração.....	55
<b>Figura 19-</b>	Percentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossoma intacto para as diferentes concentrações de CLA. As diferentes letras em cada coluna indicam as diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) para cada concentração.....	56
<b>Figura 20-</b>	Percentagem de espermatozoides com membrana plasmática intacta e acrossoma danificado para as diferentes concentrações de CLA. As diferentes letras em cada coluna indicam as diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) para cada concentração.....	57
<b>Figura 21-</b>	Motilidade Espermática para as diferentes raças consoante as concentrações de CLA, no sémen fresco. As diferentes letras em cada coluna indicam as diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) para cada concentração.....	58
<b>Figura 22-</b>	Motilidade Espermática para as diferentes raças consoantes as concentrações de CLA, no sémen congelado. As diferentes letras em cada coluna indicam as diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) para cada concentração.....	59
<b>Figura 23-</b>	Viabilidade Espermática para as diferentes raças consoante as concentrações de CLA, no sémen fresco. As diferentes letras em cada	

	coluna indicam as diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) para cada concentração.....	60
<b>Figura 24-</b>	Viabilidade Espermática para as diferentes raças consoante as concentrações de CLA, sémen congelado. As diferentes letras em cada coluna indicam as diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) para cada concentração.....	61
<b>Figura 25-</b>	Percentagem de espermatozóides com membrana plasmática e acrossoma intacto para as diferentes raças consoante as concentrações de CLA, no sémen fresco. As diferentes letras em cada coluna indicam as diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) para cada concentração.....	63
<b>Figura 26-</b>	Percentagem de espermatozóides com membrana plasmática e acrossoma intacto para as diferentes raças consoante as concentrações de CLA, no sémen congelado. As diferentes letras em cada coluna indicam as diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) para cada concentração.....	64
<b>Figura 27-</b>	Percentagem de espermatozóides com membrana plasmática intacta e acrossoma danificado para as diferentes raças consoante as concentrações de CLA, no sémen fresco. As diferentes letras em cada coluna indicam as diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) para cada concentração.....	65
<b>Figura 28-</b>	Percentagem de espermatozóides com membrana plasmática intacta e acrossoma danificado para as diferentes raças consoante as concentrações de CLA, no sémen congelado. As diferentes letras em cada coluna indicam as diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) para cada concentração.....	66

## Lista de Abreviaturas

%	Porcentagem
Células/ml	Células por ml
Cm	Centímetros
Eventos/s	Eventos por segundo
G/l	Gramas por litro
Hz	Hertz
M	Molar
Mg/ml	Miligramas por mililitro
Min.	Minutos
ml	Mililitros
Mm	Milímetros
mM	Milimolar
mW	Megawatt
N	Amostra
Nm	Nanómetro
°C	Centígrados
P	Nível de significância
Xs	Vezes
ACPs	Agentes crioprotetores
BSA	Albumina do Soro Bovino
CLA	Ácido linoleico conjugado
FITC-PSA	Pisum sativum agglutinin conjugada com isotiocianato de fluoresceína
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
IA	Inseminação artificial
EFA	Ácidos gordos essenciais
MP	Membrana plasmática
PI	Iodeto de propídeo
PBS	Tampão fosfato salino
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados
PVA	Polivinilcool
SPZ	Espermatozoides
SYBR-14	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
ml	Microlitros
µM	Micrometros

## Índice

Agradecimentos.....	2
Resumo.....	3
Abstract.....	6
Lista de Figuras.....	9
Lista de Abreviaturas .....	11
Índice.....	12
I. Introdução.....	16
II. Revisão Bibliográfica.....	18
2. Reprodução do toiro.....	18
2.1. Anatomia do aparelho reprodutor.....	18
2.2. Fisiologia do aparelho reprodutor.....	23
2.2.1. Puberdade.....	23
2.2.2. Espermatogénese.....	24
2.2.3. Espermatozoide.....	25
2.2.3.1. Espermatozoide do Epidídimo.....	27
2.2.4. Sémen.....	28
3. Criopreservação .....	28
3.1. Princípios da Criopreservação.....	28
3.1.1. Diluidores.....	30
3.1.2. Crioprotetores.....	30

3.2.	Criopreservação de espermatozóides do Epidídimo.....	32
4.	Ácidos Gordos- constituintes da membrana celular.....	33
4.1.	Ácido linoleico conjugado- CLA.....	34
5.	Avaliação laboratorial das características de sémen de bovino congelado.....	36
5.1.	Avaliação da motilidade espermática.....	36
5.2.	Avaliação da concentração espermática.....	38
5.3.	Avaliação da morfologia espermática.....	39
5.4.	Avaliação da integridade da membrana plasmática.....	40
5.5.	Avaliação da integridade do acrossoma.....	41
5.6.	Fertilização <i>in vitro</i> .....	41
6.	Citometria de Fluxo.....	42
III.	Materiais e Métodos.....	44
3.1.	Recolha e transporte dos testículos.....	44
3.2.	Recolha do Sémen do Epidídimo.....	45
3.3.	Cálculo da concentração de sémen e volume de diluidor a adicionar .....	46
3.4.	Adição de Ácido linoleico conjugado- CLA.....	47
3.5.	Preparação das palhinhas de sémen.....	47
3.6.	Congelação das palhinhas de sémen.....	48
3.7.	Descongelção das palhinhas de sémen .....	49
3.8.	Avaliação da Motilidade espermática.....	49

3.9.	Citometria de fluxo.....	50
3.9.1.	Avaliação da Integridade da Membrana e Viabilidade espermática.....	50
3.9.2.	Integridade Acrossómica .....	52
3.10.	Análise Estatística.....	53
IV.	Resultados.....	54
4.1.	Comparação entre as diferentes concentrações de CLA.....	54
4.1.1.	Teste da Motilidade Espermática.....	54
4.1.2.	Teste de Viabilidade Espermática.....	55
4.1.3.	Teste de Integridade Acrossómica.....	56
4.1.3.1.	Membrana Plasmática e Acrossoma Intatos.....	56
4.1.3.2.	Membrana Plasmática Intata e Acrossoma Danificado..	57
4.2.	Comparação entre as diferentes raças perante diferentes concentrações de CLA.....	58
4.2.1.	Teste da Motilidade Espermática.....	58
4.2.1.1.	Sémen Fresco.....	58
4.2.1.2.	Sémen Congelado.....	59
4.2.2.	Teste da Viabilidade Espermática.....	60
4.2.2.1.	Sémen Fresco.....	60
4.2.2.2.	Sémen Congelado.....	61
4.2.3.	Teste de Integridade Acrossómica.....	62

4.2.3.1.	Membrana Plasmática e Acrossoma Intatos.....	62
4.2.3.1.1.	Sémen Fresco.....	62
4.2.3.1.2.	Sémen Congelado.....	64
4.2.3.2.	Membrana Plasmática Intata e Acrossoma Danificado.....	65
4.2.3.2.1.	Sémen Fresco.....	65
4.2.3.2.2.	Sémen Congelado.....	66
V.	Discussão.....	68
VI.	Conclusão.....	73
VII.	Bibliografia.....	75

## I. Introdução

Atualmente o uso de biotecnologias associadas à produção animal, nomeadamente a inseminação artificial, proporciona enormes vantagens em termos de variabilidade e melhoramento genético, de forma a tornar o sector agro-pecuário cada vez mais competitivo. A inseminação artificial, recorrendo a sémen criopreservado é uma prática económica tornando possível a obtenção de um número elevado de animais de elevado valor genético, independentemente do local onde os animais se encontrarem.

A criopreservação consiste no abaixamento da temperatura de forma a reduzir o metabolismo celular, permitindo que as células ou os tecidos sejam conservados por períodos indeterminados, preservando a continuação do desenvolvimento celular após o armazenamento em azoto líquido, a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Pegg, 2007). Watson em 1995, comprovou que durante a criopreservação há uma redução de cerca de 50% de espermatozóides (SPZ) devido ao stress térmico, pelo que muitas células não resistem à congelação e acabam por morrer. Ainda assim é necessário que um número suficiente de SPZ sobreviva e mantenha a sua integridade estrutural e funcional, depois da descongelação, para que possa ocorrer o processo de fecundação aquando da inseminação artificial ou fecundação *in vitro* com esse sémen.

As células espermáticas quando submetidas aos processos de refrigeração e posterior congelação passam por variadas situações de stress osmótico devido às elevadas contrações de soluto nos meios diluidores e pela formação de cristais de gelo no meio extracelular, os quais alteram a



organização bidimensional dos lípidos da membrana (Holt, 2000). Para garantir o sucesso da criopreservação, são adicionadas substâncias conhecidas como agentes protetores (ACPs) que proporcionam uma crioproteção celular e tecidual durante a redução da temperatura (Vajta *et al.*, 2007), podendo os crioprotetores ser classificados com penetrantes ou intracelulares, como exemplo o glicerol, e não penetrantes ou extracelulares como grandes moléculas como as proteínas (Graham, 1995). Ácidos gordos essenciais (ácido linoleico e linolenico), ácidos gordos polinsaturados (PUFA) e o CLA, são utilizados como ACPs por alterarem a composição da membrana lipídica em diversas células (Sampath e Ntambi, 2005). Estes ACPs estão presentes nos lípidos da membrana plasmática (Ringseis *et al.*, 2008; Amaru e Field, 2009) e provocam modificações na sua estrutura e função (Zhao *et al.*, 2011a; Subbaiah *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2001b). O CLA é um conjunto de isômeros posicionais e geométricos do ácido octadecadienoico com duplas ligações conjugadas (posições 9 e 11, 10 e 12, entre outras), podendo ser *cis* e *trans* em ambas as configurações (Pariza, 2004; Wahle *et al.*, 2004).

Uma vez que a adição de ácidos gordos pode influenciar a estabilidade das membranas num processo de criopreservação, e existem poucos estudos referentes a esse efeito, o objetivo do presente trabalho foi adicionar ácido linoleico conjugado (CLA), em diferentes concentrações, no diluidor de congelação de sémen de touro das raças Holstein Frísia, Aberdeen Angus, Charolês e Limousine e avaliar a motilidade espermática, a integridade dos acrossomas e a viabilidade do sémen antes e depois de congelar/descongelar.