

## TRIS-PLASMA-DE-GEMA NO RESFRIAMENTO DE SEMEN FELINO

FERNANDA RODRIGUES MENDONÇA<sup>1</sup>; INARAÃ DIAS LUZ<sup>2</sup>, IZANI BONEL ACOSTA<sup>3</sup>, CAROL VIÉGAS PINTO<sup>4</sup>, CARINE DAHL CORCINI<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [nandarm.vet@gmail.com](mailto:nandarm.vet@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [inadiasmedvet@gmail.com](mailto:inadiasmedvet@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [izanibonel@hotmail.com](mailto:izanibonel@hotmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [carolinaviegas18@gmail.com](mailto:carolinaviegas18@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [corcinicd@gmail.com](mailto:corcinicd@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

O processo de resfriamento e congelamento pode ter vários efeitos adversos sobre o sêmen, levando a uma redução na sua capacidade de fertilização e potencialmente causando danos à prole (NUSBAUMER, 2019). Entre os efeitos prejudiciais estão o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), danos ao DNA, apoptose, dano à membrana celular e lesões no acrossoma (EZZATI, 2020). As técnicas de reprodução assistida buscam restaurar esse potencial reprodutivo e/ou preservar a viabilidade das células reprodutivas. Nesse contexto, a teriogenologia se dedica a encontrar alternativas viáveis para aumentar o sucesso reprodutivo (HORVATH-PEREIRA *et al.*, 2023).

A adição de crioprotetores e diluentes à amostra tem como finalidade principal reduzir os danos causados durante o processo de congelamento. Isso é alcançado através de um controle mais preciso da pressão osmótica, estabilização da membrana celular e prevenção da formação de cristais de gelo tanto dentro quanto fora das células (EZZATI, 2020). Na maioria das espécies, os meios de preservação do esperma incluem uma solução tampão (Tris), fonte de energia (glicose ou semelhante), crioprotetor permeável (glicerol) e crioprotetor não permeável (gema de ovo), podendo incluir outros aditivos como antioxidantes, vitaminas e antibióticos (ABDELHAFEZ *et al.*, 2009).

A gema de ovo tem sido usada regularmente para proteger o sêmen, visto que possui a capacidade de prevenir a formação de ROS, diminuir o ponto de congelamento do meio e reduzir a formação de cristais de gelo. Porém existem algumas características desfavoráveis, como desvantagens sanitárias, presença de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e composição inconsistente (AKTHER *et al.*, 2011), e quase todas as desvantagens podem ser diminuídas com a utilização da fração de plasma (PILLET *et al.*, 2011).

São duas as partes componentes principais da gema: plasma e grânulos. O plasma é composto majoritariamente por lipoproteínas de baixa densidade (LDL), enquanto os grânulos possuem como principal componente o HDL (MEHDIPOUR *et al.*, 2018). O HDL é conhecido por ser uma estrutura desfavorável e que perturba a função do esperma, além de atrapalhar a leitura dos campos (SCHAFER-SÖMI *et al.*, 2021). O LDL possui a habilidade de interagir com as proteínas do plasma seminal e a membrana plasmática, formando uma rede protetora e evitando a perda de fosfolípidios e ânions (BERGERON *et al.*, 2006).

O objetivo deste trabalho é apresentar os resultados preliminares de um estudo mais abrangente que está sendo conduzido para avaliar a eficácia do Tris-plasma-de-gema (TEYP) em comparação com o diluente de controle Tris-gema (TEY) no resfriamento do sêmen de gatos

## 2. METODOLOGIA

Os complexos testículo-epidídimo (CTE) foram obtidos através de veterinários parceiros. Após excisão cirúrgica, os CTEs de cada animal foram alocados em tubos plásticos *Falcon* de 50 mL, contendo solução salina a 0,9% e transportados para o laboratório, onde foram processados em até 12 horas. Os epidídimos inteiros foram alocados em placas Petri e picados com lâmina de bisturi em 0,5 mL de PBS a 37°C e mantidos aquecidos nessa temperatura por 10 minutos, para permitir que os espermatozoides flutuem para o meio (PINTUS, 2021). O PBS, então, foi filtrado em tamises de malha 200µm e concentração ajustada para  $60 \times 10^6$  (ROWLISON, 2021).

As amostras foram estendidas com o diluente teste ou controle, aleatoriamente distribuídos nos grupos, que eram: controle (TEY 20%) ou teste (TEYP 10%, 20% ou 30%). Uma alíquota de 2 µL foi retirada para mensuração da cinética espermática através do sistema automatizado *Computer Assisted Sperm Analysis* (Sperm Vision® 3.5, Minitub, Tiefenbach, Germany), em microscópio de contraste de fase 200 X (Axio Scope A1®, Zeiss, Germany). Os parâmetros avaliados neste estudo incluíam motilidade total, motilidade progressiva, velocidade linear progressiva, velocidade média da trajetória, retilineariedade, lineariedade e outros. As amostras foram avaliadas frescas e após de 24, 48 e 72 horas, e os dados serão analisados estatisticamente.

## 3. RESULTADOS ESPERADOS

O mercado pet brasileiro é um dos maiores e mais resilientes do mundo; ocupa sexto lugar em faturamento e apresentou uma alta de mais de 40% em dois anos, mesmo durante a pandemia. Deste modo, a procura por tecnologias ligadas à reprodução de gatos tem aumentado progressivamente, ainda mais se considerarmos que, devido ao padrão de vida na atual sociedade, o gato tem se tornado um pet cada vez mais popular. Com essa popularização em mente, evidencia-se a suma importância e relevância na confecção de um diluente mais eficiente para a manutenção da célula espermática de gatos durante o manejo laboratorial.

Para que os resultados obtidos sejam positivos em relação a preservação dos espermatozoides pelo frio, é indispensável o desenvolvimento de diluentes confiáveis e que garantam a máxima proteção à célula espermática durante o estresse térmico a que são submetidas durante o manejo laboratorial, não apenas de forma a garantir uma amostra de alto padrão e aproveitamento, mas também a geração de descendentes saudáveis.

O diluente Tris-gema tem sido usado como diluente padrão em diversas espécies (BERGERON *et al.*, 2006), uma vez que possui resultados aceitáveis ao descongelamento. A gema de ovo de galinha é comumente adicionada ao diluente tris, pois promove a proteção da membrana plasmática e restaura fosfolípidos perdidos durante o processamento, formando o diluente TEY (SILVA, 2005). O tris-plasma-de-gema é obtido ao se ultra centrifugar TEY a 4°C.

Ao passar por esse processo, nos livramos das moléculas mais pesadas, que decantam para o fundo. Essas moléculas são compostas majoritariamente por HDL e grânulos, que prejudicam a respiração e a motilidade espermática, além de dificultarem as leituras dos campos (SCHÄFER-SOMI *et al.*, 2021). Além disso, esses componentes aumentam a viscosidade do diluente, o que resulta em uma

diminuição geral na qualidade do sêmen. Isso ocorre devido ao considerável aumento na atividade da acrosina, que é desencadeada pelo efluxo de colesterol na membrana plasmática e pela alteração de sua fluidez (CHELUCCI *et al.*, 2015).

O TEYP foi previamente empregado com êxito no sêmen de diversas espécies, como búfalos (SHAH *et al.*, 2017), galos (PANAHI *et al.*, 2017) e cães (SCHÄFER-SOMI *et al.*, 2021), contudo ainda não foi avaliado em gatos. Em geral, observa-se uma correlação direta entre as concentrações de TEYP que apresentam melhor desempenho e as concentrações de TEY mais eficazes na espécie em questão. Ou seja, se uma concentração de TEY de 20% é a mais eficaz para uma determinada espécie, é razoável esperar que uma concentração de TEYP de 20% também resultaria em um desempenho superior.

Com base nas evidências adicionais fornecidas pelos estudos anteriormente mencionados, fica claro que o desempenho do TEYP pode variar dependendo da concentração utilizada e da espécie animal em questão, além da variação de quaisquer aditivos que sejam adicionados. Os resultados encontrados por Singh *et al.* (2020) sugerem que uma concentração de TEYP de 15% pode ser a mais eficaz em carneiros, contudo, Mortazavi e outros (2020) encontraram como melhor diluente em seu estudo o TEYP 28%, porém este estava associado a crioprotetores intracelulares. Belala *et al.* (2018) encontraram uma concentração de 40% como a mais efetiva em cães. Já em galos, os melhores resultados parecem girar em torno da concentração de 20% (PANAHI *et al.*, 2017; MEHDINPOUR *et al.*, 2018).

Essas descobertas destacam a importância de ajustar as concentrações de TEYP de acordo com a espécie animal e as condições específicas do experimento. A escolha da concentração adequada pode ter um impacto significativo no sucesso do TEYP como diluente. Desta forma, o objetivo deste experimento foi testar três concentrações diferentes do tris-plasma-de-gema; essas concentrações serão avaliadas com base na concentração de gema de ovo que demonstrou o melhor desempenho no diluente TEY em gatos, que é de 20% (BURANAAMNUAY, 2015). O estudo busca determinar qual das concentrações do TEYP é mais eficaz, comparando-as com a concentração de gema de 20% como referência.

#### 4. CONCLUSÕES

Dadas as informações anteriores, é plausível antecipar que o tris-plasma-de-gema, com uma concentração de 20% de gema de ovo de galinha, superará os demais diluentes testados neste experimento. Vale ressaltar que a análise estatística dos dados ainda está pendente e, portanto, não está incluída neste resumo. No entanto, com base nos dados apresentados, os quais se fundamentam em artigos científicos revisados por pares, é possível fazer uma projeção de que o TEYP 20% possa demonstrar uma vantagem estatisticamente significativa em relação aos outros diluentes.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELHAFEZ, Faten et al. Techniques for cryopreservation of individual or small numbers of human spermatozoa: a systematic review. **Human Reproduction Update**, v. 15, n. 2, p. 153-164, 2009.

AKHTER, S. et al. Effect of low density lipoproteins in extender on freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. **Theriogenology**, v. 76, n. 4, p. 759-764, 2011.

- BELALA, Réda et al. A comparison of liquid and lyophilized egg yolk plasma to low density lipoproteins for freezing of canine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 8, p. 1131-1138, 2019.
- BERGERON, Annick; MANJUNATH, Puttaswamy. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular reproduction and development**, v. 73, n. 10, 2006.
- BURANAAMNUAY, K. Determination of appropriate cryopreservation protocols for epididymal cat spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 3, p. 378-385, 2015.
- CHELUCCI, Sara et al. Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 83, n. 6, p. 1064-1074, 2015.
- EZZATI, Maryam et al. Influence of cryopreservation on structure and function of mammalian spermatozoa: An overview. **Cell and Tissue Banking**, v. 21, p. 1-15, 2020
- HORVATH-PEREIRA, Bianca de Oliveira et al. Biomaterials for Testicular Bioengineering: How far have we come and where do we have to go?. **Frontiers in Endocrinology**, v. 14, p. 1085872, 2023.
- MEHDIPOUR, Mahdih et al. Effect of egg yolk plasma and soybean lecithin on rooster frozen-thawed sperm quality and fertility. **Theriogenology**, v. 116, 2018
- MORTAZAVI, Sayed-Hesam; ESLAMI, Mohsen; FARROKHI-ARDABILI, Farhad. Comparison of different carrier-compounds and varying concentrations of oleic acid on freezing tolerance of ram spermatozoa in tris-citric acid-egg yolk plasma semendiluent. **Animal Reproduction Science**, v. 219, p. 106533, 2020.
- NUSBAUMER, David; MARQUES DA CUNHA, Lucas; WEDEKIND, Claus. Sperm cryopreservation reduces offspring growth. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 286, n. 1911, p. 20191644, 2019.
- PANAHI, Farnaz et al. Supplementation of tris-based extender with plasma egg yolk of six avian species and camel skim milk for chilled preservation of dromedary camel semen. **Animal reproduction science**, v. 184, p. 11-19, 2017.
- PILLET, Elodie et al. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. **Theriogenology**, v. 75, n. 1, p. 105-114, 2011.
- PINTUS, Eliana et al. Spermatogenic activity and sperm traits in post-pubertal and adult tom cats (*Felis catus*): Implication of intra-male variation in sperm size. **Cells**, v. 10, n. 3, p. 624, 2021.
- ROWLISON, Tricia; OTTINGER, Mary Ann; COMIZZOLI, Pierre. Exposure to epididymal extracellular vesicles enhances immature sperm function and sustains vitality of cryopreserved spermatozoa in the domestic cat model. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 38, n. 8, p. 2061-2071, 2021.
- SCHÄFER-SOMI, Sabine et al. Using egg yolk in a TRIS-Equex STM paste extender for freezing of dog semen is superior to egg yolk plasma, also after addition of lecithin and catalase. **Cryobiology**, v. 100, p. 63-71, 2021.
- SHAH, S. Aftab Hussain et al. Chicken egg yolk plasma in tris-citric acid extender improves the quality and fertility of cryopreserved water buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. **Theriogenology**, v. 89, p. 32-40, 2017.
- SILVA, A. R. Criopreservação do sêmen canino diluído em tris: avaliação morfológica, funcional e de suas interações com oócitos homólogos. **Tese (Doutorado)**. Fortaleza, Ceará, Brasil. 2005.
- SINGH, Bipanpreet et al. Effects of EggYolk and EggYolk Plasma Tris-Base Extenders on Beetal Buck Semen Preservation. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 9, n. 11, p. 1853-1864, 2020.