

EFEITO DE MEIOS DILUENTES NA VIABILIDADE DE SÊMEN CONGELADO BOVINO

Marcelo George Mungai Chacur¹
Huberson Sanches Dias²
Frederico Ozanam Papa³
Bruno Alves Louvison⁴
Mayra Micarelli Calesco⁴
Patrícia de Mello Papa⁴

RESUMO

O aumento da produtividade na pecuária pode ser adquirido com o emprego de biotécnicas como a inseminação artificial. O objetivo deste trabalho foi testar a viabilidade de novos meios de congelamento de sêmen para touros classificados como de muito boa e regular congelabilidade. Foram utilizados 10 touros zebuínos, sendo classificados como de muito boa (n=5) e regular (n=5) congelabilidade. Os ejaculados foram congelados com os meios: TRIS-gema, Botu-Bov[®] e Botu-Bov Egg Free[®] e avaliados pela análise computadorizada (CASA) e integridade da membrana por fluorescência. A estatística foi realizada por ANOVA e teste de Tukey a 5%. Não houve diferença (p>0,05) entre os touros de muito boa e regular congelabilidade, na pré-congelamento. Houve superioridade dos diluentes Botu-Bov[®] e Botu-Bov Egg Free[®] (p<0,05) para CASA: MP, ALH, BCF, STR, LIN e RAP, para touros de regular congelabilidade. Os touros de regular congelabilidade apresentaram superioridade (p<0,05) no Botu-Bov Egg Free[®] sobre o Botu-Bov[®] nos parâmetros MT e VSL. Houve superioridade dos diluentes Botu-Bov[®] e Botu-Bov Egg Free[®] (p<0,05) nos parâmetros BCF e STR em touros de muito boa congelabilidade. Os meios Botu-Bov[®] e Botu-Bov Egg Free[®] apresentaram superioridade na maioria dos parâmetros avaliados pelo CASA, principalmente em touros de regular congelabilidade.

Palavras-chave: touros, espermatozóide, criopreservação, CASA, integridade de membrana.

EFFECT OF DIFFERENT EXTENDERS ON VIABILITY OF BOVINE FROZEN SEMEN

ABSTRACT

The increase number in the livestock can be acquired with the use of bio techniques as artificial insemination. The aim of this study was to test the viability of new extenders of freezing semen for bulls classified as very good and regular freezability. Ten zebu bulls was used, being classified as very good freezability (n=5) and regular one (n=5). The ejaculates were frozen using the extenders TRIS-egg yolk, Botu-Bov[®] and Botu-Bov Egg Free[®]; evaluated by computer analysis (CASA) and the membrane integrity by fluorescence. The statistics was realized by ANOVA and Tukey test at 5%. No difference (p>0.05) between bulls of very good and regular frozen, pre-freeze was found in the tests. However, there was the superiority of Botu-Bov[®] and Botu-Bov Egg Free[®] (p<0.05) for CASA: MP, ALH, BCF,

¹ Professor do Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias – FCA, Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE, Rodovia Raposo Tavares, Km 572, Campus II, Hospital Veterinário, CEP 19067-175. Presidente Prudente, SP/Brasil, chacur@unoeste.br tel: (18) 3229-2077, FAX: (18) 3229-2080.

² Mestre em Ciência Animal pela UNOESTE (ex-orientado), Presidente Prudente - SP

³ Professor do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ-UNESP, Botucatu-SP.

⁴ Ex-orientados de Iniciação Científica, Medicina Veterinária - UNOESTE, Presidente Prudente - SP

STR, LIN and RAP for regular freezability. The bulls that have regular freezability also presented superiority ($p < 0.05$) to Botu-Bov Egg-Free[®] and Botu-Bov[®] in the MT and VSL parameters. There was also the superiority of Botu-Bov[®] and Botu-Bov Egg Free[®] ($p < 0.05$) in BCF and STR parameters used in bulls of very good freezability. The extenders Botu-Bov[®] and Botu-Bov Egg Free[®] presented superiority in most parameters that were analyzed using the system CASA, mainly in bulls with regular freezability.

Keywords: bulls, spermatozoa, cryopreservation, CASA, membrane integrity.

EFEECTO DE DISOLVENTES SOBRE LA VIABILIDAD DE SEMEN DE BOVINO CONGELADO

RESUMEN

El aumento de la productividad pecuaria puede ser logrado con el uso de biotécnicas como la inseminación artificial. El objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad de nuevas medios de congelación de semen de bovino que presenta congelabilidad alta y regular. Fueron utilizados eyaculados de 10 toros cebuinos, clasificados como de congelabilidad alta ($n=5$) y regular ($n=5$). Los eyaculados fueron congelados con los diluyentes TRIS-yema, Botu-Bov[®] y Botu-Bov Egg Free[®] y evaluados por análisis computadorizado (CASA). Así mismo, la integridad de membrana fue evaluada por fluorescencia. Fue realizado análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey al 5%. No hubo diferencia ($p > 0,05$) entre el semen de alta y baja congelabilidad antes de la congelación. Los diluyentes Botu-Bov[®] y Botu-Bov Egg Free[®] se mostraron superiores ($p < 0,05$) ante CASA: MP, ALH, BCF, STR, LIN y RAP para el semen de congelabilidad regular. El semen de congelabilidad regular presentó superioridad ($p < 0,05$) en los parámetros MT y VSL cuando fue usado el diluyente Botu-Bov Egg Free[®] con relación al Botu-Bov[®]. También hubo superioridad de los diluyentes Botu-Bov[®] y Botu-Bov Egg Free[®] ($p < 0,05$) en los parámetros BCF y STR en semen de congelabilidad alta. Los disolventes Botu-Bov[®] y Botu-Bov Egg Free[®] fueron mejores en la mayoría de los parámetros evaluados por CASA, principalmente en semen de congelabilidad regular.

Palabras clave: toros, espermatozoide, crio preservación, CASA, integridad de membrana.

INTRODUÇÃO

O segmento da pecuária bovina, inserido no agronegócio, assume papel de destaque na economia do país pelo elevado potencial e taxa de crescimento. O aumento da produtividade nesse setor pode ser alavancado com o emprego de biotécnicas que melhorem o sistema de produção (1). Neste sentido, a inseminação artificial (IA) é um instrumento importante para contribuir para o avanço das modernas técnicas de produção animal (1, 2).

Durante o processo de criopreservação, ocorre queda de aproximadamente 50% da viabilidade espermática devido aos efeitos osmóticos e térmicos, modificando a estrutura da membrana espermática, bem como da sua fluidez, permeabilidade e composição lipídica (3). Modificações na estrutura e na fluidez da membrana levam os espermatozoides submetidos à congelação/descongelação a sobreviver menos tempo no trato reprodutivo da fêmea em comparação com espermatozoides oriundos do sêmen fresco (4).

A interação entre as células espermáticas e o meio diluidor representa um fator crucial para a preservação da integridade espermática e habilidade de fecundação (5). Um meio diluente eficaz tem como finalidade de proteger a célula espermática durante as alterações térmicas na congelação/descongelação. Os meios diluentes são compostos por açúcares,

crioprotetores, tampões e antibióticos para que seja fornecida nutrição, proteção contra as baixas temperaturas, evitar alterações de pH e inibição do crescimento bacteriano (6).

Parâmetros convencionais utilizados na avaliação espermática como: número total de espermatozoides móveis, motilidade progressiva e morfologia, têm se mostrado limitados quanto à capacidade de estimar o potencial de fertilidade do sêmen. Um único teste é pouco eficaz pelo fato de que cada espermatozoide apresenta múltiplos compartimentos subcelulares com diferentes funções a serem avaliadas (7). A motilidade espermática é geralmente considerada como um importante parâmetro para avaliação da qualidade seminal (8). Testes que avaliam diferentes características do espermatozoide e de vários atributos podem fornecer uma melhor estimativa da fertilidade do que um único teste laboratorial (9).

Usualmente, utilizam-se esses parâmetros convencionais na mensuração da qualidade espermática, podendo haver variações de até 60% nesse tipo de estimativa devido à subjetividade dos critérios e a variação individual do ser humano em quantificar as diferentes subpopulações espermáticas de determinada amostra (10). A Análise Computadorizada de Sêmen (CASA) fornece dados detalhados, precisos e com repetibilidade para diferentes parâmetros, relativos à motilidade do sêmen humano ou nas espécies animais. Assim, a CASA oferece uma melhor estimativa da fertilidade, em relação à rotina microscópica (11).

Alguns espermatozoides possuem membrana plasmática menos eficiente em efetuar trocas, sofrendo maiores danos durante a variação osmótica (12). Estudos comprovaram que a avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal e da função mitocondrial pode ser realizada por técnicas simples, por meio da utilização de sondas fluorescentes (1).

O objetivo deste trabalho foi testar a viabilidade de novos meios de congelamento de sêmen para touros classificados como de alta e regular congelabilidade de sêmen, pertencentes à Central de Inseminação Artificial.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 10 touros zebuínos pertencentes à Central de Inseminação Artificial, sendo cinco animais classificados como de muito boa congelabilidade (ao menos 80% dos ejaculados aprovados na descongelação) e cinco touros como de regular congelabilidade (ao menos 60% dos ejaculados aprovados na descongelação), considerando-se os parâmetros de motilidade espermática, vigor espermático e morfologia espermática (13, 14).

Na Central de Inseminação, os ejaculados foram colhidos com vagina artificial, diluídos 1:1 com a fração I (sem glicerol) dos diluentes TRIS-gema, Botu-Bov[®] e Botu-Bov Egg Free[®] e acondicionados em sistemas passivos de transporte de sêmen refrigerado Botutainer[®] e transportados, durante aproximadamente 15 minutos, até o laboratório de Reprodução Animal, onde foram processados.

Conforme informações do fabricante, a lecitina de soja está presente no diluente Botu-Bov Egg Free[®]. O meio Botu-Bov[®] possui gema de ovo na sua composição. O meio TRIS-gema utilizado foi confeccionado com a seguinte formulação (solução mãe): TRIS 12,11g; ácido cítrico 6,8g; frutose (2,5g) + lactose (2,5g); água destilada (completar até 68mL); glicerina (completar até 100mL); gamicina (1:10.000) 0,7mL. Diluidor TRIS para uso imediato: solução mãe 10mL, água destilada 30mL e gema de ovo 10mL.

As amostras de sêmen fresco, antes da diluição acima descrita, foram analisadas quanto às características macroscópicas e microscópicas: volume (mL), motilidade (%), vigor espermático (1 a 5) e turbilhão (1 a 5) e concentração espermática (10^6 /mL). O exame da morfologia espermática foi realizado, por meio de esfregaço corado pelo método de Karras modificado (15).

Para avaliar as diferenças entre os meios diluentes as amostras fracionadas foram acrescidas em 50% do volume com as respectivas frações II dos diluentes (com 13% de

glicerol) padronizando a concentração final em 30×10^6 espermatozóides viáveis (adotando a motilidade espermática como critério), envasadas em palhetas de 0,5mL devidamente identificados os grupos e lacradas com álcool polivinílico. Após o envase e fechamento, as palhetas foram dispostas horizontalmente sobre bandeja de aço telada e submetidas ao período de estabilização, em geladeira automática digital (Minitub[®], Porto Alegre-Brasil) a 5°C por quatro horas.

Após o período de quatro horas, as bandejas com as palhetas foram colocadas a 4 cm do nível do nitrogênio líquido, amparadas por suporte de alumínio e todo o conjunto no interior de uma caixa de isopor (51 x 45 x 45 cm). Após 20 minutos em vapor de nitrogênio as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido e após o término do processo de congelação as palhetas foram acondicionadas em raques e colocadas em canisteres de um botijão criobiológico.

Decorridos três dias de estocagem em nitrogênio líquido, uma palheta de cada tratamento foi descongelada em banho-maria a 46°C/20 segundos (16). Para uma melhor homogeneização das amostras, o sêmen foi transferido das palhetas para criotubos de 1,5mL (Eppendorf[®]) mantidos a temperatura de 37°C.

Na pós-descongelação, foi realizada a análise computadorizada da motilidade espermática (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 espermáticas. As análises foram realizadas em “setup”, ajustado para as características seminais de bovinos e avaliadas no mínimo três campos de cada amostra. As seguintes variáveis espermáticas foram analisadas: motilidade espermática total (MT), motilidade espermática progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP), velocidade linear (VSL), velocidade curvilínea (VCL), deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento da cauda (BCF), retilinearidade (STR), linearidade (LIN) e porcentagem de espermatozóides rápidos (RAP).

A análise da integridade da membrana plasmática (IMP) foi realizada com a utilização das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (FDA) e iodeto de propídio (IP), sendo diluídos 10µL de sêmen em 40µL da solução de trabalho composta por: 1 mL de citrato de sódio a 2,95%; 10µL de formol salino; 10µL de carboxifluoresceína e 20µL de iodeto de propídio. O material foi analisado entre lâmina e lamínula, em microscópio de epifluorescência (Leika[®]) com aumento de 400X, por excitação em filtro BW. Foram contadas 200 células, sendo consideradas íntegras as coradas totalmente em verde, e lesadas as coradas em vermelho ou em verde e vermelho (13, 14, 17).

Para a análise estatística dos dados relativos ao sêmen na pré-congelação, foram usados o teste t de Student para comparação das médias e o teste não paramétrico de Mann Whitney para análise dos escores. A avaliação estatística dos dados para o sêmen na pós-descongelação foi realizada pela análise de variância (ANOVA). Para as análises utilizou-se nível de significância ($p < 0,05$), sendo utilizado o programa computacional *R Statistical System*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o sêmen fresco, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) em relação aos parâmetros motilidade espermática, volume e vigor espermático (Tabela 1), concentração, defeitos maiores e menores dos espermatozóides (Tabela 2) na pré-congelação, entre os touros com sêmen de muito boa e regular congelabilidade.

Tabela 1. Médias dos parâmetros espermáticos pré-congelação de touros classificados de acordo com o grau de congelabilidade do sêmen em regular (R) e muito boa (MB), pertencentes a central de inseminação artificial.

	Motilidade (%)		Volume (mL)		Vigor (0-5)	
	R	MB	R	MB	R	MB
	70	80	7	10	3	4
	75	80	6	12	5	4
	80	80	6	9	3	5
	75	75	12	8,5	4	4
	75	70	4,5	5,5	4	5
Médias	75,5	77	7,1	9,0	4	4
	p = 0,45(NS)		p = 0,34(NS)		p = 0,25(NS)	

NS – não significativo.

A alta motilidade espermática inicial, associada ao alto vigor espermático, observados no sêmen fresco, não garantem por si só, bom desempenho no processo de criopreservação, porém permite que o sêmen de touros com altas taxas de queda da motilidade tenha aprovação da partida na pós-descongelação conforme (13, 18, 19). A análise de múltiplos atributos de movimentos espermáticos por meio da técnica CASA e a determinação da viabilidade espermática, por meio de técnicas de análise das membranas citoplasmáticas podem agregar maior sensibilidade à avaliação *in vitro* do sêmen em distintas espécies animais como a bubalina (13, 14) e bovina (19).

Tabela 2. Médias dos parâmetros espermáticos pré-congelação de touros classificados de acordo com o grau de congelabilidade do sêmen em regular (R) e muito boa (MB), pertencentes a central de inseminação artificial.

	Concentração (x10 ⁶ /mL)		Morfologia espermática (%)			
			Defeitos Maiores		Defeitos Menores	
	R	MB	R	MB	R	MB
	2300	2026	4	10	19	4
	1821	2000	25	15	7	3
	1632	3060	10	7	17	6
	2804	1724	18	6	6	15
	1301	2965	7	14	7	5
Médias	1971,6	2355	12,8	10,4	11,2	6,6
	p = 0,34(NS)		p = 0,58(NS)		p = 0,58(NS)	

NS – não significativo.

Na comparação entre os três meios diluentes utilizados, observam-se os seguintes resultados: os touros com sêmen de congelabilidade regular apresentaram motilidade total (MT) superior ($p < 0,05$) quando se utilizou o diluente Botu-Bov Egg Free[®] ($73,3 \pm 6,6 \mu\text{m/s}$) em relação ao diluente Botu-Bov[®] ($63,8 \pm 12,46 \mu\text{m/s}$) e ao meio TRIS ($59,7 \pm 9,2 \mu\text{m/s}$), assim como a motilidade progressiva (MP) a superioridade ($p < 0,05$) foi apresentada pelo uso dos diluentes Botu-Bov[®] e Botu-Bov Egg Free[®] ($52,4 \pm 5,3 \mu\text{m/s}$ e $50,5 \pm 11,4 \mu\text{m/s}$), respectivamente, em relação ao TRIS ($38,7 \pm 8,1 \mu\text{m/s}$) (Tabela 3). Comparando os resultados do presente estudo com um experimento semelhante (1) com uso do mesmo meio Botu-Bov[®], se obteve MT e MP superiores em relação ao meio Bioxcell[®]. Essa diferença significativa pode estar relacionada com o aumento da motilidade em diluentes com maior densidade, cuja formulação incluía a gema de ovo (20).

Tabela 3. Médias e desvios-padrões dos parâmetros espermáticos pós-descongelamento de touros classificados de acordo com o grau de congelabilidade do sêmen em regular e muito boa, pertencentes a central de inseminação artificial.

	Congelabilidade regular (n=5)			Congelabilidade muito boa (n=5)		
	Tris	Botu-Bov®	Botu-Bov Egg Free®	Tris	Botu-Bov®	Botu-Bov Egg Free®
MT	59,7±9,2 ^C	63,8±12,4 ^{BC}	73,3±6,6 ^A	68,9±6,8 ^{AB}	72,6±6,9 ^{AB}	71,5±5,1 ^{AB}
MP	38,7±8,1 ^B	52,4±5,3 ^A	50,5±11,4 ^A	46,9±6,0 ^A	54,1±5,7 ^A	54,3±3,4 ^A
VAP	98,0±7,8 ^{AB}	87,1±8,1 ^B	97,6±10,8 ^{AB}	99,3±13,8 ^A	93,4±11,0 ^{AB}	96,3±9,1 ^{AB}
VSL	74,7±4,8 ^{AB}	72,7±6,5 ^B	81,5±9,8 ^A	76,4±6,2 ^{AB}	74,9±7,0 ^{AB}	78,7±9,5 ^{AB}
VCL	160,3±34,0 ^{AB}	141,5±18,7 ^B	155,4±19,8 ^{AB}	171,9±22,1 ^A	149,0±23,8 ^{AB}	148,7±19,9 ^{AB}
ALH	6,9±0,8 ^B	5,6±0,7 ^A	5,9±0,7 ^A	6,8±0,6 ^A	5,8±0,9 ^A	5,5±0,8 ^A
BCF	25,8±3,7 ^{CD}	30,1±2,7 ^{AB}	31,7±3,3 ^A	24,2±2,8 ^D	28,0±3,2 ^{BC}	31,1±3,3 ^{AB}
STR	76,7±4,7 ^{BC}	83,6±3,3 ^A	84,1±3,3 ^A	75,4±3,6 ^C	80,6±4,1 ^{AB}	82,9±3,7 ^A
LIN	46,4±4,9 ^B	54,2±5,2 ^A	54,9±4,1 ^A	46,1±3,0 ^A	53,3±5,2 ^A	56,2±5,4 ^A
RAP	55,8±9,5 ^B	64,9±8,8 ^A	61,6±14,1 ^A	70,2±7,8 ^A	66,5±9,6 ^A	69,3±5,5 ^A
IMP	29,5±7,4	31,9±9,4	35,3±10,7	33,7±5,8	33,7±6,4	32,6±6,5

MT (motilidade total, $\mu\text{m/s}$), MP (motilidade progressiva $\mu\text{m/s}$), VAP (velocidade de trajeto $\mu\text{m/s}$), VSL (velocidade linear $\mu\text{m/s}$), VCL (velocidade curvilínea $\mu\text{m/s}$), ALH (deslocamento lateral da cabeça, μm), BCF (frequência de batimento de cauda, Hz), STR (retilinearidade, %), LIN (linearidade, %), RAP (porcentagem de sptz rápidos), IMP (integridade da membrana plasmática, %).

Letras diferentes nas linhas diferem entre si ($p < 0,05$).

Para a velocidade de trajeto (VAP) e a velocidade curvilínea (VCL), não houve diferença significativa ($p > 0,05$) tanto nos touros de muito boa quanto de regular congelabilidade do sêmen. Em relação à velocidade linear (VSL), o diluidor Botu-Bov Egg Free® (81,5±9,8 $\mu\text{m/s}$) foi superior ($p < 0,05$) em touros com sêmen de congelabilidade regular sobre o diluidor Botu-Bov® (72,7±6,5 $\mu\text{m/s}$). Vale salientar que para fins de extrapolação para uso prático, os parâmetros de movimentação espermática por meio da análise computadorizada (CASA), estão relacionados com a taxa de fecundação, onde valores de VAP, VSL e a velocidade curvilínea (VCL) são significativamente maiores em amostras que produzem mais de 50% de oócitos fecundados (10). Entre os parâmetros cinéticos fornecidos pelo CASA, a VCL e o deslocamento lateral de cabeça dos espermatozoides (ALH) têm mostrado grande correlação com a taxa de fecundação *in vitro* de oócitos (10).

A ALH para o diluente TRIS foi significativamente inferior ($p < 0,05$) em relação aos meios testados em touros com sêmen de congelabilidade regular (6,9±0,8 μm), com o Botu-Bov® (5,6±0,7 μm) e Botu-Bov Egg Free® (5,9±0,7 μm). Uma maior ALH é caracterizada por movimentos espermáticos que resultam na elevação do gasto de energia dos espermatozoides durante o deslocamento (10). Estudos com os diluidores “Talp” e “Cue” comprovaram que tais diluidores promoveram alta motilidade espermática, pois são compostos por partículas livres de baixa viscosidade, porém podem causar maior movimento lateral de cabeça (21).

Para a frequência de batimento de cauda (BCF) e retilinearidade (STR), respectivamente, os resultados foram: Botu-Bov® (regular congelabilidade: 30,1±2,7 Hz; 83,6±3,3%; e alta congelabilidade: 28,0±3,2 Hz; 80,6±4,1%) e Botu-Bov Egg Free® (regular congelabilidade: 31,7±3,3 Hz; 84,1±3,3%; e muito boa congelabilidade: 31,1±3,3 Hz; 82,9±3,7%), sendo superiores ($p < 0,05$) em relação ao meio TRIS para os mesmos parâmetros de movimento espermático, sendo: TRIS (regular congelabilidade: 25,8±3,7 Hz; 76,7±4,7%; e muito boa congelabilidade: 24,2±2,8 Hz; 75,4±3,6%), segundo Hoflack et al. (8) valores

elevados para BCF e STR, resultam em movimentos espermáticos progressivos mais rápidos, devido a maior força propulsora do gameta masculino.

No tocante a linearidade (LIN) e percentagem de espermatozóides rápidos (RAP), os diluidores Botu-Bov[®] (54,2±5,2%; 64,9±8,8%) e Botu-Bov Egg Free[®] (54,9±4,1%; 61,6±14,1%) apresentaram melhores resultados ($p < 0,05$) em touros com sêmen de regular congelabilidade, em relação ao meio TRIS (46,4±4,9%; 55,8±9,5%). Verstegen et al. (10) encontraram para os parâmetros BCF e LIN correlação positiva com a taxa de prenhez, podendo fornecer informações úteis para o uso do sêmen nas fêmeas. Superioridade para BCF, STR e LIN foi descrita por Crespihlo et al. (22) para o sêmen bovino congelado com o diluidor Botu-Bov[®] o que indica que os espermatozóides criopreservados com esse diluidor apresentam movimentos com linearidade superior quando comparada com o diluidor TRIS-gema de ovo-frutose. Resultados esses do presente estudo semelhantes aos relatados por Verberckmoes et al. (23) para VSL, BCF, STR e LIN com maior vigor e retilinearidade dos espermatozóides usando o diluidor CEP-2 com composição bioquímica sintética associada ao plasma da cauda do epidídimo de bovino.

A integridade da membrana plasmática dos espermatozóides avaliada pelas sondas fluorescentes: iodeto de propídeo e diacetato de carboxifluoresceína, não apresentou diferenças significativas entre os três diluidores. Dessa forma, os diluidores revelaram ser adequados, mantendo a integridade da membrana. Ao se tratar de IMP dos espermatozóides a técnica com uso de sondas fluorescentes traz informações importantes para a avaliação do funcionamento das membranas espermáticas (17, 24). Os resultados observados em relação à motilidade e a preservação da integridade das membranas indicam que ocorrem interações entre o diluidor e o tempo de equilíbrio que resultam em uma maior sobrevivência espermática (25).

No presente estudo, obteve-se resultado semelhante ao de outros autores (22) com a associação das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídeo para avaliar a IMP dos espermatozóides na pós-descongelação usando os meios diluentes Botu-Bov[®] e TRIS-gema de ovo-frutose. Thun et al. (26) obtiveram diferença significativa com superioridade dos diluentes à base de gema de ovo em relação aos meios à base de lecitina de soja. Na espécie bubalina, pesquisadores brasileiros fizeram uso de meios a base de glicina-gema, Triladyl[®] (Merck) e TES, sendo que a integridade das membranas espermáticas não apresentou diferenças entre os três diluidores para os tempos de equilíbrio de 2 e 4 horas com as sondas IP e CFDA (13, 14).

A despeito das diversas pesquisas realizadas com novos componentes em meios diluidores para fins de criopreservar sêmen na espécie bovina, há necessidade de novos estudos enfocando as interações desses constituintes com os espermatozóides. Vale salientar a necessidade de se padronizar meios diluentes para o uso em reprodutores de regular congelabilidade viabilizando o uso do sêmen congelado desses animais.

CONCLUSÕES

Conclui-se que os diluentes Botu-Bov[®] e Botu-Bov Egg Free[®] apresentaram superioridade na maioria dos parâmetros avaliados pelo CASA, principalmente em touros de regular congelabilidade de sêmen; constituindo duas novas opções viáveis de meios diluentes para a congelação de sêmen em touros considerados como de regular congelabilidade; os quais passam a ser significativos em relação aos touros classificados como de muito boa congelabilidade do sêmen, proporcionando o uso do material genético desses animais para fins de reprodução.

AGRADECIMENTOS

A Tairana, Central de Inseminação Artificial.

O presente projeto de pesquisa tramitou junto ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), sendo protocolado sob o número 045/07 cujo parecer foi emitido na data de 16/08/2007 sendo o mesmo APROVADO.

REFERÊNCIAS

1. Celeghini ECC. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2005.
2. Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl.* 2000;21:1-7.
3. Thomas CA, Garner DL, Dejarnette JM. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol Reprod.* 1998;58:786-93.
4. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.* 2000;60:481-92.
5. Manjunath P, Nauc V, Bergeron A. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol Reprod.* 2002;67:1250-8.
6. Graham JK. Response of spermatozoa to freezing. In: *Proceedings of the Techniques for Handling and Utilization of Transported Cooled and Frozen Equine Spermatozoa; 1995, Colorado.* Colorado: Colorado State University - Fort Collins; 1995. p.83-95.
7. Santos GCJ. Viabilidade de sêmen equino congelado em meios diluidores de diferentes composições [dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2003.
8. Hoflack G, Opsomer G, Rijsselaere T. Comparison of computer-assisted sperm motility analysis parameters in semen from Belgian Blue and Holstein-Friesian bulls. *Reprod Domest Anim.* 2007;42:153-61.
9. Schenk JL, Amann RP, Allen CH. Effects of extender and insemination dose on postthaw quality and fertility of bovine sperm. *J Dairy Sci.* 1987;70:1458-64.
10. Verstegen J, Iguer-Ouada MI, Oclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology.* 2002;57:149-79.
11. Farrell PB, Foote RH, McArdle MM. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). *J Androl.* 1996;17:293-300.
12. Rasul Z, Ahmad N, Anzar M. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrossome, morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *J Androl.* 2001;22:278-83.

13. Chacur MGM. Avaliação da congelação de sêmen bubalino com os diluidores Glicina-Gema, Tryladil® e TES em diferentes tempos de equilíbrio [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 1996.
14. Chacur MGM, Oba E, Gonzalez CIM. Equilibrium time influence on motility, vigor and membrana integrity of thawed buffalo semen using Triladyl, glycine-egg-yolk and TES extenders. In: Proceedings of the 5th World Buffalo Congress; 1997, Caserta. Caserta: WBC; 1997. p.846-9.
15. Papa FO, Alvarenga MA, Carvalho IM, Bicudo SD. Coloração espermática segundo Karras modificada pelo emprego do Barbatimão (*Stryphnodendrum barbatiman*). Arq Bras Med Vet Zootec. 1988;40:115-23.
16. Dell'aqua Junior JA. Efeito da centrifugação, tipos de envase e temperatura de descongelamento sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade relacionados com o local de deposição e concentração da dose inseminante do sêmen congelado equino [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2000.
17. Harrison RA, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. J Reprod Fertil. 1990;88:343-52.
18. Salvador DF, Andrade VJ, Vale Filho VR. Associação entre o perfil andrológico e a congelação de sêmen de touros da raça Nelore aos dois anos de idade, pré-selecionados pela classificação andrológica por pontos (CAP). Arq Bras Med Vet Zootec. 2008;60:587-93.
19. Crespilho AM. Efeito do meio diluidor e da dose inseminante sobre a congelabilidade e fertilidade do sêmen bovino utilizado em programas de inseminação artificial em tempo-fixado (IATF) [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2007.
20. Hirai M, Cerbito WA, Wijayaguna W. The effect of viscosity of semen diluents on motility of bull spermatozoa. Theriogenology. 1997;47:1463-78.
21. Foote RH, Gray LC, Young DC. Fertility of bull semen stored up to four days at 5° in 20% egg yolk extenders. J Dairy Sci. 1960;43:1330.
22. Crespilho AM, Papa FO, Alberti K. Eficiência comparativa entre dois diluidores para a congelação de sêmen bovino sobre os padrões de motilidade e integridade de membrana plasmática. Ars Vet. 2006;22:229-35.
23. Verberckmoes S, Soom AV, Dewulf J. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. Theriogenology. 2005;63:912-22.
24. Garner DL, Pinkel D, Johnson LA. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. Biol Reprod. 1986;34:127-38.
25. Leite TG. Tempo de equilíbrio na criopreservação do sêmen: Efeitos sobre características de motilidade e de integridade das membranas espermáticas de touros Gir leiteiro [dissertação]. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais; 2008.

26. Thun R, Hurtado M, Janet F. Comparison of Biociphos-Plus® and Tris-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*. 2002;57:1087-94.

Recebido em: 25/04/11

Aceito em: 10/05/12