

**EFEITO DE MEIOS DILUENTES SOBRE A VIABILIDADE DE SÊMEN  
CONGELADO BOVINO**

**HUBERSON SANCHES DIAS**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**EFEITO DE MEIOS DILUENTES SOBRE A VIABILIDADE DE SÊMEN  
CONGELADO BOVINO**

**HUBERSON SANCHES DIAS**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como requisito para obtenção de título de Mestre em Ciência Animal. - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal

Orientador:  
Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur

636.089  
D541e

Dias, Huberson Sanches

Efeito de meios diluentes sobre a viabilidade de sêmen congelado bovino / Huberson Sanches Dias. – Presidente Prudente, 2010.

58 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE: Presidente Prudente – SP, 2010.

Bibliografia.

1. Centrifugação. 2. CASA. 3. Bovino. 4. Sêmen. I. Título.

**HUBERSON SANCHES DIAS**

**EFEITO DE MEIOS DILUENTES SOBRE A VIABILIDADE DE SÊMEN  
CONGELADO BOVINO**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Presidente Prudente, 20 de agosto de 2010

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur  
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE,  
Presidente Prudente - SP

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Caliê Castilho  
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE,  
Presidente Prudente - SP

---

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa  
Universidade Estadual Paulista - UNESP  
Botucatu - SP

## DEDICATÓRIA

*A DEUS em primeiro lugar, por guiar meu caminho e estar sempre presente em minha vida me fortalecendo nas horas de fraqueza.*

*Aos Meus Pais, pelo apoio, sempre incondicional, a quem devo todos os meus estudos, conhecimento e formação pessoal.*

*A Minha Esposa Carla, por estar sempre pronta a me ajudar me apoiando nesta caminhada, estando sempre ao meu lado.*

*Ao meu Professor e Orientador*

*Dr. Marcelo George Mungai Chacur*

*pela total colaboração e incentivo,*

*sempre apoiando e acreditando no meu trabalho.*

*Um Agradecimento Especial*

## *AGRADECIMENTOS*

*À Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Programa de Mestrado em Ciência Animal e ao Curso de Medicina Veterinária, por todas as oportunidades a mim concedidas.*

*À Central de Inseminação Artificial Tairana, por me abrirem as portas para a realização deste trabalho.*

*Agradeço ao meu Orientador Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur, pela orientação, colaboração, apoio e amizade. Muito obrigado por acreditar no meu trabalho.*

*Ao Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa, pelo apoio incondicional na realização deste trabalho e pelo empréstimo dos equipamentos para o processamento do material.*

*Aos Professores Prof. Dr. Paulo Eduardo Pardo, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Cecília Braga Laposy, Prof. Dr. Vamilton Alvares Santarém, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Caliê Catilho, Prof. Dr. Luis Carlos Vianna, agradeço pela atenção sempre dispensada desde os tempos de Graduação.*

*Aos alunos de iniciação científica, Bruno Alves Louvison, Mayra Micarelli Calesco e Patrícia de Mello Papa, que colaboraram na realização do experimento.*

*“A compaixão para com os animais é das mais nobres virtudes da natureza humana”.*

*Charles Darwin*

## RESUMO

### Efeito de meios diluentes sobre a viabilidade de sêmen congelado bovino

A pecuária brasileira é uma atividade de grande importância para a economia do país por se destacar pelo seu elevado potencial e possibilidade de crescimento. Neste sentido, a inseminação artificial é um dos instrumentos mais importantes para contribuir no avanço das modernas técnicas de produção animal, entretanto, para sua realização é necessário o uso do sêmen congelado. Durante o processo de criopreservação, ocorre diminuição da viabilidade espermática devido aos efeitos osmóticos, temperatura e alterações morfológicas que ocorrem por mudanças na organização, fluidez, permeabilidade e composição lipídica das membranas espermáticas. A interação entre as células espermáticas e o meio diluidor representa um fator crucial para a preservação da integridade espermática e habilidade de fecundação. O meio diluente tem como finalidade proteger a célula espermática durante o choque térmico, na congelação e descongelação. Parâmetros convencionais utilizados na avaliação espermática têm se mostrado limitados quanto à capacidade de prever o potencial de fertilidade do sêmen, assim testes que mensuram diferentes características do espermatozóide e avaliação de vários atributos podem fornecer uma melhor estimativa da fertilidade. Para avaliar a integridade da membrana plasmática foi utilizada, em diversos trabalhos com sucesso a associação de sondas fluorescentes como Iodeto de Propídeo (IP) e Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA). O CASA (sistema informatizado para análise de sêmen) oferece informações precisas do movimento individual de cada célula bem como as subpopulações de células espermáticas realizando um desenho para cada espermatozóide com a finalidade de representar a sua trajetória real. A presente revisão de literatura tem o objetivo de apresentar informações relativas ao efeito de meios diluentes sobre a viabilidade de sêmen congelado bovino (*Bos taurus indicus*).

**Palavras-chave:** Touros. Espermatozóide. Criopreservação. Diluidores. Membrana Plasmática. CASA.

## ABSTRACT

### Effect of extenders upon frozen semen viability in bulls

For the economy, the Brazilian industry of cattle is a very important activity because it is one area that gives the possibility of having a very big potential in terms of growth. Having this in mind, it can conclude that the artificial insemination is probably one of the most important way for contributing with the advancement of the modern animal techniques used for the production, however, it requires the use of the frozen semen for this realization. During the cryopreservation process, a decrease in the number of sperm viability happens because of the osmotic effects, temperature, and morphological changes that occur because of the organization changes, fluidity, permeability and the lipid composition of sperm membranes. The interaction presents between sperm cells and the thinner represents a crucial factor to preserve the integrity and the fertilizing ability. The thinner has as main objective to protect the sperm cells during the cold shock, and also in the freezing and thawing. Conventional parameters used in the sperm evaluation have showed that they are limited in their ability of predicting the semen potential fertility, and then tests that have different characteristics of the sperm and evaluation of many attributes can provide a better fertility estimate. To evaluate the integrity of the plasmatic membrane, it was successfully utilized one combination of fluorescent probe (IP that means propidium iodide and CFDA that means carboxyfluorescein diacetate). The system CASA (one computer program that analyzes the semen) provides real information about the individual cell movement and also the subpopulations of sperm cells realizing draw for each sperm that has as objective to represent the real path. This review has the objective of presenting the relevant information to the effect of thinners in the frozen ox semen (*Bos taurus indicus*).

**Keywords:** Bulls. Spermatozoa. Cryopreservation. Extenders. Plasma Membrane. CASA.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias dos parâmetros espermáticos pré-congelação de touros classificados de acordo com sua congelabilidade (alta e regular) pertencentes a central de inseminação artificial.....	50
Tabela 2 - Médias dos parâmetros espermáticos pré-congelação de touros classificados de acordo com sua congelabilidade (alta e regular) pertencentes a central de inseminação artificial.....	50
Tabela 3 - Médias e desvios-padrões dos parâmetros espermáticos pós-descongelação de touros classificados de acordo com o grau de congelabilidade.....	51

## ANEXOS

Quadro 1 - Soluções estoque e de trabalho segundo técnica descrita por Harrison e Vickers (1990).....	58
Quadro 2 - Solução de Trabalho.....	58
Quadro 3 - Amostras para Avaliação.....	58
Figura 1 - Delineamento laboratorial do experimento.....	56
Figura 2 - Esquema simplificado dos procedimentos experimentais realizados no experimento.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALH -	Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça
BCF -	Frequência de Batimentos Flagelares
BSP -	Proteína de Baixo Peso Molecular
CASA -	“Computer Assisted Sperm Analysis” – Análise Computadorizada do Sêmen
CFDA -	Diacetato de 6 Carboxifluoresceína
CMXRos -	Cloreto de 8-(4`-clorometil) fenil-2,3,5,6,11,12,14,15 octahidro-1H, 4H, 10H, 13H-diquinolizino-8H-xantílio (Mito Tracker Red®)
EDTA -	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FICTC-PSA -	Glutinina de <i>Psum sativum</i> conjugada a Isotiocianato de fluoresceína
FICT -	Isotiocianato de fluoresceína
IA -	Inseminação Artificial
IATF -	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IMP -	Integridade de Membrana Plasmática
IP -	Iodeto de Propídeo
JC-1 -	Iodeto de 5,5', 6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarocianina
kDa -	Quilodalton
LIN -	Linearidade
MITO -	Mito Track Green FM®
MP -	Motilidade Progressiva
MT -	Motilidade Total
PE -	Perímetro Escrotal
PI -	Iodeto de Propídeo
RAP -	Velocidade Rápida
ROS -	Espécies Reativas de Oxigênio
SRD -	Sem Raça Definida
STR -	Retilinearidade
TES -	Trimetilaminoetano
TRIS -	tris-hidroximetilaminometano
UFT -	Tecnologia Única de Congelação
VAP -	Velocidade de Trajeto
VCL -	Velocidade Curvelinear
VSL -	Velocidade Progressiva

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
2.1 Criopreservação .....	15
2.2 Período de Equilíbrio .....	17
2.3 Concentração Espermática .....	18
2.4 Meios Diluentes .....	18
2.5 Plasma Seminal .....	23
2.6 Avaliação Espermática .....	24
2.6.1 Análise de Integridade da Membrana Plasmática .....	25
2.6.2 CASA .....	27
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	32
<b>3 ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	39
<b>ANEXOS</b> .....	53

## 1 INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira é uma atividade de grande importância para a economia do país por se destacar pelo seu elevado potencial e possibilidade de crescimento. O aumento da produtividade pode ser adquirido com o emprego de biotécnicas que melhorem o sistema de produção, buscando maior produção por área e assim minimizando os custos de produção. A utilização de biotécnicas aplicadas à reprodução permite maximizar o uso de genética superior, permitindo o aumento da produtividade (CELEGHINI, 2005).

A bovinocultura brasileira atravessa uma fase de ampliação do uso de tecnologias no setor produtivo e reprodutivo, principalmente no segmento de corte, com grande participação das raças zebuínas (*Bos taurus indicus*), como a raça Nelore, e também das raças taurinas (*Bos taurus taurus*) de origem europeia e seus cruzamentos. A busca de retorno financeiro por meio da eficiência nos sistemas de produção pode ser intensificada com o emprego de eficientes técnicas de manejo e biotécnicas aplicadas à reprodução animal. A adoção da estação de monta com uso de animais selecionados e a inseminação artificial são importantes ferramentas que auxiliam no melhoramento genético e aumento da produtividade no setor (VISHWANATH, 2003). As biotécnicas aplicadas à reprodução animal, como inseminação artificial, associadas a um manejo adequado do rebanho, têm sido empregados por pesquisadores, médicos veterinários e produtores, visando aumentar a qualidade e a quantidade de bezerros genética e fenotipicamente superiores (TORRES-JÚNIOR et al., 2009). A inseminação artificial em bovinos é uma biotecnologia reprodutiva que serve como uma ferramenta para o melhoramento genético dos rebanhos e possui custos mais acessíveis. Entretanto, para sua realização é necessário o uso do sêmen congelado (CELEGHINI, 2005).

O melhoramento genético de espécies economicamente importantes e o controle de doenças são de fundamental importância para o sucesso sustentável de uma indústria agro-alimentar. Neste sentido, a inseminação artificial (IA) é provavelmente o instrumento mais importante a contribuir para o avanço das modernas técnicas de produção animal. Por meio da inseminação artificial, a partir do ejaculado de um reprodutor geneticamente superior é possível fecundar múltiplas fêmeas maximizando a distribuição de genes favoráveis. Além disso, a IA elimina o

contato físico entre os animais, limitando assim a propagação de doenças sexualmente transmissíveis. O sucesso da criopreservação de sêmen aumenta as vantagens da IA sobre criatórios naturais, o armazenamento por longo prazo, facilita o transporte à distância, permite a quarentena do sêmen e permite a utilização de germoplasma superior, mesmo depois da morte do touro (BAILEY et al., 2000).

Além do incremento genético, a congelação de sêmen proporciona formação de banco de reserva genética para animais de alto valor zootécnico, permite o intercâmbio entre diversos criatórios das mais variadas regiões e países e seleciona indivíduos quanto a sua fertilidade e congelabilidade. O processo de criopreservação permite diminuir perdas econômicas oriundas da morte de reprodutores de alto valor comercial ou que participem de programas de revitalização de sua raça para a preservação contra extinção de raças nativas e conservação de espécies ameaçadas (WATSON, 2000).

A inseminação artificial consagrou-se mundialmente e provou ser uma técnica viável economicamente, capaz para acelerar o ganho genético e o retorno econômico da pecuária. Dentre suas vantagens, destacam-se a padronização do rebanho, o controle de doenças sexualmente transmissíveis, a organização do trabalho na fazenda, a diminuição do custo de reposição de touros, etc. Outra vantagem são os programas de cruzamento industrial com touros de raças altamente precoces e com alto ganho de peso, mas pouco adaptadas às condições tropicais e, ainda, o uso de sêmen de touros mesmo após a sua morte. Mas o principal benefício desta técnica é o melhoramento genético por meio do uso de touros provados para obtenção de crias com maior potencial de produção e reprodução (ASBIA, 2010a).

As vendas de sêmen durante o ano de 2008 demonstraram crescimento do setor de 9,45% com mais de oito milhões de doses comercializadas. No acumulado dos últimos dez anos o crescimento chega a 47,35% sendo 67,54% de vendas das raças leiteiras. Do total comercializado em 2008, 59,19% são de genética nacional. O mercado demonstrou uma demanda maior pela carne e o leite o que estimulou os produtores a buscar tecnologia para aumentar a produtividade. Nas raças de leite o Holandês lidera o “ranking” de vendas com 55,62%, seguido pelo Gir com 19,83% e o Jersey com 16,86%. No corte o maior volume de doses comercializadas foi de Nelore, com 43,70%, seguido pelo Angus com 14,58% e Red Angus com 10,63% (ASBIA, 2010b).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Criopreservação

A criopreservação do sêmen busca a suspensão do metabolismo espermático e a manutenção de suas características por um período de tempo prolongado. O sucesso da criopreservação do sêmen depende da manutenção do potencial fecundante dos espermatozóides, que devem apresentar integridade e funcionalidade de diferentes estruturas celulares (CELEGHINI, 2005).

É de conhecimento geral que durante o processo de criopreservação, ocorre diminuição de aproximadamente 50% da viabilidade espermática devido aos efeitos osmóticos e térmicos e que alterações morfológicas ocorrem por alterações na organização, fluidez, permeabilidade e composição lipídica das membranas espermáticas (THOMAS et al., 1998).

A integridade da membrana dos espermatozóides foi reduzida durante o tempo de equilíbrio, e agravou ainda mais após a congelação e descongelação (RASUL et al., 2001). Lesões parciais nos espermatozóides que ocorreram durante o equilíbrio tornaram-se mais evidentes após congelação e descongelação. Segundo Tardif et al. (1997) os padrões de movimentação dos espermatozóides se tornam diferentes após o processo de refrigeração o que pode ser explicado por Rasul et al. (2001) que, analisando espermatozóides de búfalos, por meio do método CASA (análise computadorizada do sêmen) concluíram que, o processo de criopreservação causa lesões no axonema diminuindo a capacidade de movimentação dos espermatozóides. A reorganização estrutural da membrana plasmática do espermatozóide após criopreservação parece dificultar a capacidade do espermatozóide de interagir normalmente com células do trato genital feminino, tornando o espermatozóide menos susceptível para chegar ao local de fecundação in vivo ou penetrar nas membranas do ovócito (BAILEY et al., 2000).

A correlação entre o volume original do ejaculado e a porcentagem de espermatozóides viáveis depois de congelado/descongelado foi de 55% em experimento utilizando touros leiteiros (DAAS et al., 1998), semelhante ao observado por Watson (1995) que descreve redução na viabilidade espermática de 50%

durante o processo de criopreservação. Rasul et al. (2001) descreveram que após o processo de congelação e descongelação o CASA revelou motilidade de 49%.

A criopreservação apresenta fatores potencialmente prejudiciais, em primeiro lugar a mudança de temperatura, em segundo lugar os efeitos osmóticos e tóxicos ocorrido pela exposição às concentrações molares de crioprotetores e em terceiro lugar, a formação e dissolução de gelo no meio extracelular. Espermatozóides criopreservados sobrevivem menos tempo no trato reprodutivo de fêmeas em comparação aos espermatozóides frescos (WATSON, 2000).

Cotter et al. (2005) avaliaram o método UFT (tecnologia única de congelação) e sua utilidade na congelação de sêmen bovino por meio da mensuração da motilidade pós-descongelação. As amostras de sêmen bovino fresco foram processadas em duas etapas usando um diluidor à base de TRIS-gema de ovo. O sêmen congelado pelo sistema UFT apresentou motilidade pós-descongelação 14% superior do que o outro criopreservado em névoa de nitrogênio.

A avaliação das alterações causadas ao sêmen congelado de bovinos quando expostos a temperatura ambiente de 1 até 10 vezes, por 10 segundos mostrou que o sêmen pode apresentar redução na viabilidade a partir da terceira exposição, demonstrando a necessidade de um manejo correto na manipulação do sêmen congelado que pode apresentar redução significativa na sua qualidade sendo traduzido em menor eficácia das inseminações artificiais (HORN et al., 1997).

Quanto ao processo de descongelação do sêmen, Foote et al. (2001) não encontraram diferenças significativas nos resultados entre palhetas descongeladas em água a 30 ou 37°C.

Quando a refrigeração dos espermatozóides é realizada de forma lenta ocorre maior saída de água podendo levar a uma desidratação celular muito intensa, porém a refrigeração quando realizada de forma muito rápida é insuficiente para promover a saída de água, promovendo a formação de cristais de gelo no interior da célula. Uma boa taxa de refrigeração deve permitir que a célula espermática perca água, mas não de forma excessiva permitindo que pequenos cristais possam ser formados mas que estes não sejam prejudiciais a ponto de causar a morte da célula (GRAHAM, 1995).

## 2.2 Período de Equilíbrio

O período de equilíbrio varia de acordo com a espécie animal, com o protocolo de congelação/descongelação e também segundo o meio diluente utilizado, em búfalos com os meios glicina-gema, Triladyl e TES, conferiram boa integridade de membrana com sondas fluorescentes (CHACUR, 1996).

Para que a taxa de sobrevivência após congelação da célula espermática seja alta, a taxa de refrigeração deve ser rápida. No entanto, a taxa de refrigeração deve ser lenta o suficiente para permitir que a água deixe as células por osmose impedindo a formação de gelo intracelular, que é letal. Portanto, deve ser possível prever a máxima taxa de refrigeração compatível com o equilíbrio osmótico e assim determinar ótimos protocolos de criopreservação (WATSON, 2000).

As diferenças entre as espécies na sensibilidade do seu espermatozóide para refrigeração são largamente atribuídas às variações na composição da membrana espermática. A susceptibilidade da membrana em se submeter às transições durante a refrigeração é inversamente relacionada com a proporção de colesterol presente. Também está relacionada com a quantidade de ácidos graxos saturados e insaturados presentes, sendo que, elevados índices de ácidos graxos saturados imprimem maior susceptibilidade a danos na membrana (DROBNIS et al., 1993).

Estudando a utilização de 4 ou 18 horas de tempo de equilíbrio em sêmen de touros holandeses, Foote et al. (2001) chegaram a conclusão de que 4 horas foram suficientes para o sêmen refrigerado tornar-se equilibrado e oferecer uma boa congelação/descongelação e sobrevivência dos espermatozoides.

Avaliação de 60, 120, 180 e 240 minutos de tempos de estabilização demonstrou que ocorreu pouca variação dos resultados de MT (motilidade total), MP (motilidade progressiva) e RAP (porcentagem de espermatozoides rápidos) após três horas de estabilização, sem implicações na qualidade do sêmen. Tal constatação evidencia que, na prática a economia de uma hora no período de refrigeração das palhetas a serem congeladas, não interfere significativamente na viabilidade espermática pós-descongelação, embora 180 minutos tenha sido considerado o melhor para criopreservação do sêmen bovino (ALBERTI, 2007).

### 2.3 Concentração Espermática

A relação entre a eficiência reprodutiva e a concentração espermática de sêmen de touros da raça holandesa, congelado com meio TRIS-gema de ovo contendo 7% de glicerol foi descrita por Daas et al. (1998), tendo melhores taxas de não retorno ao cio, com concentrações entre  $10 \times 10^6$  a  $15 \times 10^6$  espermatozoides.

As taxas de fertilidade foram ligeiramente mais elevadas quando o número de espermatozoides com motilidade espermática progressiva foi superior a 4 milhões, imediatamente após a descongelação. Espermatozoides congelados com doses de  $11 \times 10^6$  continham cerca de  $4 \times 10^6$  de espermatozoides móveis progressivos levando a menor taxa de fertilidade na inseminação artificial, porém doses que variaram de  $15 \times 10^6$  até  $22 \times 10^6$  de espermatozoides viáveis por palheta não diferiram entre si nos índices de fertilidade (SCHENK et al., 1987).

A dose inseminante exerce influência significativa nos índices de concepção de vacas Nelore inseminadas em tempo-fixado utilizando protocolos hormonais, demonstrando que o aumento do número de espermatozoides inseminados pode determinar a melhora da eficiência reprodutiva nos programas de IATF (CRESPILHO, 2007). Uma das alternativas para o aumento da eficiência reprodutiva resultando em maiores índices de fertilidade e qualidade embrionária, compreende no acréscimo de espermatozoides acessórios por meio do aumento da dose inseminante (DEJARNETTE et al., 1992).

### 2.4 Meios Diluentes

A interação entre as células espermáticas e o meio diluidor representa um fator crucial para a preservação da integridade espermática e habilidade de fecundação (MANJUNATH et al., 2002).

O meio diluente tem como finalidade proteger a célula espermática durante o choque térmico na congelação e descongelação. Os meios diluentes são compostos por açúcares, crioprotetores, tampões e antibióticos para que seja

fornecida nutrição, proteção contra o frio, manutenção do pH e inibição bacteriana (GRAHAM, 1995).

Estudo sobre a refrigeração de sêmen canino por um período de 102 horas, comparando dois diluidores: o Botu-Semen<sup>®</sup> (Biotech-Botucatu) e o meio à base de leite desnatado proposto por Kenney et al. (1975) utilizando como parâmetros a avaliação da motilidade, vigor e integridade de membrana plasmática, Lopes et al. (2005) encontraram alta correlação entre a motilidade espermática e a porcentagem de células com membranas íntegras. O meio Botu-Semen<sup>®</sup> apresentou maior capacidade de preservação das características seminais iniciais comparados ao meio Kenney.

Coelho et al. (2000) avaliaram a utilização de diferentes diluidores de sêmen congelado no desenvolvimento *in vitro* de ovócitos bovinos. O sêmen de um único reprodutor foi fracionado e submetido a três diferentes diluidores: lactose-gema de ovo, citrato-gema de ovo e TRIS-gema de ovo. A taxa de clivagem com sêmen diluído com TRIS foi significativamente inferior àquelas obtidas com sêmen diluído com lactose ou citrato, às quais não diferiram entre si. No entanto a taxa de mórula, blastocisto e a taxa de blastocisto eclodido também não diferiram entre os diluidores utilizados, concluindo que o diluidor de sêmen não interferiu no desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos, embora a taxa de clivagem tenha sido afetada.

Comparando a fertilidade de sêmen bovino usando dois meios diluentes: um contendo leite fervido sem nenhum antibiótico e o outro diluído em citrato-gema de ovo, contendo penicilina e estreptomicina, a taxa de não retorno ao cio foi maior no diluente contendo leite (THACKER et al., 1953), nesse mesmo estudo, os autores utilizaram leite de vaca como meio diluente, descrevendo que a observação da motilidade ficava difícil pela formação de inúmeros glóbulos de gordura. O processo de fervura trouxe mudanças favoráveis a este produto, aumentando a motilidade quando comparada ao leite cru. Também foi mensurado que o melhor tempo de fervura foi de 10 minutos.

Segundo Tardif et al. (1997) o meio Tyrode (albumina, piruvato, lactato) promove alta motilidade espermática, tem baixa viscosidade por isso apresenta várias vantagens para a avaliação de rotina de sêmen fresco. Nos meios Cornell University e gema de ovo-glicerol-TRIS a velocidade e os percentuais de motilidade espermática foram maiores após do que antes da refrigeração, o que sugere que

houve uma acomodação das células espermáticas durante o período de refrigeração nos meios contendo gema de ovo.

Análises realizadas para comparar o diluidor padrão TRIS com um meio diluente à base de água de coco em pó (ACP<sup>®</sup>) constituída de 12g de água de coco em pó, obtida através de um forte processo de vaporização, dissolvida em 50ml de água, mostraram que ambos diluidores não apresentaram diferenças quanto a conservação da qualidade seminal após descongelação, mostrando serem eficientes na criopreservação de sêmen canino (SILVA et al., 2006). Em bovinos, a utilização de diluente a base de gema de ovo-citrato resultou em um maior percentual de motilidade espermática no momento da descongelação e menor dano ao acrossomo do que utilizando um diluidor a base de gema de ovo-TES-TRIS (SCHENK et al., 1987).

Estudo comprovou a superioridade do meio diluente M20 sobre glicina-gema e TRIS-gema obtendo desempenho superior nas variáveis MT, MP, RAP e IMP (integridade de membrana plasmática), provando que o diluente M20 superou os demais nas variáveis relativas à mobilidade dos espermatozóides, o que pode ser explicado pela diferença na densidade existente entre os diluidores (ALBERTI, 2007).

Espermatozóides criopreservados em diluidor TRIS apresentaram menor proporção de retilinearidade (STR), linearidade (LIN) e diferenças significativas para a amplitude lateral da cabeça espermática (ALH) e frequência de batimentos flagelares (BCF) após a descongelação em relação às células processadas em diluente MKA independentemente da concentração espermática. Os maiores valores de BCF, STR e LIN apresentados pelos espermatozóides criopreservados com o diluidor MKA indicam uma maior linearidade de movimento em relação às células processadas em diluidor TRIS (CRESPILHO, 2007).

Em experimento realizado o Botu-Bov<sup>®</sup> apresentou melhor motilidade pós-descongelação do que o diluidor Bioxcell<sup>®</sup>, porém as velocidades espermáticas avaliadas VAP (velocidade de trajeto), VSL (velocidade linear progressiva) e VCL (velocidade curvilínea) foram mais altas para o Bioxcell<sup>®</sup>, este achado pode ser explicado por diferenças na densidade entre os diluidores ou presença de partículas maiores, que podem interferir na velocidade espermática (CELEGHINI, 2005).

Em um estudo recente, foi utilizado diluidor a base de leite integral com ou sem frutose para a congelação do sêmen bovino, os resultados obtidos foram

semelhantes nos padrões de motilidade pós-descongelamento e taxas de não-retorno aos 56 dias pós-parto quando se utilizou 4 ou 28h de equilíbrio a 5°C. No mesmo estudo quando comparou a utilização de leite integral-glicerol e a adição de 1,25% de frutose ao leite integral-glicerol não foram apresentadas diferenças na fertilidade (FOOTE et al., 2001).

A gema do ovo da galinha é usualmente o agente mais efetivo para proteção do espermatozóide contra os danos causados pelo frio e comprovou que preserva a fertilidade após o armazenamento do sêmen na forma líquida ou congelada. Apesar do uso de diluidores contendo gema de ovo seja realizado à mais de 60 anos, o mecanismo envolvido na proteção pela gema de ovo contra os danos causados pelo armazenamento, refrigeração e congelamento ainda não está completamente elucidado (BERGERON et al., 2004).

Na presença da gema de ovo pode haver diminuição na concentração de glicerol, pois acredita-se que ela atua na superfície da membrana plasmática promovendo proteção durante o choque frio. A gema possui lipoproteínas de baixa densidade que são responsáveis pela ação protetora das membranas (WATSON, 1995).

Antibióticos também são utilizados como compostos dos meios diluentes e atuam na inibição bacteriana (GRAHAM, 1995).

Na década de 50, testou-se um meio diluente contendo citrato de sódio acrescido de penicilina e estreptomicina recém-preparado ou preparado e congelado um mês antes do uso, embora o diluente acrescido de penicilina e estreptomicina e congelado 1 mês antes tenha dado o melhor índice de prenhez (63,3%), não houve diferença significativa nas taxas de concepção (HURST, 1953).

Estudos sobre a adição de antioxidantes na criopreservação de sêmen ovino e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e peroxidação lipídica que podem levar a um potencial dano à célula espermática demonstraram que a adição de antioxidantes induziu a uma ligeira diminuição na produção dessas substâncias levou a um aumento da motilidade, viabilidade espermática e reduziu a capacitação prematura (SEPÚLVEDA et al., 2006).

Ácidos graxos insaturados presentes na membrana espermática são susceptíveis a peroxidação (HALLIWELL et al., 1984), e as conseqüências são numerosas e inclui danos à membrana, inibição da respiração e vazamento de enzimas intracelulares (WHITE, 1993). Estudos indicaram que a criopreservação

diminui as defesas antioxidantes do sêmen e revelaram que o controle sobre a oxidação pelo uso de antioxidantes exógenos no meio diluente muito contribuíram para a manutenção da qualidade espermática (FOOTE, 1967). A inclusão de antioxidantes naturais, tais como A-Tocoferol Ascorbato teve efeito protetor sobre o metabolismo e viabilidade celular de espermatozóides bovinos criopreservados (BECONI et al., 1993).

Em equinos, a produção de ROS pode levar a perda da integridade do DNA espermático, o que pode causar redução no desenvolvimento embrionário após a fecundação. O envolvimento de ROS nos danos ao DNA permanece a ser determinado, porém tal injúria pode ser neutralizada pela adição de antioxidantes (BAUMBER et al., 2003).

O metabolismo espermático leva a produção e conseqüentemente ao aumento da concentração de íons hidrogênio no meio extracelular. Se porventura não ocorrer a remoção desses íons, ocorrerá redução de pH, levando à acidez do meio onde os espermatozóides se encontram, acarretando diminuição na longevidade e fertilidade das células espermáticas. (SMITH,1984, citado por ENGLAND, 1993).

A sobrevivência espermática durante o armazenamento em baixas temperatura está inversamente relacionada com o grau de ionização de sais como citrato de sódio, bicarbonato de sódio e EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). Ao compararem algumas substâncias tampões, verificaram que o citrato de sódio tem o menor índice de ionização, sendo considerado ótimo agente tampão (SNOECK et al., 2007).

Os crioprotetores podem ser classificados em penetrantes e não penetrantes. Os crioprotetores penetrantes são moléculas pequenas que agem nos meios intracelulares e extracelulares agindo como solvente e soluto, com a capacidade de atravessar a membrana plasmática e controlar a pressão osmótica intra e extracelular. Dentre os crioprotetores penetrantes podemos citar o etilenoglicol, propilenoglicol, propanodiol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, e o glicerol que é considerado o principal deles, pois apresenta as melhores taxas de congelação de sêmen bovino. Os crioprotetores não-penetrantes agem no meio extracelular como solutos ou colóides auxiliando no transporte de água para o exterior da célula, dentre eles podemos citar as proteínas como gema de ovo e leite desnatado, açúcares, polímeros sintéticos e amidas (GRAHAM, 1995).

A eficácia do glicerol como crioprotetor é parcialmente atribuída à sua capacidade de prevenir algumas das transições de fase que ocorrem durante a refrigeração, aumentando a permeabilidade à água e fluidez da membrana espermática (NOILES et al., 1993).

Experimento realizado para testar a eficácia de crioprotetores intracelulares alternativos e o efeito da osmolaridade utilizando diferentes meios de congelação à base de lactose-EDTA-gema de ovo, sobre a viabilidade espermática pós-descongelação de sêmen equino demonstrou que o crioprotetor acetamida preservou melhor a motilidade e o vigor do que o etilenoglicol (SNOECK et al., 2007).

Em trabalho realizado em cães que avaliou a capacidade crioprotetora do etilenoglicol em diluente TRIS-gema na manutenção da motilidade, do vigor e da morfologia espermática obteve-se que, em determinadas concentrações o etilenoglicol pode substituir o glicerol em diluentes à base de TRIS-gema (SOARES et al., 2002). Os efeitos tóxicos que o glicerol exerce sobre os espermatozoides são apresentados por Hammerstedt et al. (1992) que descreve uma provável interação molecular do glicerol com a membrana plasmática dos espermatozoides, alterando sua fluidez pela inserção na dupla camada lipídica, o que modifica a viscosidade citoplasmática e, dessa forma, afeta todas as reações metabólicas.

## **2.5 Plasma Seminal**

O plasma seminal serve como veículo para os espermatozoides ejaculados, consistindo em uma mistura de secreções dos testículos e glândulas sexuais acessórias, com função carreadora dos gametas masculinos até o trato genital feminino, viabilizando a fecundação (CHACUR et al., 2006).

No plasma seminal bovino existe uma família de proteínas chamadas BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 e BSP-30-KDa (coletivamente denominadas BSP proteínas). Elas se ligam aos fosfolípidos da membrana espermática na ejaculação. A exposição contínua do espermatozoide a essas proteínas pode tornar a membrana muito sensível à criopreservação (MANJUNATH et al., 2002).

Chacur et al. (2006) avaliaram touros Nelore e os perfis das proteínas do plasma seminal e concluíram que a presença de peptídeos de 10, 16 e 26 KDa, interferem de forma negativa frente à aptidão reprodutiva.

A remoção do plasma seminal por centrifugação mostrou ser positiva para o processo de congelação do sêmen bovino. Nas variáveis espermáticas motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e porcentagem de espermatozóides rápidos (RAP), as médias das amostras que tiveram o plasma seminal removido foram superiores. Constatou também os benefícios da remoção do plasma seminal na análise de integridade de membrana plasmática, na qual as médias obtidas das amostras congeladas sem plasma seminal foram superiores às congeladas de modo convencional. A intensidade de centrifugação de 600xg por um tempo de 10 minutos, proporcionou uma boa taxa de recuperação espermática e não comprometeu a atividade morfo-funcional dos espermatozóides (ALBERTI, 2007).

## **2.6 Avaliação Espermática**

Parâmetros convencionais utilizados na avaliação espermática (número total de espermatozóides móveis, motilidade progressiva e morfologia) têm se mostrado limitados quanto à capacidade de prever o potencial de fertilidade do sêmen. Um único teste é pouco eficaz pelo fato de que cada espermatozóide apresenta múltiplos compartimentos subcelulares com diferentes funções a serem avaliadas (SANTOS, 2003). A motilidade espermática é geralmente considerada como um importante parâmetro para avaliação da qualidade seminal (HOFLACK et al., 2007), porém testes que medem diferentes características do espermatozóide e avaliam vários atributos podem fornecer uma melhor estimativa da fertilidade do que um único teste laboratorial (SCHENCK et al., 1987).

Em trabalho realizado para avaliar o efeito da seleção andrológica buscando marcadores fisiológicos para fertilidade e congelabilidade do sêmen em touros jovens da raça Nelore, obteve-se que a seleção andrológica pode propiciar a escolha de reprodutores superiores, mas por si só não é capaz de prever eficazmente o potencial de congelação do sêmen, visto que as características de

peso, PE (perímetro escrotal) e aspectos morfológicos do sêmen têm baixa influência no sucesso da congelação (SALVADOR et al., 2008).

A maior motilidade inicial não garante, por si só, bom desempenho na congelação, porém permite que animais com altas taxas de queda de motilidade ainda apresentem aprovação no sêmen pós-descongelação, sugerindo que touros jovens com maior concentração espermática no ejaculado têm tendência à melhor desempenho para congelação de sêmen (SALVADOR et al., 2008). Para amostras altamente concentradas pode-se observar uma análise incorreta das células espermáticas mais rápidas em função das próprias colisões que ocorrem entre os espermatozóides ou pela grande proximidade existente entre as células (VERSTEGEN et al., 2002).

Apesar da controvérsia existente a respeito da correlação da motilidade espermática com os índices de fertilidade *in vivo*, a análise de múltiplos atributos de movimentos espermáticos por meio da técnica da Análise Computadorizada do Sêmen (CASA) e determinação da viabilidade espermática utilizando técnicas de análise de membranas citoplasmáticas, podem agregar maior sensibilidade à avaliação *in vitro* do sêmen bovino. Diversos fatores podem afetar a fertilidade dos espermatozóides bovinos congelados, influenciando, conseqüentemente, nos resultados obtidos durante a realização das avaliações laboratoriais da qualidade espermática. Fatores como o tipo do processamento espermático, incluindo os diluentes de congelação utilizados e a concentração de espermatozóides por palheta pode exercer influência sobre os índices de congelabilidade e fertilidade (CRESPILO, 2007).

### **2.6.1 Análise de Integridade da Membrana Plasmática**

Em búfalos, espermatozóides com 80,2% de membranas intactas, apresentaram redução para 60,4% após o tempo de equilíbrio e, em seguida para 32,6% após congelação e descongelação. A porcentagem de acrossomos normais diminuiu de 73,2% para 61,8% após congelação e descongelação (RASUL et al., 2001).

Snoeck et al. (2007) descreveram, em eqüinos, que a utilização de etilenoglicol ou acetamida como crioprotetores preservaram melhor a integridade das membranas plasmáticas e acrossomal quando a curva de congelação foi realizada com refrigeração prévia, porém quando usado etilenoglicol 3,5% a integridade das membranas plasmáticas foi mais bem preservada quando submetida a congelação rápida sem refrigeração prévia. Também demonstraram que o diluidor com altas concentrações de açúcares, tampões e sais e 20% de gema mostrou melhor potencial para proteção da característica integridade estrutural das membranas plasmáticas e acrossomal.

Necessitamos de uma teoria mais elaborada sobre as causas da ruptura da membrana plasmática durante a criopreservação. A proporção de células que sobrevivem após congelação é determinada pela sensibilidade ao estresse osmótico durante refrigeração e reaquecimento. O fato de muitas vezes o sêmen de um reprodutor ser classificado como de alta ou baixa congelabilidade implica que certas características estruturais da membrana podem ser determinadas geneticamente. A tentativa de modificar a composição lipídica não demonstrou quaisquer benefícios claros, talvez implicando que a membrana possui outros elementos que podem ser mais importantes, por exemplo, o citoesqueleto. Sabe-se que a permeabilidade da membrana é aumentada após a refrigeração podendo ter como causa os efeitos sobre proteínas específicas, os canais de cálcio, que sua regulação é claramente afetada pelo frio levando a graves conseqüências em termos de função celular. Danos durante refrigeração e reaquecimento levam os espermatozóides a se comportarem como se fossem capacitados devido a tais fatores levarem a exocitose acrossomal (WATSON, 2000).

Rasul et al. (2001) afirmaram que alguns espermatozóides possuem membrana plasmática menos eficiente em efetuar trocas, sofrendo maiores danos durante processos osmóticos. Também concluíram que a perda no percentual de acrossomos normais durante a criopreservação foi de cerca de 20%.

Estudo comparou duas estações climáticas sobre a produção e congelabilidade de sêmen de touros de raças zebuínas e taurinas e demonstrou maior descarte nas raças zebuínas em ambas as estações. Também houve diferença no descarte entre as estações dentro das subespécies. Isto, provavelmente, indica menor resistência na estrutura da membrana espermática do sêmen de zebu para os rigores do processo de congelação, em especial no período

em que há maior umidade relativa do ar. Ambas as raças tiveram mais ejaculados congelados na estação seca do que na estação chuvosa (ANCHIETA et al., 2005).

Harrison et al. (1990) descreveram uma técnica para avaliação da integridade da membrana plasmática, onde uma pequena quantidade de formaldeído era adicionada à amostra contendo sondas fluorescentes, o que possibilitou a avaliação por preparação úmida em microscópio de epifluorescência. Associações de sondas fluorescentes possibilitam a avaliação simultânea de mais do que um compartimento da célula espermática (CELEGHINI, 2005).

Com o objetivo de avaliar a integridade da membrana plasmática, foi utilizada com sucesso a associação do IP (iodeto de propídeo) com o CFDA (diacetato de carboxifluoresceína) (HARRISON; VICKERS, 1990).

Estudos comprovaram que a avaliação simultânea da integridade da membrana plasmática e acrossomal e da função mitocondrial pode ser realizada por técnicas simples, por meio da utilização de sondas fluorescentes PI, FICTC-PSA e MITO ou PI, FICT-PSA e CMXRos ou PI, FICT-PSA e JC-1 (CELEGHINI, 2005).

Para a espécie bubalina, a integridade da membrana acrossomal foi melhor mantida com o meio glicina-gema em 1 hora de equilíbrio, em relação ao meio TES (CHACUR, 1996). O meio glicina-gema foi superior na manutenção da integridade acrossomal, pós-descongelação, para o tempo de equilíbrio de 1 hora para búfalos (CHACUR et al., 1997).

### **2.6.2 CASA**

O CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) é um sistema composto por “hardware” e “software” utilizado para analisar imagens, oferecendo informações precisas do movimento individual de cada célula bem como as subpopulações de células espermáticas (AMANN et al., 2004).

Com a capacidade de avaliar algumas características espermáticas definidas, tais como: móvel não progressivo, linear lento, linear rápido e imóvel, o CASA identifica as células e realiza um desenho para cada espermatozóide com a finalidade de representar a sua trajetória real (MORTIMER, 2000).

Usualmente a mensuração da qualidade espermática tem sido baseada na avaliação subjetiva, por meio de observação visual de parâmetros como motilidade e vigor, porém, estudos relatam poder haver variações de até 60% nesse tipo de estimativa devido à variação individual do ser humano em quantificar as diferentes subpopulações espermática de determinada amostra (VERSTEGEN et al., 2002).

Na década de 40 Lord Rothschild, desenvolveu o método de fotografias em tempo real para criar imagens da trajetória do movimento espermático e manualmente determinava a velocidade do deslocamento (AMANN et al., 2004). O HTM-IVOS Sperm Analyzer<sup>®</sup> surgiu em 1992 e utilizava de forma integrada o microscópio ao computador permitindo a aquisição de imagens digitalizadas fornecendo parâmetros de movimento e velocidade espermática (IGUER-OUADA et al., 2001).

A análise computadorizada de sêmen (CASA) permite dados detalhados, precisos e altamente repetitivos em diferentes parâmetros, tanto na motilidade de sêmen humano quanto nas espécies animais. Assim, CASA oferece uma previsão mais exata da fertilidade do que os parâmetros avaliados pela rotina microscópica (FARRELL et al., 1996).

Embora o CASA já tenha sua utilização validada em várias espécies animais como bovina e suína, ainda não é uma prática utilizada rotineiramente, pois ainda não está padronizado para todas as espécies animais (VERSTEGEN et al., 2002).

O CASA tem proporcionado a obtenção de resultados relevantes na realização de pesquisas básicas, sendo que os mesmos não teriam sido possível sem esta tecnologia. Em amostras que foram apresentadas a vários tipos de tratamentos a nível experimental, o CASA mostrou que sua utilização foi de grande valia para se monitorar a qualidade espermática (FARRELL et al., 1996), sendo na pesquisa de novos diluidores seminais, crioprotetores ou outros tipos de processamentos (AMANN et al., 2004).

Uma grande quantidade de características é avaliada para proporcionar a mensuração nos padrões do movimento espermático, tais como: velocidade curvilínea (VCL), velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN) (MORTIMER, 2000).

O CASA oferece os seguintes padrões conforme constatado por Verstegen et al. (2002):

- **Velocidade curvilínea (VCL- $\mu\text{m/s}$ ):** é a velocidade da trajetória real do espermatozóide, apresenta-se sempre a superior dentre todas as velocidades, sendo elemento para o cálculo da linearidade.

- **Velocidade linear progressiva (VSL- $\mu\text{m/s}$ ):** medida por meio do estabelecimento de uma linha reta entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozóide, sendo sempre a de menor valor entre as velocidades.

- **Velocidade média da trajetória (VAP- $\mu\text{m/s}$ ):** definida como a velocidade média da trajetória do espermatozóide. Apresenta-se semelhante a VSL nos casos em que a trajetória da cabeça do espermatozóide se faz muito regular e linear apresentando baixo movimento lateral, por outro lado quando apresenta-se muito irregular, não linear ou com um elevado movimento lateral ela se torna superior que a VSL.

- **Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH- $\mu\text{m}$ ):** Consiste na amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozóide em sua trajetória real. Sua avaliação tem relação com a capacidade de penetração na zona pelúcida do óvulo, a ALH, dentre outras características avaliadas, é uma das que possui efeito sobre a fecundação.

- **Frequência de batimentos flagelar cruzado (BCF-Hz):** Está relacionado com o número de vezes em que a cabeça do espermatozóide cruza a direção do movimento. Sendo subestimada sempre que houver um número maior de batimentos/segundos do que imagens/segundos.

- **Retilinearidade (STR-%):** É a relação dada em percentagem entre VSL e VAP. Estimando a proximidade do percurso da célula a linha reta.

- **Linearidade (LIN-%):** É a relação fornecida em percentual entre VSL e VCL, sendo sua linearidade menor sempre que o espermatozóide se afastar da velocidade em linha reta.

Em relação aos dados de ALH, BCF, STR e LIN foi constatado que não apresentaram diferenças significativas quando levada em consideração a análise do sêmen fresco e descongelado, porém no mesmo estudo também foi constatada uma diminuição na motilidade total de 93% para 51% e da motilidade progressiva de 64%

para 21%, tendo como causa dessa queda a criopreservação (ERIKSSON et al., 2000).

Uma menor BCF combinada a uma maior ALH caracteriza movimentos espermáticos menos fluentes, provavelmente devido resistência causada por maior atrito levando a uma menor velocidade. Além disso, quanto menor o BCF, mais lento será o movimento progressivo como resultado de menor força propulsora, resultando em uma menor STR. Aparentemente, todas as anormalidades na morfologia, influenciam negativamente na motilidade espermática (HOFLACK et al., 2007). Amostras espermáticas que apresentam valores de VAP, VSL, e VCL significativamente maiores, produzem maiores taxas de fecundação (acima de 50% de taxa de clivagem) em relação a partidas seminais que apresentam baixos índices de velocidade (VERSTEGEN et al., 2002).

Os sistemas automáticos monitoram o movimento de cabeça, pois é mais fácil de ser monitorado em relação ao movimento do flagelo, mesmo sendo este a parte que dá origem a motilidade (AMANN et al., 2004). Para se obter uma contagem confiável de batimentos flagelares é necessário a observação de um número elevado de batimentos, sendo este superior a 200 batimentos por segundo, pois o flagelo tem seus batimentos em alta frequência. A cabeça possui seu movimento com menor velocidade do que o flagelo, isso vem possibilitar a obtenção de imagens mais nítidas quando se utiliza a tecnologia de vídeo convencional (MORTIMER, 2000).

Para leitura do CASA as amostras devem ser diluídas respeitando as concentrações entre  $20-50 \times 10^6$  espermatozoides/mL, porém não se deve utilizar os meios diluentes derivados de leite ou gema de ovo, pois os mesmos não podem ser distinguidos dos espermatozoides imóveis por possuírem partículas com tamanho semelhante a cabeça do espermatozoide (VERSTEGEN et al., 2002). O computador pré-estabelece um tamanho máximo e mínimo da cabeça do espermatozoide para cada espécie animal, assim o computador reconhece qualquer objeto que possua o mesmo tamanho da cabeça do espermatozoide, e se estiver fora dessas medidas pré-estabelecidas automaticamente será considerada parte do fundo (MORTIMER, 2000).

Crespilho et al. (2006) descreveram um quadro de infertilidade relacionada a astenoteratozoospermia de um jumento SRD, apresentando uma alta incidência de espermatozoides portadores de gota citoplasmática proximal à

microscopia de luz. Embora volume e concentração espermática tenham apresentado normalidade, a análise computadorizada realizada por meio do aparelho Hamilton Thorn Research<sup>®</sup>, revelou baixa motilidade total (MT 20%) e progressiva (MP 5%). Concluiu-se que a alta ocorrência de gotas citoplasmáticas observadas sob microscopia de luz relacionava-se a presença de pequenas quantidades de citoplasma protruído, chegando-se ao diagnóstico de Defeito Microtubular Espermático.

Rasul et al. (2001) analisando espermatozóides de búfalos, por meio do CASA, concluíram que, durante o processo de criopreservação as lesões no axonema diminuem a capacidade de movimentação dos espermatozóides, bem como sua motilidade linear e linearidade e que tais lesões ocorrem principalmente durante o período de equilíbrio.

Na década de 90, utilizaram CASA para avaliar 12 características de movimento em espermatozóides de búfalos, concluindo que os meios CUE (Cornell University) e EYGT (gema de ovo-glicerol-TRIS) permitiram alta velocidade e elevado percentual de motilidade espermática durante o armazenamento a 5°C por 2 dias (TARDIF et al., 1997).

Foi concluído que varrões que possuíam uma leitegada com um número superior que 10 leitões, a porcentagem de espermatozóides móveis se mostrava próximo dos 93%, enquanto que em varrões que possuíam leitegada com número inferior ao acima mencionado havia uma diminuição na porcentagem de espermatozóides móveis estabelecidos em torno dos 80% (HIRAI et al., 2001).

Estudo realizado utilizando CASA e microscopia de fluorescência para avaliar o efeito da idade sobre alterações na qualidade do sêmen em touros Holandeses comprovou que a maioria dos parâmetros sobre a qualidade espermática apresentaram-se superiores em animais de até 3 anos de idade (HALLAP et al., 2006).

A utilização do CASA veio proporcionar segurança e confiabilidade nos dados obtidos nas diferentes características espermáticas avaliadas. Por conta disso é considerado uma ferramenta que pode aumentar o conhecimento e habilidade para manipular espermatozóides, acabando com a subjetividade das análises realizadas pelos métodos convencionais (MATOS et al., 2008).

## REFERÊNCIAS

ALBERTI, K. **Inovações metodológicas na congelação de sêmen bovino**. Botucatu, 2007. 113 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

AMANN, R.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 317-325, 2004.

ANCHIETA, M. C. et al. Descarte e congelabilidade do sêmen de touros de raças zebuínas e taurinas em central de inseminação artificial no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 2, p.196-204, 2005.

ASBIA - **Informações técnicas sobre inseminação artificial**. Disponível em: <<http://www.asbia.org.br>>. Acesso em: 15 jan. 2010a.

ASBIA – Relatório da ASBIA sobre a venda de sêmen em 2008 demonstra crescimento no setor. Disponível em: <<http://www.asbia.org.br>>. Acesso em: 17 jan. 2010b.

BAILEY, J. L.; BILODEAU, J. F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 1, 2000.

BAUMBER, J.; BALL, B. A.; LINFOR, J. J.; MEYERS, S. A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa, **Journal of Andrology**, v. 24, n. 4, 2003.

BECONI, M. T. et al. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. **Theriogenology**, v. 40, p. 841–851, 1993.

BERGERON, A. et al. Low density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 3, p. 708-717, 2004.

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes.** 2005. 186 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária e Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

CHACUR, M. G. M. **Avaliação da congelação de sêmen bubalino com os diluidores Glicina-Gema, Tryladil® e TES em diferentes tempos de equilíbrio.** Botucatu, SP. FVMZ/UNESP, 1996. 105 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista.

CHACUR, M. G. M.; OBA, E.; GONZALES, C. I. M. Equilibrium time influence on motility, vigor and membrana integrity of thawed buffalo semen using Triladyl, glycine-egg-yolk and TES extenders. In: WORLD BUFFALO CONGRESS. 5., 1997. **Anais ...** Caserta, Italy, 1997. p. 846-849.

CHACUR, M. G. M.; MARTINEZ, A. I. S.; MACHADO NETO, N. B. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a qualidade do sêmen de touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). **Veterinária Notícias**, v. 12, n. 1, p. 87-93, 2006.

COELHO, L. A. et al. Fecundação *in vitro* de ovócitos de bovinos com sêmen submetido a diferentes diluidores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 2, p. 397-402, 2000.

COTTER, P. Z.; GOOLSBY, H. A.; PRIEN, S. D. Preliminary evaluation of a unique freezing technology for bovine spermatozoa cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, p. 98-99, 2005.

CRESPILHO, A. M.; ALVARENGA, F. C. L.; PAPA, F. O. Infertilidade associada a defeito microtubular dos espermatozóides de jumento (*Equus asinus*) avaliados por microscopia eletrônica de transmissão. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p. 1507-1510, 2006.

CRESPILHO, A. M. **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).** Botucatu, 2007. 123 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

DAAS, J. H. G. et al. The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1714-1723, 1998.

DEJARNETTE, J. M. et al. Accessory sperm: their importance to fertility and embryo quality, and attempts to alter their numbers in artificially inseminated cattle. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 484-491, 1992.

DROBNIS, E. Z. et al. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. **Journal of Experimental Zoology**, v. 265, n. 4, p. 432-437, 1993.

ENGLAND, G. C. W. Criopreservation of dog semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 47, p. 243-255, 1993.

ERIKSSON, B. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen. **Animal Reproduction Science**, v. 63, p. 205-220, 2000.

FARRELL, P. B. et al. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). **Journal of Andrology**, v. 17, p. 293-300, 1996.

FOOTE, R. Factors prolonging survival of unfrozen bovine spermatozoa. **Journal of Dairy Science**, v. 50, p. 1338-1340, 1967.

FOOTE, R. H.; KAPROTH, M. T. Large batch freezing of bull semen: effect of time of freezing and fructose on fertility. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 453-456, 2001.

GRAHAM, J. K. Response of spermatozoa to freezing. In: Techniques for handling and utilization of transported cooled and frozen equine spermatozoa. 1995. **Proceedings ... Equine Sciences**. Colorado State University Fort Collins, Colorado, USA, 1995. p. 83-95.

HALLAP, T.; JAAKMA, Ü.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Changes in semen quality in estonian houstein al bulls at 3, 5 and 7 years of age. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 214-218, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERRIDGE, J. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. **Lancet**, v. 1, p. 1396-1398, 1984.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAN, J. K. Cryopreservation of mammalian sperm: the enigma of glycerol. **Cryobiology**, v. 29, p. 26-38, 1992.

HARRISON, R. A.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 343-352, 1990.

HIRAI, M. et al. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. **Journal of Andrology**, v. 22, p. 104-110, 2001.

HOFLACK, G. et al. Comparison of computer-assisted sperm motility analysis parameters in semen from belgian blue and Holstein-friesian bulls. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 153-161, 2007.

HORN, M. M.; COSTA A. S.; MORAES, J. C. F. Qualidade do sêmen bovino congelado submetido a repetidas exposições ao ambiente. **Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal**, v. 85, Supl. 1, p. 353-355, 1997.

HURST, V. Dilution of bull semen with frozen egg yolk-sodium citrate. **Journal of Dairy Science.**, v. 36, n. 2, p. 181-184, 1953.

IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J. Evaluation of the Hamilton-Thorn computer based automated system for dog semen analysis. **Theriogenology**, v. 55, p. 733-749, 2001.

KENNEY, R. M. et al. Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. In: ANNUAL CONVENTION AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS. 1975. Boston. **Proceedings...** Boston: AAEP, 1975. p. 327.

LOPES, B. V. et al. Estudo da viabilidade de um novo diluidor para a refrigeração do sêmen canino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 3/4, p. 174-178, 2005.

MANJUNATH, P. et al. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1250-1258, 2002.

MATOS, D. L. et al. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 4, p. 225-232, 2008.

MORTIMER, S. T. Casa-Practical aspects. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 4, p. 515-524, 2000.

NOILES, E. E. et al. Determination of water permeability coefficient for human spermatozoa and its activation energy. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 99-109, 1993.

RASUL, Z.; AHMAD, N.; ANZAR. M. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome, morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 2, p. 278-283, 2001.

SALVADOR, D. F. et al. Associação entre o perfil andrológico e a congelação de semen de touros da raça Nelore aos dois anos de idade, pré-selecionados pela classificação andrológica por pontos (CAP). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 3, p. 587-593, 2008.

SANTOS, G. C. J. **Viabilidade de sêmen eqüino congelado em meios diluidores de diferentes composições**. Belo Horizonte. 2003. 58 f. Dissertação (Mestrado Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais.

SCHENK, J. L.; AMANN, R. P.; ALLEN, C. H. Effects of extender and insemination dose on postthaw quality and fertility of bovine sperm. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 1458-1464, 1987.

SEPÚLVEDA, N. et al. Criopreservación de semen ovino com adición de antioxidantes. **Seoc**, p. 404-406, 2006.

SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; SILVA, L. D. M. Comparação entre água de coco em pó (ACP<sup>®</sup>) e o TRIS como diluidores na criopreservação do sêmen de cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 6, p. 767-774, 2006.

SNOECK, P. P. N.; HENRY, M.; MELO, M. I. V. Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós-descongelação de sêmen eqüino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 29, n. 1, p. 56-64, 2007.

SOARES, M. P. et al. Etileno glicol na criopreservação de sêmen canino. **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 649-655, 2002.

TARDIF, A. L. et al. Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1606-1612, 1997.

THACKER, D. L.; ALMQUIST J. O. Diluters for bovine semen. I. fertility and motility of bovine spermatozoa in boiled milk. **Journal of Dairy Science**, v. 36, p. 173-180, 1953.

THOMAS, C. A. et al. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 786-793, 1998.

TORRES-JÚNIOR, J. R. S. et al. Considerações técnicas e econômicas sobre reprodução assistida em gado de corte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 33, n. 1, p. 53-58, jan./mar. 2009.

VERSTEGEN, J.; OUADA, M. I.; OCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 149-179, 2002.

VISHWANATH R. Artificial insemination: the state of the art. **Theriogenology**, v. 59, p. 571-584, 2003.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility and Development**, v. 7, p. 871-91, 1995.

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

WHITE, I. G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction Fertility and Development**, v. 5, p. 639-658, 1993.

### *3. ARTIGO CIENTÍFICO*

1 **Efeito de meios diluentes na viabilidade de sêmen congelado bovino**  
2 **em Central de Inseminação Artificial**

3 Effect of different extenders on viability of bovine frozen semen  
4 in Artificial Insemination Center

5  
6 M.G.M. Chacur<sup>1</sup>, H.S. Dias<sup>1</sup>, F.O. Papa<sup>2</sup>, B.A. Louvison<sup>1</sup>, M.M. Calesco<sup>1</sup>, P.M. Papa<sup>1</sup>

7 <sup>1</sup>Universidade do Oeste Paulista, Rodovia Raposo Tavares, Km 572, Campus II,  
8 CEP 19067-175. Presidente Prudente, SP/Brasil, [chacur@unoeste.br](mailto:chacur@unoeste.br) tel: (18) 3229-  
9 2077, FAX: (18) 3229-2080.

10 <sup>2</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP, Botucatu-SP.

11  
12 **RESUMO**

13  
14 O aumento da produtividade na pecuária pode ser adquirido com o emprego de  
15 biotécnicas como a inseminação artificial. O objetivo deste trabalho foi testar a  
16 viabilidade de novos meios de congelamento de sêmen para touros classificados como de  
17 alta e regular congelabilidade. Foram utilizados 10 touros zebuínos, sendo classificados  
18 como de alta (n=5) e regular (n=5) congelabilidade. Os ejaculados foram congelados  
19 com os meios: TRIS-gema, Botu-Bov<sup>®</sup> e Botu-Bov Egg Free<sup>®</sup> e avaliados pela análise  
20 computadorizada (CASA) e integridade da membrana por fluorescência segundo  
21 (Harrison & Vickers, 1990). A estatística foi realizada por ANOVA e teste de Tukey a  
22 5%. Não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre os touros de alta e regular congelabilidade, na  
23 pré-congelamento. Houve superioridade dos diluentes Botu-Bov<sup>®</sup> e Botu-Bov Egg Free<sup>®</sup>  
24 ( $p<0,05$ ) para CASA: MP, ALH, BCF, STR, LIN e RAP, para regular congelabilidade.  
25 Os touros de regular congelabilidade também apresentaram superioridade ( $p<0,05$ ) no  
26 Botu-Bov Egg Free<sup>®</sup> sobre o Botu-Bov<sup>®</sup> nos parâmetros MT e VSL. Também houve  
27 superioridade dos diluentes Botu-Bov<sup>®</sup> e Botu-Bov Egg Free<sup>®</sup> ( $p<0,05$ ) nos parâmetros  
28 BCF e STR em touros de alta congelabilidade. Os meios Botu-Bov<sup>®</sup> e Botu-Bov Egg  
29 Free<sup>®</sup> apresentaram superioridade na maioria dos parâmetros avaliados pelo CASA,  
30 principalmente em touros de regular congelabilidade.

31

32 Palavras-Chave: touros, espermatozóiide, criopreservação, CASA, integridade de  
33 membrana.

### 34 **ABSTRACT**

35  
36 The increase number in the livestock can be acquired with the use of some bio  
37 techniques as the artificial insemination. The objective of this project was to test the  
38 viability of new extenders of freezing semen for bulls classified as high and regular  
39 freezability. It was used 10 Zebu bulls, being classified as high freezability (n=5) and  
40 regular one (n=5). The ejaculates were frozen using the extenders TRIS-gema, Botu-  
41 Bov<sup>®</sup> and Botu-Bov Egg Free<sup>®</sup>; evaluated by computer analysis (CASA) and the  
42 membrane integrity by fluorescence (Harrison & Vickers, 1990). The statistics was  
43 realized by ANOVA and Tukey test at 5%. No difference (p>0.05) between bulls of  
44 high and regular frozen, pre-freeze was found in the tests. However, there was the  
45 superiority of Botu-Bov<sup>®</sup> and Botu-Bov Egg Free<sup>®</sup> (p<0.05) for CASA: MP, ALH,  
46 BCF, STR, LIN and RAP for regular freezability. The Bulls that have regular  
47 freezability also presented superiority (p<0.05) from the Botu-Bov Egg-Free<sup>®</sup> from  
48 Botu-Bov<sup>®</sup> in the MT and VSL parameters. There was also the superiority of Botu-  
49 Bov<sup>®</sup> and Botu-Bov Egg Free<sup>®</sup> (p<0.05) in BCF and STR parameters used in bulls of  
50 high freezability. The extenders Botu-Bov<sup>®</sup> and Botu-Bov Egg Free<sup>®</sup> presented  
51 superiority in most parameters that were analyzed using the system CASA, mainly in  
52 bulls with regular freezability.

53  
54 Keywords: bulls, spermatozoa, cryopreservation, CASA, membrane integrity.

### 56 **INTRODUÇÃO**

57 O segmento da pecuária bovina, inserido no agronegócio, assume papel  
58 de destaque na economia do país pelo elevado potencial e taxa de crescimento. O  
59 aumento da produtividade nesse setor pode ser alavancado com o emprego de  
60 biotécnicas que melhorem o sistema de produção (Celeghini, 2005). Neste sentido, a  
61 inseminação artificial (IA) é um instrumento importante para contribuir para o avanço  
62 das modernas técnicas de produção animal (Bailey et al., 2000), entretanto para sua  
63 realização é necessário o uso do sêmen congelado (Celeghini, 2005).

64 Durante o processo de criopreservação, ocorre queda de  
65 aproximadamente 50% da viabilidade espermática devido aos efeitos osmóticos e  
66 térmicos, modificando a estrutura da membrana espermática, bem como da sua fluidez,  
67 permeabilidade e composição lipídica (Thomas et al., 1998). Modificações essas que  
68 levam os espermatozóides submetidos à congelação/descongelação a sobreviver menos  
69 tempo no trato reprodutivo da fêmea em comparação com espermatozóides oriundos do  
70 sêmen fresco (Watson, 2000).

71 A interação entre as células espermáticas e o meio diluidor representa um  
72 fator crucial para a preservação da integridade espermática e habilidade de fecundação  
73 (Manjunath et al., 2002). Um meio diluente eficaz tem como finalidade proteger a célula  
74 espermática durante as alterações térmicas na congelação/descongelação. Os meios  
75 diluentes são compostos por açúcares, crioprotetores, tampões e antibióticos para que  
76 seja fornecida nutrição, proteção contra as baixas temperaturas, evitar alterações de pH  
77 e inibição do crescimento bacteriano (Graham, 1995).

78 Parâmetros convencionais utilizados na avaliação espermática como:  
79 número total de espermatozóides móveis, motilidade progressiva e morfologia, têm se  
80 mostrado limitados quanto à capacidade de estimar o potencial de fertilidade do sêmen.  
81 Um único teste é pouco eficaz pelo fato de que cada espermatozóide apresenta múltiplos  
82 compartimentos subcelulares com diferentes funções a serem avaliadas (Santos, 2003).  
83 A motilidade espermática é geralmente considerada como um importante parâmetro  
84 para avaliação da qualidade seminal (Hoflack et al., 2007), porém testes que avaliam  
85 diferentes características do espermatozóide e de vários atributos podem fornecer uma  
86 melhor estimativa da fertilidade do que um único teste laboratorial (Schenk et al., 1987).

87 Usualmente, utilizam-se esses parâmetros convencionais na mensuração  
88 da qualidade espermática, podendo haver variações de até 60% nesse tipo de estimativa  
89 devido à subjetividade dos critérios e a variação individual do ser humano em  
90 quantificar as diferentes subpopulações espermáticas de determinada amostra  
91 (Verstegen et al., 2002). A Análise Computadorizada de Sêmen (CASA) fornece dados  
92 detalhados, precisos e com repetibilidade para diferentes parâmetros, relativos à  
93 motilidade do sêmen humano ou nas espécies animais. Assim, o CASA oferece uma  
94 melhor estimativa da fertilidade, em relação à rotina microscópica (Farrell et al., 1996).

95 Rasul et al. (2001) afirmaram que alguns espermatozóides possuem  
96 membrana plasmática menos eficiente em efetuar trocas, sofrendo maiores danos  
97 durante a variação osmótica. Estudos comprovaram que a avaliação simultânea da  
98 integridade das membranas plasmática e acrossomal e da função mitocondrial pode ser  
99 realizada por técnicas simples, por meio da utilização de sondas fluorescentes  
100 (Celeghini, 2005).

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

104

### 105 MATERIAL E MÉTODOS

106 Foram utilizados 10 touros zebuínos pertencentes à Central de  
107 Inseminação Artificial, sendo cinco animais classificados como de alta congelabilidade  
108 (ao menos 80% dos ejaculados aprovados na descongelação) e cinco touros como de  
109 regular congelabilidade (ao menos 60% dos ejaculados aprovados na descongelação).

110 Os ejaculados foram colhidos com vagina artificial, diluídos 1:1 com a  
111 fração I (sem glicerol) dos diluentes TRIS-gema, Botu-Bov<sup>®</sup> e Botu-Bov Egg Free<sup>®</sup> e  
112 acondicionados em sistemas passivos de transporte de sêmen refrigerado Botutainer<sup>®</sup> e  
113 transportados, durante aproximadamente 15 minutos, até o laboratório de Reprodução  
114 Animal, onde foram processados.

115 As amostras foram analisadas quanto às características macroscópicas e  
116 microscópicas: volume (mL), motilidade (%), vigor espermático (1 a 5) e turbilhão (1 a  
117 5) e concentração espermática ( $10^6$ /mL). O exame da morfologia espermática foi  
118 realizado, por meio de esfregaço corado pelo método de Karras modificado (Papa et al.,  
119 1988).

120 Para avaliar as diferenças entre os meios diluentes as amostras  
121 fracionadas foram acrescidas em 50% do volume com os respectivos diluentes II (com  
122 13% de glicerol) padronizando a concentração final em  $30 \times 10^6$  espermatozóides  
123 viáveis, envasadas em palhetas de 0,5mL devidamente identificados os grupos e  
124 lacradas com álcool polivinílico. Após o envase e fechamento, as palhetas foram  
125 dispostas horizontalmente sobre bandeja de aço telada e submetidas ao período de

126 estabilização, em geladeira automática digital (Minitub<sup>®</sup>, Porto Alegre-Brasil) a 5°C por  
127 quatro horas.

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

134 Decorridos três dias de estocagem em nitrogênio líquido, uma palheta de  
135 cada tratamento foi descongelada em banho-maria a 46°C/20 segundos (Dell’acqua Jr,  
136 2000) para uma melhor homogeneização das amostras, o sêmen foi transferido das  
137 palhetas para criotubos de 1,5mL (Eppendorf<sup>®</sup>) mantidos a temperatura de 37°C.

138 Foi realizada a análise computadorizada da motilidade espermática  
139 (CASA) pelo “Hamilton Thorne Research – IVOS 10”, após descongelação das doses  
140 de sêmen uma gota da amostra foi colocada na câmara de Makler aquecida a 38°C, para  
141 as análises das variáveis espermáticas. As análises foram realizadas em “setup”,  
142 ajustado para as características seminais de bovinos e avaliadas no mínimo três campos  
143 de cada amostra. As seguintes variáveis espermáticas foram analisadas: motilidade  
144 espermática total (MT), motilidade espermática progressiva (MP), velocidade de trajeto  
145 (VAP), velocidade linear (VSL), velocidade curvilinear (VCL), deslocamento lateral da  
146 cabeça (ALH), frequência de batimento da cauda (BCF), retilinearidade (STR),  
147 linearidade (LIN) e percentagem de espermatozoides rápidos (RAP).

148 A análise da integridade da membrana plasmática (IMP) foi realizada  
149 com a utilização das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e  
150 iodeto de propídeo (IP), segundo Harrison e Vickers (1990), na qual foi diluída 10µL de  
151 sêmen em 40µL da solução de trabalho. O material foi analisado entre lâmina e  
152 lamínula, em microscópio de epifluorescência (Leika<sup>®</sup>) com aumento de 400X, por  
153 excitação em filtro BW. Foram contadas 200 células, sendo consideradas íntegras as  
154 coradas totalmente em verde, e lesadas as coradas em vermelho ou em verde e  
155 vermelho. O resultado foi expresso em percentagem de células íntegras.

156 Para a análise estatística dos dados pré-congelação, foram usados o Teste  
157 t de Student para comparação das médias e o Teste não paramétrico de Mann Whitney

158 para análise dos escores. A avaliação estatística dos dados pós-descongelação foi  
159 realizada pela análise de variância (ANOVA). Para todas as análises utilizou-se nível de  
160 significância ( $p < 0,05$ ).

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

165

166

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

167 Para o sêmen fresco, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) nos  
168 parâmetros de motilidade, volume e vigor (Tab.1), concentração, defeitos maiores e  
169 menores (Tab.2) na pré-congelação, entre os touros de alta e regular congelabilidade. A  
170 associação de características como o percentual de motilidade, número de  
171 espermatozóides com movimento progressivo e o percentual de espermatozóides com  
172 morfologia normal permite fazer uma boa estimativa da capacidade fecundante de uma  
173 dada amostra (Severo, 2009), porém a seleção andrológica pode propiciar a escolha de  
174 reprodutores superiores, mas por si só não é capaz de predizer eficazmente o potencial  
175 de congelação do sêmen.

176 A alta motilidade espermática inicial, observada no sêmen fresco, não  
177 garante por si só, bom desempenho na congelação, porém permite que animais com  
178 altas taxas de queda da motilidade ainda apresentem aprovação no sêmen pós-  
179 congelação (Salvador et al., 2008). A análise de múltiplos atributos de movimentos  
180 espermáticos por meio da técnica CASA e determinação da viabilidade espermática, por  
181 meio de técnicas de análise de membranas citoplasmáticas podem agregar maior  
182 sensibilidade à avaliação *in vitro* do sêmen bubalino (Chacur, 1996; Chacur et al., 1997)  
183 e bovino (Crespilho, 2007).

### 184 **Local para inserir a Tabela 1.**

185 Com relação ao comparativo entre os três meios diluentes utilizados,  
186 observam-se os seguintes resultados: os touros de congelabilidade regular apresentaram  
187 motilidade total (MT) superior ( $p < 0,05$ ) no diluente Botu-Bov Egg Free<sup>®</sup> ( $73,3 \pm 6,6$   
188  $\mu\text{m/s}$ ) em relação ao Botu-Bov<sup>®</sup> ( $63,8 \pm 12,46$   $\mu\text{m/s}$ ) e ao TRIS ( $59,7 \pm 9,2$   $\mu\text{m/s}$ ), assim  
189 como a motilidade progressiva (MP) a superioridade ( $p < 0,05$ ) foi apresentada pelos

190 diluentes Botu-Bov<sup>®</sup> e Botu-Bov Egg Free<sup>®</sup> ( $52,4 \pm 5,3 \mu\text{m/s}$  e  $50,5 \pm 11,4 \mu\text{m/s}$ ),  
191 respectivamente, em relação ao TRIS ( $38,7 \pm 8,1 \mu\text{m/s}$ ) (Tab.3). Em um experimento  
192 semelhante, obtiveram-se MT e MP superiores quando foi utilizado o meio Botu-Bov<sup>®</sup>  
193 em relação ao meio Bioxcell<sup>®</sup> (Celeghini, 2005). Essa diferença significativa, segundo  
194 Hirai et al., (1997) pode estar relacionada com o aumento da motilidade em diluentes  
195 mais densos, cuja formulação inclui a gema de ovo.

#### 196 **Local para inserir a Tabela 2.**

197                   Para a velocidade de trajeto (VAP) e velocidade curvilinear (VCL), não  
198 houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) tanto em touros de alta quanto de regular  
199 congelabilidade. Em relação à velocidade linear (VSL), o diluidor Botu-Bov Egg Free<sup>®</sup>  
200 ( $81,5 \pm 9,8 \mu\text{m/s}$ ) foi superior ( $p < 0,05$ ) em touros de congelabilidade regular sobre o  
201 diluidor Botu-Bov<sup>®</sup> ( $72,7 \pm 6,5 \mu\text{m/s}$ ). Vale salientar que para fins de extrapolação para  
202 uso prático, os parâmetros de movimentação espermática por meio da análise  
203 computadorizada (CASA), estão relacionados com a taxa de fecundação, onde valores  
204 de VAP, VSL e a velocidade curvilinear (VCL) são significativamente maiores em  
205 amostras que produzem mais de 50% de oócitos fecundados (Verstegen et al., 2002).  
206 Entre os parâmetros cinéticos fornecidos pelo CASA, a VCL e o deslocamento lateral  
207 de cabeça (ALH) têm mostrado grande correlação com a taxa de fecundação de oócitos  
208 (Verstegen et al., 2002).

#### 209 **Local para inserir a Tabela 3.**

210                   O diluidor TRIS foi significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) para ALH, em  
211 relação aos meios estudados em touros de congelabilidade regular ( $6,9 \pm 0,8 \mu\text{m}$ ), com o  
212 Botu-Bov<sup>®</sup> ( $5,6 \pm 0,7 \mu\text{m}$ ) e Botu-Bov Egg Free<sup>®</sup> ( $5,9 \pm 0,7 \mu\text{m}$ ). Uma maior ALH  
213 caracteriza movimentos espermáticos menos fluentes (Verstegen et al., 2002). Estudos  
214 com os diluidores “Talp” e “Cue” comprovaram que tais diluidores promoveram alta  
215 motilidade espermática, pois são compostos por partículas livres de baixa viscosidade,  
216 porém podem causar maior movimento lateral de cabeça (Foote et al., 1960).

217                   Para a frequência de batimento de cauda (BCF) e retilinearidade (STR),  
218 respectivamente, os resultados foram: Botu-Bov<sup>®</sup> (regular congelabilidade:  $30,1 \pm 2,7$   
219 Hz;  $83,6 \pm 3,3\%$ ; e alta congelabilidade:  $28,0 \pm 3,2$  Hz;  $80,6 \pm 4,1\%$ ) e Botu-Bov Egg Free<sup>®</sup>  
220 (regular congelabilidade:  $31,7 \pm 3,3$  Hz;  $84,1 \pm 3,3\%$ ; e alta congelabilidade:  $31,1 \pm 3,3$  Hz;  
221  $82,9 \pm 3,7\%$ ), sendo superiores ( $p < 0,05$ ) em relação ao meio TRIS para os mesmos

222 parâmetros de movimento espermático, sendo: TRIS (regular congelabilidade: 25,8±3,7  
223 Hz; 76,7±4,7%; e alta congelabilidade: 24,2±2,8 Hz; 75,4±3,6%). Isso implica em  
224 movimentos progressivos mais rápidos, como resultado de maior força propulsora  
225 (Hoflack et al., 2007).

226 No tocante a linearidade (LIN) e percentagem de espermatozóides  
227 rápidos (RAP), os diluidores Botu-Bov<sup>®</sup> (54,2±5,2%; 64,9±8,8%) e Botu-Bov Egg  
228 Free<sup>®</sup> (54,9±4,1%; 61,6±14,1%) também apresentaram os melhores resultados (p<0,05)  
229 em touros de regular congelabilidade, em relação ao TRIS (46,4±4,9%; 55,8±9,5%).  
230 Parâmetros como BCF e LIN têm revelado correlação positiva com a taxa de prenhez  
231 (Verstegen et al., 2002). Valores superiores de BCF, STR e LIN foram encontrados  
232 quando sêmen bovino foi congelado com o diluidor Botu-Bov<sup>®</sup> o que indica que os  
233 espermatozóides congelados com esse diluidor apresentam seus movimentos com  
234 linearidade superior quando comparado com o diluidor TRIS-gema de ovo-frutose  
235 (Crespilho et al., 2006). Valores semelhantes foram encontrados nos parâmetros VSL,  
236 BCF, STR e LIN, o que indica maior vigor e retilinearidade dos espermatozóides,  
237 quando se utilizou o diluidor CEP-2 - composição bioquímica sintética do plasma da  
238 cauda do epidídimo bovino (Verberckmoes et al., 2005).

239 A integridade da membrana plasmática (IMP) avaliada pelas sondas IP  
240 iodeto de propídeo) e CFDA (diacetato de carboxifluoresceína), não apresentou  
241 diferenças significativas entre os três diluidores estudados. Ao se tratar de IMP dos  
242 espermatozóides, esta é essencial para uma avaliação precisa do funcionamento celular  
243 (Garner et al., 1986). Os resultados observados em relação à motilidade e a preservação  
244 da integridade das membranas indicam que ocorrem interações entre o diluidor e o  
245 tempo de equilíbrio que resultam numa maior sobrevivência espermática (Leite, 2008).

246 Dados semelhantes foram observados quando não houve diferença em  
247 estudo realizado usando a combinação das sondas fluorescentes Diacetato de  
248 Carboxifluoresceína e Iodeto de Propídeo para avaliar a IMP pós-descongelação quando  
249 comparados os meios diluentes Botu-Bov<sup>®</sup> e TRIS-gema de ovo-frutose (Crespilho et  
250 al., 2006), entretanto, houve superioridade estatística de meios diluentes à base de gema  
251 de ovo quando comparado com diluente à base de lecitina de soja (Thun et al., 2002).  
252 Na espécie bubalina, usando os meios glicina-gema, Triladyl e TES, a integridade das  
253 membranas espermáticas não apresentou diferenças entre os três diluidores, nos tempos

254 de equilíbrio de 2 horas ou 4 horas com as sondas: Iodeto de Propídio (IP) e Diacetato  
255 de Carboxifluoresceína (CFDA) (Chacur, 1996; Chacur et al., 1997).

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

262

### 263 CONCLUSÃO

264 Os diluentes Botu-Bov<sup>®</sup> e Botu-Bov Egg Free<sup>®</sup> apresentaram  
265 superioridade na maioria dos parâmetros avaliados pelo CASA, principalmente em  
266 touros de regular congelabilidade, constituindo duas novas opções viáveis de meios  
267 diluentes para a congelação de sêmen em touros considerados como de regular  
268 congelabilidade, os quais passam a ser significativos em relação aos touros classificados  
269 como de alta congelabilidade do sêmen, proporcionando o uso do material genético  
270 desses animais para fins de reprodução.

271

272

### 273 AGRADECIMENTOS

274 A Tairana, Central de Inseminação Artificial.

275

### 276 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

277 BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic  
278 animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J. Androl.*, v.21, n.1, p.1-7, 2000.

279 CELEGHINI, E.C.C. *Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas*  
280 *plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides*  
281 *utilizando sondas fluorescentes*. 2005. 186f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária  
282 - Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade  
283 de São Paulo, São Paulo.

284 CHACUR, M.G.M. *Avaliação da congelação de sêmen bubalino com os diluidores*  
*Glicina-Gema, Tryladil<sup>®</sup> e TES em diferentes tempos de equilíbrio*. 1996, 105f.

- 285 Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e  
286 Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- 287 CHACUR, M. G. M.; OBA, E.; GONZALES, C. I. M. Equilibrium time influence on  
288 motility, vigor and membrana integrity of thawed buffalo semen using Triladyl, glycine-  
289 egg-yolk and TES extenders. In: WORLD BUFFALO CONGRESS. 5., 1997. Caserta.  
290 *Anais ...* Caserta, Italy, 1997. p.846-849.
- 291 CRESPILO, A.M.; PAPA, F.O.; ALBERTI, K. et al. Eficiência comparativa entre  
292 dois diluidores para a congelação de sêmen bovino sobre os padrões de motilidade e  
293 integridade de membrana plasmática. *ARS Veterinária.*, v.22, n.3, p.229-235, 2006.
- 294 CRESPILO, A.M. *Efeito do meio diluidor e da dose inseminante sobre a*  
295 *congelabilidade e fertilidade do sêmen bovino utilizado em programas de inseminação*  
296 *artificial em tempo-fixo (IATF)*. Botucatu, 2007. 123f. Dissertação (Mestrado em  
297 Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade  
298 Estadual Paulista, Botucatu.
- 299 DELL’AQUA JR, J.A. *Efeito da centrifugação, tipos de envase e temperatura de*  
300 *descongelação sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade relacionados*  
301 *com o local de deposição e concentração da dose inseminante do sêmen congelado*  
302 *equino*. Botucatu, 2000. 113f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) –  
303 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista,  
304 Botucatu.
- 305 FARRELL, P.B., FOOTE, R.H., Mc ARDLE, M.M. et al. Media and dilution  
306 procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for  
307 computer-assisted sperm analysis (CASA). *J. Androl.*, v.17, p.293-300, 1996.
- 308 FOOTE, R.H.; GRAY, L.C.; YOUNG, D.C. et al. Fertility of bull semen stored up to  
309 four days at 5° in 20% egg yolk extenders. *J. Dairy Sci.*, v.43, p.1330, 1960.
- 310 GARNER, D.L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L.A. et al. Assessment of spermatozoal  
311 function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol. Reprod.*,  
312 v.34, p.127-138, 1986.
- 313 GRAHAM, J.K. Response of spermatozoa to freezing. In: Techniques for handling and  
314 utilization of transported cooled and frozen equine spermatozoa. 1995. *Proceedings...*  
315 *Equine Sciences*. Colorado State University - Fort Collins, Colorado. USA. 1995. p.83-  
316 95.

- 317 HARRISON, R.A.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane  
318 integrity in mammalian spermatozoa. *J. Repr. Fert.*, v.88, p.343-352, 1990.
- 319 HIRAI, M., CERBITO, W.A.; WIJAYAGUNAWARDANE, et al. The effect of  
320 viscosity of semen diluents on motility of bull spermatozoa. *Theriogenology*, v.47,  
321 p.1463-1478, 1997.
- 322 HOFLACK, G., OPSOMER, G., RIJSSELAERE, T. et al. Comparison of computer-  
323 assisted sperm motility analysis parameters in semen from Belgian Blue and Holstein-  
324 Friesian bulls. *Reprod. Dom. Anim.*, v.42, p.153-161, 2007.
- 325 LEITE, T.G. *Tempo de equilíbrio na criopreservação do sêmen: Efeitos sobre*  
326 *características de motilidade e de integridade das membranas espermáticas de touros*  
327 *Gir leiteiro*. Belo Horizonte, 2008. 121f. Dissertação (Mestrado em Medicina  
328 Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo  
329 Horizonte.
- 330 MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BEGERON, A. et al. Major proteins of bovine seminal  
331 plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol. Reprod.*, v.  
332 67, p.1250-1258, 2002.
- 333 PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; CARVALHO, I.M. et al. Coloração espermática  
334 segundo Karras modificada pelo emprego do Barbatimão (*Stryphnodendrum*  
335 *barbatiman*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.40, p.115-123, 1988.
- 336 RASUL, Z.; AHMAD, N.; ANZAR, M. Changes in motion characteristics, plasma  
337 membrane integrity, and acrosome, morphology during cryopreservation of buffalo  
338 spermatozoa. *J. Androl.*, v.22, n.2, p.278-283, 2001.
- 339 SALVADOR, D.F.; ANDRADE, V.J.; VALE FILHO, V.R. et al. Associação entre o  
340 perfil andrológico e a congelação de sêmen de touros da raça Nelore aos dois anos de  
341 idade, pré-selecionados pela classificação andrológica por pontos (CAP). *Arq. Bras.*  
342 *Med. Vet. Zootec.*, v.60, n.3, p.587-593, 2008.
- 343 SANTOS, G.C.J. *Viabilidade de sêmen equino congelado em meios diluidores de*  
344 *diferentes composições*. Belo Horizonte. 2003. 58f. Dissertação (Mestrado em Medicina  
345 Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 346 SCHENK, J.L.; AMANN, R.P.; ALLEN, C.H. Effects of extender and insemination  
347 dose on postthaw quality and fertility of bovine sperm. *J. Dairy Sci.* v.70, p.1458-1464,  
348 1987.

- 349 SEVERO, N.C.; Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade.  
 350 *Hora. Vet.*, n.167, p.36-39, 2009.
- 351 THOMAS, C.A.; GARNER, D.L.; DEJARNETTE, J.M. et al. Effect of  
 352 cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by  
 353 flow cytometry. *Biol. Reprod.*, v.58, p.786-793, 1998.
- 354 THUN, R.; HURTADO, M.; JANET, F. Comparison of Biociphos-Plus® and Tris-egg  
 355 yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*, v.57, n.3, p.1087-  
 356 1094, 2002.
- 357 VERBERCKMOES, S.; SOOM, A.V.; DEWULF, J. et al. Comparison of three diluents  
 358 for the storage of fresh bovine semen. *Theriogenology*, v.63, n.3, p.912-922, 2005.
- 359 VERSTEGEN, J.; OUADA, M.I.; OCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in  
 360 andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, n.1, p.149-179, 2002.
- 361 WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod.*  
 362 *Sci.*, v.60. p.481-492, 2000.

363  
 364  
 365

Tabela 1 - Médias dos parâmetros espermáticos pré-congelação de touros classificados de acordo com sua congelabilidade (alta e regular) pertencentes a central de inseminação artificial.

	Motilidade (%)		Volume (mL)		Vigor (0-5)	
	REGULAR	ALTA	REGULAR	ALTA	REGULAR	ALTA
	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)	

366

NS – não significativo.

367

368

369

Tabela 2 - Médias dos parâmetros espermáticos pré-congelação de touros classificados de acordo com sua congelabilidade (alta e regular) pertencentes a central de inseminação artificial.

	Morfologia espermática (%)					
	Concentração ( $\times 10^6$ /mL)		Defeitos Maiores		Defeitos Menores	
	REGULAR	ALTA	REGULAR	ALTA	REGULAR	ALTA
	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)	

370

NS – não significativo.

371 Tabela 3 - Médias e desvios-padrões dos parâmetros espermáticos pós-descongelamento de touros  
 372 classificados de acordo com o grau de congelabilidade

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

373 MT (motilidade total, µm/s), MP (motilidade progressiva, µm/s), VAP (velocidade de trajeto, µm/s), VSL  
 374 (velocidade linear, µm/s), VCL (velocidade curvilinear, µm/s), ALH (deslocamento lateral da cabeça,  
 375 µm), BCF (frequência de batimento de cauda, Hz), STR (retilinearidade, %), LIN (linearidade, %), RAP  
 376 (porcentagem de sptz rápidos), IMP (integridade da membrana plasmática, %).  
 377 (\*) - letras diferentes nas linhas diferem entre si (p<0,05).

*ANEXOS*

## ANEXO A

### INSTRUÇÕES AOS AUTORES

#### **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**

(*Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences*)

#### **Política Editorial**

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science)*, ISSN 0102-0935

(impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de trabalhos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal e áreas afins.

Os trabalhos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os trabalhos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva à Revista.

**Reprodução de artigos publicados:** A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão dos trabalhos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <[www.abmvz.org.br](http://www.abmvz.org.br)>.

#### **Tipos de artigos aceitos para publicação**

**Artigo científico.** É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa. Seções do texto: Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Conclusões. O número total de páginas não deve exceder a 15.

**Relato de caso.** Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Seções do texto: Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes). O número total de páginas não deve exceder a 10.

**Comunicação.** É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico. Levantamentos de dados (ocorrência, diagnósticos, etc.) também se enquadram aqui. Deve ser compacto, com no máximo seis páginas impressas, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo científico", embora seguindo aquela ordem. Quando a comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".

#### **Preparação dos manuscritos para publicação**

Os trabalhos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras.

Os trabalhos submetidos em inglês deverão conter resumo em português e vice-versa.

Os trabalhos e ilustrações deverão ser apresentados em Microsoft Word, folha no formato A4, fonte Times New Roman tamanho 12, espaço entre linhas 1,5, margens de 3 cm, com páginas e linhas numeradas (numeração contínua).

#### **Seções de um trabalho**

**Título.** Em português e em inglês. Deve ser o resumo do resumo e não ultrapassar 100 dígitos.

**Autores.** Os nomes dos autores virão abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. Deve estar indicado o autor para correspondência com endereço completo, telefone, fax e e-mail.

**Resumo e Abstract.** Devem conter no máximo 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título. Cada frase é uma informação. Atenção especial às conclusões.

**Palavras-chave e Keywords.** No máximo cinco.

**Introdução.** Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência, relevância e os objetivos do trabalho.

**Material e Métodos.** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos. Nos trabalhos que envolvam animais ou organismos geneticamente modificados deverá constar o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança.

**Resultados.** Apresentar clara e objetivamente os principais resultados encontrados.

**Discussão.** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho.

Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto.

**Conclusões.** As conclusões devem estar apoiadas nos dados da pesquisa executada.

**Ilustrações.** São tabelas e figuras. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data) e a correspondente referência deve figurar na lista bibliográfica final.

**Tabela.** Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação do cabeçalho e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas.

**Figura.** Qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. As legendas recebem inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As figuras devem ser enviadas em arquivo separado, extensão.jpg.

**Agradecimentos.** Devem ser concisamente expressados.

**Referências bibliográficas.** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética.

#### **Citações bibliográficas**

Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na seqüência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979)
- mais de um trabalho citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para trabalhos do mesmo ano.

*Citação de citação.* Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Na listagem de referência, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

*Comunicação pessoal.* Não fazem parte da lista de referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

#### **Referências bibliográficas**

São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, simplificadas conforme exemplos:

##### **Periódicos**

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

**Publicação avulsa**

DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA

VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

**Documentos eletrônicos**

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em:

<<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. *Miami Herald*, 1994.

Disponível em:

<[http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-Related Articles/](http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-Related%20Articles/)>. Acessado em: 5 dez. 1994.

**Taxas de publicação**

**Taxa de submissão.** A taxa de submissão de R\$30,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente trabalhos com taxa paga de submissão serão avaliados.

**Taxa de publicação.** A taxa de publicação de R\$55,00, por página impressa, será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. Se houver necessidade de impressão em cores, as despesas correrão por conta dos autores. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

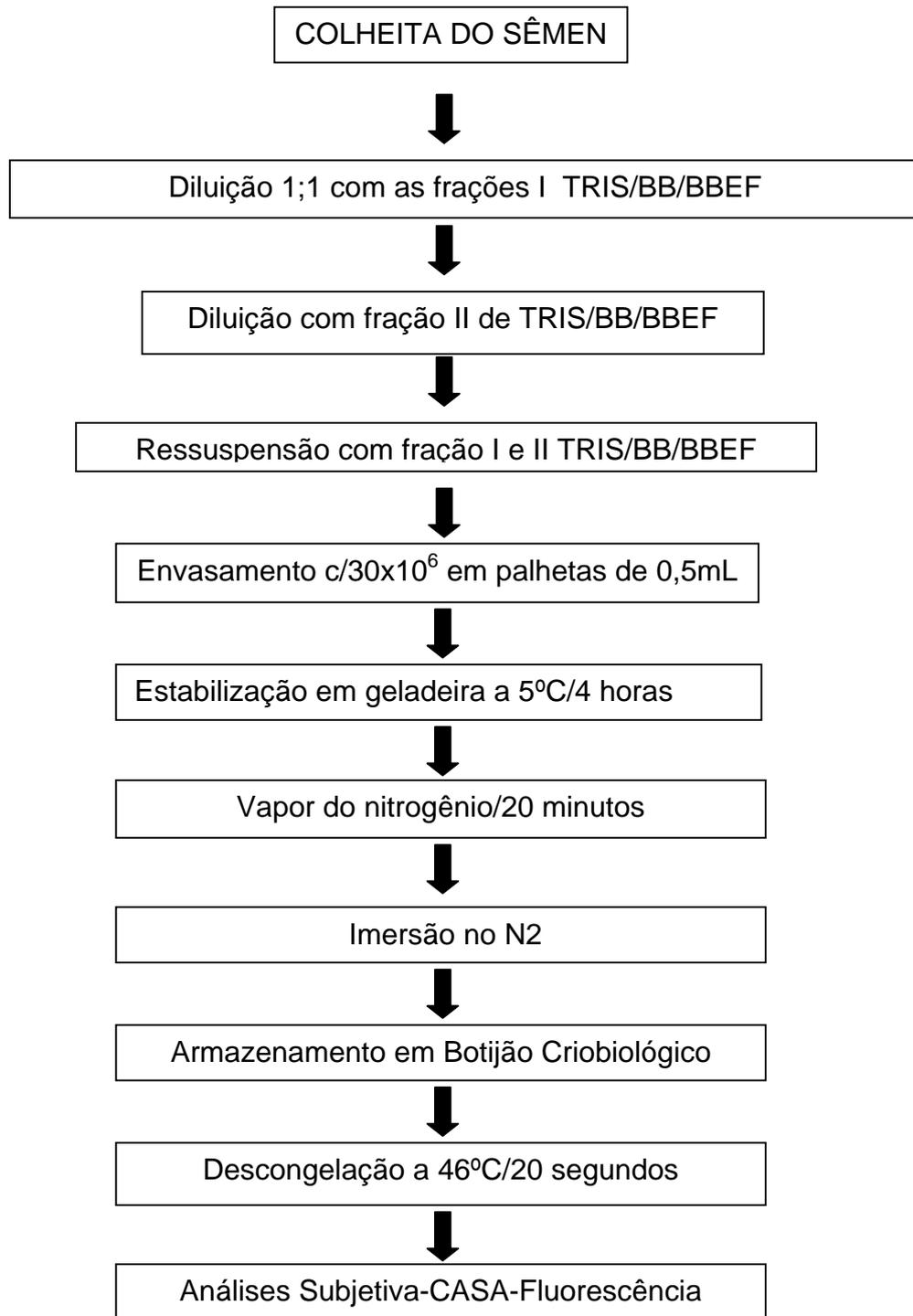
**ANEXO B**

Figura 1. Delineamento laboratorial do experimento.

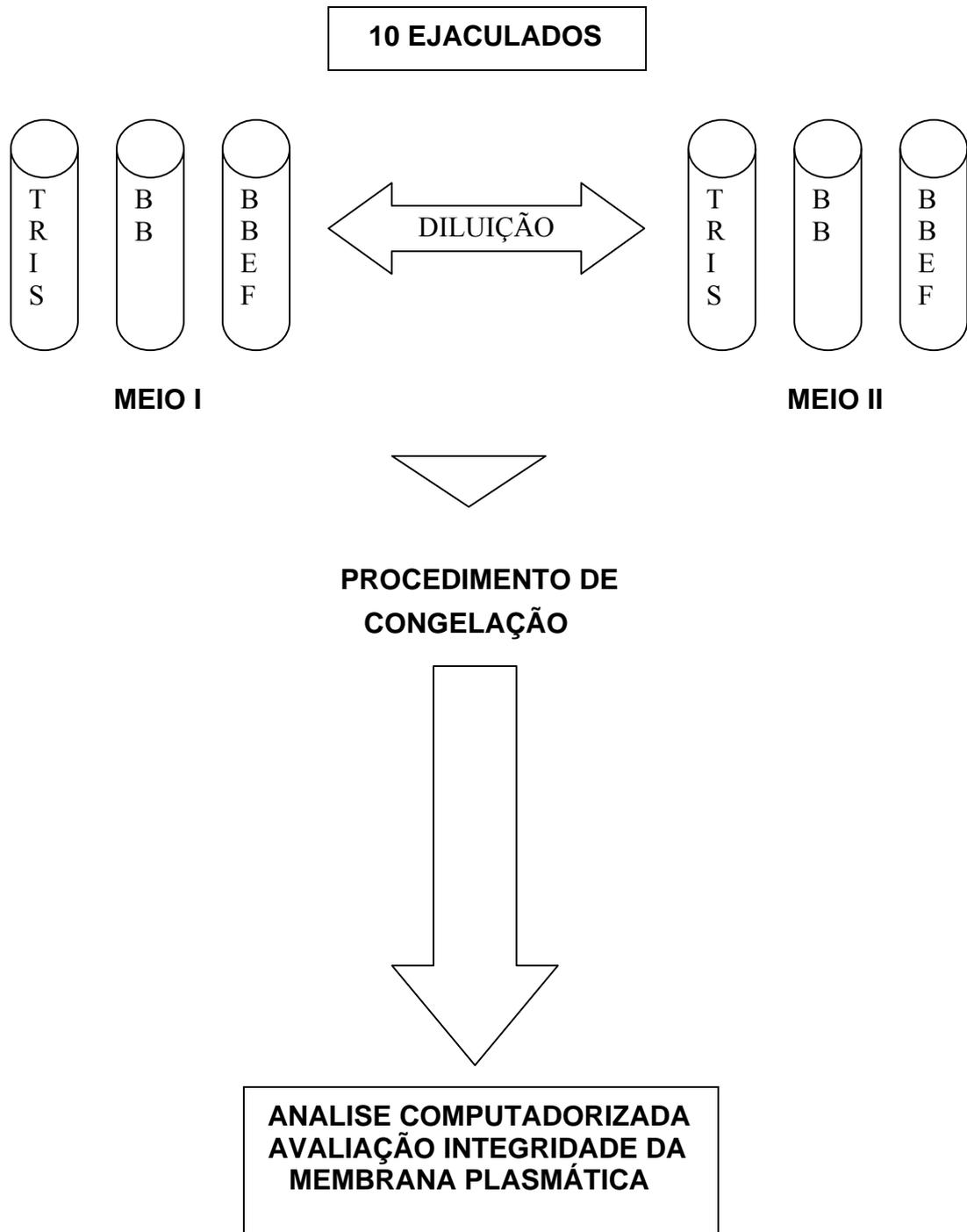


Figura 2: Esquema simplificado dos procedimentos experimentais realizados no Experimento.

Quadro 1. Soluções estoque e de trabalho segundo técnica descrita por Harrison e Vickers (1990).

SOLUÇÕES	CONSTITUINTES	QUANT
Estoque IP	Iodeto de Propídeo	10 mg
	Solução Fisiológica	20 mL
Estoque CFDA	Diacetato de 6-Carboxifluoresceína	9,2 mg
	Dimetilsulfóxido	20 mL
Estoque de Formaldeído	Formalina 40%	1 mL
	Solução Fisiológica	79 mL
Estoque de Citrato de Sódio	Citrato de Sódio	3 g
	Solução Fisiológica	100 mL

Quadro 2. Solução de Trabalho.

SOLUÇÕES	QUANTIDADE
Solução de Citrato de Sódio 3%	0,96 mL
Solução de Formaldeído	10 $\mu$ L
Solução de Iodeto de Propídeo	10 $\mu$ L
Solução de Carboxifluoresceína	20 $\mu$ L

Quadro 3. Amostras para Avaliação.

SOLUÇÕES	QUANTIDADE
Sêmen	10 $\mu$ L
Solução de trabalho	40 $\mu$ L

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)