

# EFICIÊNCIA COMPARATIVA ENTRE DOIS DILUIDORES PARA A CONGELAÇÃO DE SÊMEN BOVINO SOBRE OS PADRÕES DE MOTILIDADE E INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA

(COMPARATIVE EFFICIENCY OF TWO FREEZING EXTENDERS FOR BOVINE SEMEN BASED ON SPERM MOTILITY AND MEMBRANE INTEGRITY)

(EFICIENCIA COMPARATIVA DE DOS DILUYENTES PARA CONGELACIÓN DE SEMEN BOVINO SOBRE LOS PATRONES DE MOTILIDAD Y LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA)

A. M. CRESPILO\*<sup>1</sup>, F. O. PAPA<sup>2</sup>, K. ALBERTI<sup>3</sup>, E. R. SIQUEIRA FILHO<sup>3</sup>,  
A. MARTINS Jr<sup>4</sup>., J. L. C. NOVAES<sup>5</sup>, J. A. DELL'AQUA<sup>3</sup>

## RESUMO

A qualidade das amostras seminais tem papel importante na determinação dos índices de fertilidade dos programas de inseminação artificial. Nesse sentido, o objetivo do estudo foi comparar a efetividade de 2 diluidores de criopreservação de sêmen bovino em relação aos padrões de motilidade pós-descongelção avaliada pelo método computadorizado (CASA), integridade de membrana plasmática (IMP) e viabilidade ao teste de termorresistência rápido (TTR) proporcionada por cada uma das metodologias de congelção. Para o estudo foram utilizados 10 touros da raça Nelore, obtendo-se dois ejaculados de cada animal. Os ejaculados foram fracionados em duas alíquotas, submetidas à criopreservação com os diluidores Botu-Bov® (grupo desafio) e Tris-gema de ovo-frutose (grupo controle). Os dados foram analisados pelo programa Grafpad InStat 5.0, comparando-se as médias obtidas por meio do “teste T” de Student e “teste T” com variâncias diferentes ( $p < 0,05$ ). Dentre as variáveis de movimento geradas pela técnica CASA, foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para motilidade progressiva (MP), amplitude lateral de cabeça espermática (ALH), freqüência de batimentos (BCF), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN) entre os dois grupos estudados. Não foi observada influência do meio diluidor quanto a IMP e resistência ao TTR. Os dados gerados permitem concluir que os espermatozoides criopreservados com o diluidor Botu-Bov® apresentaram maior linearidade de movimento em relação ao grupo controle, indicando uma maior viabilidade espermática pós-descongelção.

**PALAVRAS-CHAVE:** Sêmen bovino. Congelção. Meio diluidor. Motilidade espermática.

## ABSTRACT

The quality of the seminal samples has an important role in the determination of the indexes of fertility in artificial insemination programs. In that sense, the aim of the study was to compare the efficacy of 2 extenders for cryopreservation of bull semen in relation to the motility patterns post-thaw evaluated by computer-assisted sperm analysis (CASA), the integrity of plasmatic membrane (IMP) and viability to the fast term-resistance test (TTR) proportionate for each one of the

<sup>1</sup> Autor para correspondência: Médico Veterinário, Doutorando do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. Distrito de Rubião Junior, s/n, CEP:18610-000. e-mail: andremacc@yahoo.com.br.

<sup>2</sup> Médico Veterinário, Prof. Titular Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ - Unesp, Botucatu / SP.

<sup>3</sup> Médico Veterinário. Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal, FMVZ - Unesp, Botucatu / SP.

<sup>4</sup> Médico Veterinário. Prof. Adjunto do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, FOA - Unesp, Araçatuba / SP.

<sup>5</sup> Biólogo, Programa de Pós-Graduação do Departamento de Morfologia, IB - Unesp, Botucatu / SP.

freezing methodology. For the study 10 bulls of the Nelore breed were used, obtaining two ejaculated of each animal. Ejaculates were then split in two batches, submitted to cryopreservation with the extenders Botu-Bov® (Challenge group) and Tris-egg yolk-fructose (Control group). The data were analyzed by the software Grafpad Instat 5.0, comparing the averages obtained through the “test T” of Student and “test T” with different variances ( $p < 0,05$ ). Among the motional variables generated by the CASA technique, significant differences were observed ( $p < 0,05$ ) for progressive motility (MP), amplitude of lateral head displacement (ALH), beat-cross frequency (BCF), straightness (STR) and linearity (LIN) among the two groups. Influence of the extenders was not observed concerning IMP and resistance to TTR. In conclusion, the present study indicates that the spermatozoa freezing with the Botu-Bov® extender presented greater linearity in relation to the control group, indicating a higher post-thaw viability.

**KEY WORDS:** Bovine semen. Freezing. Extender. Sperm motility.

## RESÚMEN

La calidad de las muestras seminales cumple un papel importante en la determinación de los índices de fertilidad en los programas de inseminación artificial. El objetivo de este estudio fue comparar la efectividad de dos diluyentes de criopreservación para semen bovino con relación a los patrones de motilidad post descongelación, evaluada por el método computadorizado (CASA), y examinar la integridad de la membrana plasmática (IMP) y viabilidad al teste de termorresistencia rápido (TTR) proporcionada por cada una de las metodologías de congelación. Para el estudio fueron utilizados diez toros de la raza Nelore, obteniéndose dos eyaculados de cada animal. Los eyaculados fueron fraccionados en dos muestras sometidas a la criopreservación con los diluyentes Botu-Bov® (Grupo desafío) y TRIS-yema-fructosas (Grupo control). Los datos fueron analizados por el programa Grafpad Instat 5.0, comparando las medianas obtenidas por el teste “T de Student” y el teste “T” con variancias distintas ( $p < 0,05$ ). Entre las variables de movimiento generadas por la técnica de CASA, fueron observadas diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para la motilidad progresiva (MP), amplitud lateral de cabeza (ALH), frecuencia de batimientos (BCF), rectilinealidad (STR) y linealidad (LIN) entre los dos grupos estudiados. Los datos generados permiten concluir que los espermatozoides criopreservados con el diluyente Botu-Bov® presentaron mayor linealidad en relación al grupo control, indicando una mayor viabilidad espermática post descongelación.

**PALABRAS-CLAVE:** Semen bovino. Congelación. Diluyente. Motilidad espermática.

## INTRODUÇÃO

Segundo revisões de Foote e Kaproth (2002), quando o sêmen bovino congelado foi testado pela primeira vez comercialmente vários fatores foram considerados, como os meios diluidores a serem utilizados, a taxa de resfriamento e a concentração de crioprotetores. O principal propósito da criopreservação do sêmen é a manutenção da capacidade fertilizante dos espermatozoides, enquanto a diluição dos ejaculados proporciona a maximização do uso de touros geneticamente superiores (KOMMISRUD et al., 1996).

No entanto, apesar de a inseminação artificial utilizar sêmen bovino criopreservado e representar o tipo de manejo reprodutivo mais difundido na produção pecuária mundial (CURTIS et al., 1998, MEDEIROS et al., 2002), poucos avanços tecnológicos têm sido observados nas últimas décadas em relação à melhora dos índices de congelabilidade dos ejaculados (CHEN et al., 1993, HOLT, 2000). Até o presente, admite-se uma perda significativa do potencial fertilizante das amostras congeladas com a maioria das técnicas vigentes (COOTER et al., 2005, MEDEIROS et al., 2002, NAGY et al., 2004, THUN et al., 2002, WATSON, 2000). Embora a criopreservação de

sêmen tenha-se tornado uma rotina na indústria bovina da inseminação artificial, alcançando resultados satisfatórios em termos de fertilidade (CHEN et al., 1993), a maioria dos protocolos utilizados atualmente encontram-se empíricos, observando-se um número considerável de espermatozoides que falham em sobreviver ao processamento (NAGY et al., 2004).

O sêmen bovino criopreservado geralmente fornece menores taxas de fertilidade em relação ao sêmen fresco. Quando comparações são realizadas baseando-se em um número similar de espermatozoides móveis (assumindo viabilidade), os resultados de fertilidade do sêmen congelado são inferiores aos obtidos com sêmen fresco (WATSON, 2000). Os principais fatores envolvidos nessa queda de fertilidade são as mudanças de temperatura durante o processo biotecnológico, o estresse osmótico e tóxico representado pela exposição aos crioprotetores e a formação e dissolução de cristais de gelo extracelulares (RASUL et al., 2001, WATSON, 2000). A criopreservação é estressante para os espermatozoides, afetando a integridade das membranas espermáticas, incluindo a plasmática, acrossomal e membrana mitocondrial (JANUSKAUSKAS et al., 2003). Segundo Papa et al. (2000), a integridade de membrana é um pré-requisito para

que ocorram os eventos relacionados ao processo de fertilização, que incluem a capacitação espermática, a penetração através dos revestimentos do ovócito, ligação à zona pelúcida, reação acrossomal e fusão dos gametas.

A gema de ovo em combinação com o tampão Tris (tris-hidroximetilaminometano) e citrato de sódio correspondem aos constituintes mais comuns presentes nos diluidores de congelamento de sêmen bovino (VISHWANATH e SHANNON, 2000), sendo o Tris-gema de ovo o meio de criopreservação mais utilizado no mundo, segundo revisões de Tardif et al. (1997). No entanto, apesar dos encorajadores resultados comerciais e científicos, comumente são observadas quedas de motilidade ao redor de 50% pós-descongelamento para o sêmen bovino criopreservado com o diluidor Tris-gema em relação ao sêmen fresco não diluído (BILODEAU et al., 2002), resultados que justificam a busca por inovações biotecnológicas relacionadas ao processamento do sêmen de touros.

Com base nos resultados alcançados por Alberti et al. (2004), que demonstraram uma maior resistência espermática ao teste de termorresistência rápido (TTR) proporcionada por novos meios de criopreservação, o objetivo do presente estudo é comparar a efetividade de dois diferentes diluidores de congelamento de sêmen bovino em relação aos padrões de motilidade pós-descongelamento avaliada pelo método computadorizado (CASA), comparando a integridade de membrana plasmática (IMP) e resistência ao TTR proporcionada por cada uma das metodologias de criopreservação, testando-se, dessa forma a hipótese da influência do meio diluidor sobre a viabilidade do sêmen bovino congelado.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados dois diluidores de congelamento no experimento: o meio Tris-gema de ovo-frutose (TRIS) e o diluidor comercial Botu-Bov® (Biotech Ltda, Botucatu/SP), representando uma inovação nacional na congelamento do sêmen bovino. Para o preparo de 1000 mL do meio TRIS, foram utilizados 30,28 g do tampão Tris (tris-hidroximetilaminometano), 17,30 g de ácido cítrico monohidratado, 12,50 g de frutose e 0,25 g de sulfato de amíacina, ressuspendidos em 1000 mL de água destilada e deionizada. A partir da solução confeccionada (solução mãe), foram retirados 736 mL, adicionando-se 200 mL de gema de ovo (20%) e 64 mL de glicerol, resultando em 1000 mL do meio diluidor de congelamento na concentração final de 6,4% de crioprotetor.

Para o estudo, foram utilizados 10 touros da raça Nelore (idade entre 20-24 meses) pertencentes à fazenda Barreiro Rico (Anhembi/SP), manejados exclusivamente em sistema de pastejo rotacionado em capim Tanzânia. Foram obtidos dois ejaculados de cada

animal (intervalo de 3 dias), por meio de eletroejaculação (Eletrojet®), utilizando-se o material da primeira coleta para a triagem inicial dos animais e o segundo ejaculado para as avaliações das metodologias de congelamento em teste. Apenas os animais que apresentaram motilidade espermática superior a 50% à primeira coleta e defeitos espermáticos totais inferiores a 25% foram utilizados no estudo.

Após avaliação subjetiva imediata da motilidade e concentração espermática em microscopia óptica convencional, os ejaculados foram igualmente fracionados em duas alíquotas e diluídos, respectivamente, em meio TRIS (Grupo controle) e no diluidor Botu-Bov® (Grupo BB: desafio). A concentração espermática final, determinada sob microscopia óptica convencional em câmara hematocitométrica de Neubauer, foi fixada em  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL para os dois grupos, sendo ambos diluidores em teste utilizados como fração única, já apresentando o crioprotetor glicerol (6,4%) no ato da diluição.

As amostras foram envasadas em palhetas francesas de 0,5 mL (IMV® Technologies) e acomodadas em raques horizontais para realização da curva de resfriamento em geladeira digital (Minitube®) à temperatura constante de 5°C por 3 horas. Imediatamente após o resfriamento, foi iniciada a curva de estabilização em vapor de nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>) mediante o acondicionamento das amostras em caixa de isopor convencional de 35L a uma distância fixa de 5 cm acima do nível do N<sub>2</sub> por 20 minutos. Decorrido o período de estabilização, procedeu-se à congelamento das amostras por imersão direta no N<sub>2</sub> e posterior armazenamento do sêmen em botijão criobiológico. Para padronização das análises, foi instituído um período mínimo de 3 dias de estocagem para o início das avaliações laboratoriais.

As palhetas processadas foram descongeladas em banho-maria a 46°C por 20 segundos (DELL' AQUA Jr, 2001) e submetidas à análise computadorizada do movimento espermático (CASA) no aparelho Hamilton Thorn Research® Ivos-12/EUA. Para cada amostra seminal foram observados 5 campos aleatórios, avaliando-se um número mínimo de 100 células por campo. Os parâmetros de movimento espermático gerados pela técnica CASA e avaliados no presente estudo, correspondem, segundo Arruda et al. (2004) e Farrell et al. (1998): Motilidade Total (MT, %), representada pela soma de todas as células móveis; Motilidade Progressiva (MP, %) é a porcentagem de células movendo-se progressivamente; Velocidade de Trajeto (VAP, µm/s) é a velocidade média ininterrupta do trajeto da célula; Velocidade Progressiva (VSL, µm/s) corresponde a velocidade média percorrida em linha reta entre os pontos inicial e final do trajeto; Velocidade Curvilinear (VCL, µm/s), que é a velocidade média mensurada de ponto a ponto do trajeto percorrido pela célula; Amplitude do Deslocamento Lateral de Cabeça

(ALH,  $\mu\text{m}$ ) é a largura média da oscilação da cabeça espermática ao longo do movimento; Frequência de Batimentos (BCF, Hz) é a frequência com que a cabeça do espermatozóide move-se para trás e para frente durante um trajeto percorrido; Retilinearidade (STR, %) é o valor médio da proporção entre VSL/VAP x 100; Linearidade (LIN, %) é o valor médio da proporção entre VSL/VCL x 100; e Velocidade Rápida (VR, %). A técnica CASA, além de proporcionar valiosas informações a respeito da cinética dos espermatozóides, indiretamente reflete a viabilidade da membrana plasmática e atividade metabólica das células (GIL et al., 2000).

Todas as amostras foram submetidas ao teste de termorresistência rápido (TTR, %) em “banho-maria” a 46°C/30 minutos (BARNABÉ et al., 1980), analisando-se, também pela técnica computadorizada, a motilidade espermática total ao final das avaliações.

Para a determinação da integridade de membrana plasmática (IMP, %), foi utilizada a combinação das sondas fluorescentes Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídeo (PI), segundo Harrison e Vickers (1990), adaptado por Viana (2004). Para tanto, retirou-se uma alíquota de 20 $\mu\text{L}$  de sêmen de cada amostra avaliada, procedendo-se à pronta diluição em 40 $\mu\text{L}$  de solução de citrato de sódio 2,94% previamente aquecida a 37°C. À solução originada foram adicionados 20 $\mu\text{L}$  de solução de trabalho fluorescente, composta por 1,0 mL de citrato de sódio 2,94%, 20  $\mu\text{L}$  de formol salino tamponado, 60  $\mu\text{L}$  de PI e 20  $\mu\text{L}$  de CFDA. As amostras coradas foram avaliadas sob lâmina e lamínula em aumento de 400x por microscopia de epifluorescência (LEIKA®), permitindo a diferenciação das células portadoras de membrana plasmática íntegra (coloração verde devida à marcação pela carboxifluoresceína) ou lesada (exibindo coloração vermelha caracterizando a marcação pelo iodeto de propídeo, sonda exclusivamente permeável às células portadoras de membrana plasmática desestruturada). Para cada amostra avaliada, foram contadas 100 células espermáticas.

Para as análises estatísticas, foi utilizado o software Graphpad Instat® 5.0. As médias obtidas para cada variável estudada foram comparadas entre os dois grupos pelo “teste T” de Student e “teste T” com variâncias diferentes, considerando-se nível de significância  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados para cada uma das variáveis do movimento espermático, motilidade total pós-teste de termorresistência rápido e integridade de membrana plasmática de acordo com o meio diluidor de congelamento utilizado encontram-se sumarizados na Tabela 1. De maneira geral, ambos diluidores em teste mostraram-se eficientes para o processamento do sêmen bovino

quando apenas a motilidade total pós-descongelamento foi comparada (BB= 71,8  $\pm$  9,7; TRIS= 67,4  $\pm$  10,5), não sendo observada diferença significativa entre os dois grupos ( $p = 0,3424$ ).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 1, não foram encontradas diferenças significativas para os valores médios de VAP (83,7  $\pm$  16 vs 86,1  $\pm$  6,0;  $p = 0,9457$ ), VSL (79,5  $\pm$  14,4 vs 69,1  $\pm$  4,6;  $p = 0,1686$ ), VCL (121,5  $\pm$  27 vs 139,7  $\pm$  13,1;  $p = 0,0715$ ) e RAP (67,0  $\pm$  8,5 vs 64,0  $\pm$  8,4;  $p = 0,4377$ ), respectivamente para os espermatozóides criopreservados com o diluidor Botu-Bov® e Tris-gema de ovo. No entanto, os valores de motilidade progressiva, amplitude lateral de cabeça, frequência de batimentos, retilinearidade e linearidade gerados pela técnica CASA apresentaram-se significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre os grupos (Tabela 1). Os valores aumentados para BCF, STR e LIN apresentados pelo grupo desafio indicam que os espermatozóides criopreservados com o diluidor Botu-Bov® movem-se de uma forma mais linear em relação ao grupo controle. Conclusões similares foram apresentadas por Verberckmoes et al. (2005), que compararam a eficiência de 3 meios para manutenção de sêmen bovino a fresco, indicando que os valores aumentados de VSL, BCF, STR e LIN proporcionados pelo diluidor CEP-2 (composição bioquímica sintética do plasma da cauda do epidídimo bovino) estariam relacionados a um maior vigor e retilinearidade dos espermatozóides.

Os valores significativamente superiores para a amplitude lateral de cabeça apresentada pelos espermatozóides criopreservados com o diluidor TRIS (ALH = 5,9  $\pm$  0,5  $\mu\text{m}$ ) em relação ao grupo desafio permitem a especulação de um maior grau de hiperativação espermática sofrida pelas células do grupo controle. Segundo Verstegen et al. (2002), os índices de VCL, LIN e ALH gerados pela técnica CASA correspondem às características de movimento frequentemente utilizadas para definir o estado de hiperativação espermática de uma amostra seminal. A despeito da importância fisiológica do processo de hiperativação, relacionando-se ao transporte de gametas e a penetração do oócito (HAFEZ e HAFEZ, 2004) esse padrão de movimento, baseando-se nas afirmações de Centola et al. (1998) e Hallap et al. (2004) pode estar relacionado ao início do processo de capacitação dos espermatozóides, podendo representar o indicativo de um maior grau de crioinjúria para as amostras congeladas com o diluidor TRIS, e, portanto, prejuízos ao processo de fertilização.

Segundo Verstegen et al. (2002), são observadas diferenças significativas no padrão de movimento desempenhado por espermatozóides que alcançam altas ou baixas taxas de fertilização. Apesar da grande controvérsia existente a respeito da correlação dos padrões de movimento espermático com os índices de fertilidade *in vivo*, algumas variáveis geradas pela técnica CASA, como a linearidade espermática, parecem apresentar

uma maior correlação com fertilidade, segundo Rodriguez-Martinez (2000). Farrell et al. (1998), agrupando vários padrões de movimento obtidos pela técnica CASA, demonstraram uma maior correlação com fertilidade *in vivo* em relação à utilização de apenas um atributo de movimento. No mesmo trabalho, a associação dos valores de MP, ALH, BCF e VCL representaram uma das combinações de maior impacto no modelo estatístico utilizado ( $r^2 = 0,87$ ), demonstrando a expressividade de tais atributos em termos de predição de fertilidade do sêmen bovino. Diante dos resultados obtidos no grupo desafio, indicando maior índice de espermatozoides exibindo movimento progressivo, maior retilinearidade, linearidade e frequência de batimentos, aliados a uma menor amplitude de movimentos de cabeça em relação ao Tris-gema de ovo-frutose, pode-se concluir que o diluidor comercial Botu-Bov® foi superior em termos de congelabilidade do sêmen bovino, fornecendo claros indicativos da possível interação meio diluidor/fertilidade.

Resposta similar de resistência pós-TTR foi observada entre os dois grupos estudados ( $p=0,9858$ ). Apesar da consagrada utilização das provas de termorresistência na rotina de avaliação laboratorial do sêmen congelado de diversas espécies de interesse econômico, tem-se atribuído uma baixa sensibilidade diagnóstica em termos de predição de fertilidade das amostras submetidas aos testes. Nesse sentido, Viana (2004) não observou correlação entre a porcentagem de espermatozoides móveis pós-teste de termorresistência rápido e lento com os índices de fertilidade pós-inseminação artificial em bovinos. Tais achados podem estar relacionados à própria metodologia empregada na realização do TTR, submetendo as amostras seminais a condições “antifisiológicas”, representadas pelo estresse térmico (46°C) e osmótico (osmolaridade acima de 1000mOsm/L determinada pelo uso do crioprotetor glicerol) não representativos das reais condições encontradas pelas células espermáticas no trato reprodutor feminino. Portanto, os resultados obtidos no TTR não determinaram contribuição significativa à elucidação das hipóteses levantadas no presente modelo experimental, em concordância a outros estudos desenvolvidos anteriormente e agora revisados.

A integridade funcional da membrana plasmática é de vital importância para a viabilidade dos espermatozoides ao processo de fertilização (GIL et al., 2000, RASUL et al., 2001). No presente estudo, utilizando a combinação das sondas fluorescentes Diacetato de Carboxifluoresceína e Iodeto de Propídeo, não foram observadas diferenças estatísticas quanto a esse aspecto. Para espermatozoides criopreservados em meio TRIS ou BB ( $p=0,3488$ ). A manutenção de AIMP do sêmen bovino após o processo de congelamento/descongelamento parece sofrer grande influência dos componentes presentes no meio diluidor. Thun et al. (2002) observaram uma maior

proporção de IMP para espermatozoides criopreservados em meio à base de gema de ovo em relação àqueles processados em diluidor Biociphos-plus®, composto por lecitina de soja. Nesse sentido, Medeiros et al. (2002) apontam as lipoproteínas e fosfolípidos presentes na gema de ovo como responsáveis pelo mecanismo de proteção das membranas espermáticas, aumentando a proporção colesterol/fosfolípidos dos espermatozoides e, com isso, reduzindo-se a ocorrência do choque térmico ou choque frio. Nessa pesquisa, como ambos os meios de congelamento utilizados apresentaram gema de ovo como fonte de lipoproteínas, justificam-se os resultados

**Tabela 1** - Parâmetros de movimento espermático, motilidade total pós-teste de termorresistência rápido e integridade de membrana plasmática (média ± desvio-padrão agrupados, n=10 ejaculados por grupo) para os espermatozoides criopreservados respectivamente com o diluidor Botu-Bov® (BB) ou Tris-gema de ovo-frutose (TRIS).

	BB	TRIS	P-valor	GL
MOT (%)	71,8 ± 9,7 <sup>a</sup>	67,4 ± 10,5 <sup>a</sup>	0,3424	18
MP (%)	61,8 ± 6,1 <sup>a</sup>	52,5 ± 9,8 <sup>b</sup>	<b>0,0211</b>	18
VAP (µm/s)	83,7 ± 16,0 <sup>a</sup>	86,1 ± 6,0 <sup>a</sup>	0,9454	18
VSL (µm/s)	79,5 ± 14,4 <sup>a</sup>	69,1 ± 4,6 <sup>a</sup>	0,1686	18
VCL (µm/s)	121,5 ± 27 <sup>a</sup>	139,7 ± 13,1 <sup>a</sup>	0,0715	18
ALH (µm)	4,84 ± 1,1 <sup>a</sup>	5,9 ± 0,5 <sup>b</sup>	<b>0,0086</b>	18
BCF (Hz)	30,4 ± 4,2 <sup>a</sup>	26,6 ± 1,3 <sup>b</sup>	<b>0,0217</b>	18
STR (%)	89,3 ± 4,6 <sup>a</sup>	81,5 ± 3,0 <sup>b</sup>	<b>0,0003</b>	18
LIN (%)	66,4 ± 8,3 <sup>a</sup>	55 ± 7,4 <sup>b</sup>	<b>0,0045</b>	18
Rap (%)	67,0 ± 8,5 <sup>a</sup>	64,0 ± 8,4 <sup>a</sup>	0,4377	18
TTR (%)	24,7 ± 27,4 <sup>a</sup>	24,5 ± 21,9 <sup>a</sup>	0,9858	18
IMP (%)	26,1 ± 8,1 <sup>a</sup>	30,2 ± 10,8 <sup>a</sup>	0,3488	18

MOT: Motilidade Total; MP: Motilidade Progressiva; VAP: Velocidade de Trajeto; VSL: Velocidade Progressiva; VCL: Velocidade Curvilínea; ALH: Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça Espermática; BCF: Frequência de Batimentos; STR: Retilinearidade; LIN: Linearidade; Rap: Velocidade Rápida; TTR: Motilidade Total Pós-Teste de Termorresistência Rápido; IMP: Integridade de Membrana Plasmática.

\* Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). p = valor; GL = grau de liberdade.

**Tabela 2** - Padrões adotados para a análise computadorizada do movimento espermático bovino no aparelho Hamilton Thorn Research® Ivos-12/EUA.

Padrão CASA	
Número de Frames por segundo (Hz)	60
Número de Frames	50
Contraste celular mínimo para detecção	60
Tamanho mínimo da célula para detecção (pix)	6
Intensidade de luz	90
Velocidade mínima de trajeto (VAP, µm/s)	30
Velocidade progressiva mínima (STR, µm/s)	20

similares em termos de preservação das membranas espermáticas.

## CONCLUSÕES

Apesar dos encorajadores resultados de fertilidade proporcionados pelas técnicas atuais de processamento do sêmen bovino, estudos contemplando novos meios diluidores e seus constituintes se fazem necessários, podendo atuar de forma significativa na melhoria dos índices reprodutivos dos rebanhos.

Como os padrões de movimento refletem o ambiente bioquímico e as condições físicas impostas aos espermatozoides, a análise dos dados gerados no estudo permitem concluir que o meio diluidor Botu-Bov® promoveu maior viabilidade espermática pós-descongelamento, traduzida por maior qualidade e linearidade de movimento espermático, características que sugerem incrementos nos índices de fertilidade dos programas de inseminação artificial (IA).

ARTIGO RECEBIDO: Maio/2006

APROVADO: Dezembro/2006

## REFERÊNCIAS

- ALBERTI, K., CARMO, M.T., OBA, E. et al. Eficiência de novo diluente na congelabilidade de sêmen bovino. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, XVIII, 2004, Barra Bonita. **Resumos...Barra Bonita: São Paulo, 2004.** p.176.
- ARRUDA, R. P., CELEGHINI, E. C. C., ANDRADE, A. F. C. et al. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TEFT. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 1, 2004, Londrina. **Anais Palestra... Londrina: Paraná, 2004.** p.166-179.
- BARNABÉ, V. H., BARNABÉ, R. C., VISINTIN, J. A. et al. Estudo comparativo entre as provas rápida e lenta de termorresistência para avaliação de sêmen congelado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.4, n.3-4, p.6-12, 1980.
- BILODEAU, J. F., BLANCHETTE, S., CORMIER, N. et al. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, v. 57, n.3, p. 1105-1122, 2002.
- CENTOLA, G. M., HERKO, R., ANDOLINA, E. Comparison of sperm separation methods: effect on recovery, motility, motion parameters, and hyperactivation. **Fertility and Sterility**, v.70, n.6, p.1173-1175, 1998.
- CHEN, Y., FOOTE, R. H., TOBBACK, C. et al. Survival of bull spermatozoa seeded and frozen at different rates in egg yolk-Tris and whole milk extenders. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.4, p.1028-1034, 1993.
- COOTER, 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, n.2, p.98-99, 2005.
- CURTIS, G. G., WISHWANATH, R., PITT, C. et al. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. **Journal of Andrology**, v.19, n.6, p.704-709, 1998.
- DELL' AQUA Jr., J. A. **Efeito da centrifugação, tipos de envase e temperatura de descongelamento sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade relacionados com o local de deposição do sêmen e concentração da dose inseminante de sêmen congelado eqüino.** 2000. 81f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu/SP, 2000.
- FARRELL, P. B., PRESICCE, G. A., BROCKETT, C. C. et al. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v.49, n.4, p.871-879, 1998.
- 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, n.2, p.453-456, 2002.
- GIL, J., JANUSKAUSKAS, A., HAARD, M. C. H. et al. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biciphos-Plus® and Triladyl®. **Reproduction in Domestic Animals**, v.35, n.2, p.69-77, 2000.
- HAFEZ, E. S. E., HAFEZ, B. Transporte e Sobrevivência de Gametas. In\_\_\_\_\_. **Reprodução Animal**. 7.ed. Barueri: Manole, 2004. p.83-96.
- HALLAP, T., HÄÄRD, M., JAAKMA, Ü. et al. Does cleaving of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? **Theriogenology**, v.62, n.3-4, p.702-713, 2004.
- HARRISON, R.A.P., VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian Spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, n.1, p.343-352, 1990.

- HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, n.1-3, p.2-22, 2000.
- JANUSKAUSKAS, A., JOHANNISSON, A., MARTINEZ-RODRIGUES, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, v. 60, n.4, p. 743-758, 2003.
- KOMMISRUUD, E., GRAFFER, T., STEINE, T. Comparison of two processing systems for bull semen with regard to post thaw motility and nonreturn rates. **Theriogenology**, v.45, n.8, p.1515-1521, 1996.
- MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, H. Evaluation of frozen semen: traditional and new approaches. In: **Topics in bull fertility**. Online. Disponível em:: [www.ivis.org/bull](http://www.ivis.org/bull). Acesso em: 20ago.2006. fertility/2000/Martínez-Rodríguez.
- MEDEIROS, C. M. O., FORELL, F., OLIVEIRA, A. T. D. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, n.1, p.327-344, 2002.
- NAGY, S., HALLAP, T., JOHANNISSON, A. et al. Changes in plasma membrane and acrossome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4h incubation as measured by multicolor flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, v.80, n.3-4, p.225-235, 2004.
- PAPA, F. O., GABALDI, S. H., WOLF, A. Viabilidade espermiática pós-descongelção de sêmen bovino criopreservados com meio diluente glicina-gema em quatro diferentes tempos de estabilização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 24, n.1, p.39-44, 2000.
- RASUL, Z., AHMAD, N., ANZAR, M. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity and acrossome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.22, n.2, p.278-83, 2001.
- TARDIF, A. L., FARREL, P. B., TROUERN-TREND, V. et al. Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.8, p. 1606-12, 1997
- THUN, R., HURTADO, M., JANET, F. Comparison of Biociphos-Plus® and Tris-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. **Theriogenology**, v.57, n.3, p.1087-1094, 2002.
- VERSTEGEN, J., IGUER-OUADA, M., OCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, n.1, p. 149-179, 2002.
- VERBERCKMOES, S., SOOM, A. V., DEWULF, J. et al. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. **Theriogenology**, v.63, n.3, p.912-922, 2005.
- VIANA, F. P. **Estudo sobre a eficiência dos testes de termorresistência (LENTO e RÁPIDO) em predizer a fertilidade do sêmen congelado na espécie bovina**. 2004. 67f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu/SP, 2004.
- VISHWANATH, R., SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v.62, n.1-3, p.23-53, 2000.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, n.2, p.481-492, 2000.