

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO DA GEMA DE OVO PELA LECITINA DE SOJA
NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EQUINO

Gabriel Barcellos Felício

Botucatu – SP
2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO DA GEMA DE OVO PELA LECITINA DE SOJA
NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EQÜINO

Gabriel Barcellos Felício

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Frederico
Ozanam Papa

Botucatu – SP
2008

Nome do autor: Gabriel Barcellos Felício

Título: EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO DA GEMA DE OVO PELA LECITINA DE SOJA NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EQUINO

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr Frederico Ozanam Papa
Presidente e Orientador
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Marco Antônio Alvarenga
Membro Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda
Membro Departamento de Reprodução Animal
FMVZ – USP – São Paulo

Data da defesa: 03 de novembro de 2008.

Dedico principalmente ao meu pai Roberto
e a minha mãe Heloísa pelo amor
incondicional dedicado aos filhos.

Aos meus irmãos Daniel, Rafael e Maria
Letícia por acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter colocado pessoas maravilhosas em meu caminho.

Ao Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa pelo ser humano grandioso, “pai”, amigo e pelo profissional de alta capacidade, a quem devo a oportunidade de grandes ensinamentos na área de reprodução animal.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Alvarenga, pela co-orientação, excelente pesquisador e, acima de tudo, uma grande pessoa, e pelos incentivos dados ao longo da minha permanência no curso de mestrado.

Aos meus grandes amigos, José Antônio Dell'Áqua Jr., Antônio Sylvio Lopes de Medeiros e Cely Marini pela ajuda e sugestão na elaboração deste trabalho.

Aos docentes, Dra. Maria Denise Lopes, Dr. Fernanda da Cruz Landim, Dr. Sony Dimas Bicudo, Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira, Dr. Nereu Carlos Prestes, Dr. Cezinande de Meira e Dra. Eunice Oba, pelas aulas ministradas e dúvidas solucionadas durante o curso de Mestrado.

Ao Haras Agromen, aos grandes amigos veterinários Cássio L. N. Trinke e Marcelo Mantrá e funcionários, os quais me ajudaram na realização da primeira etapa do meu projeto.

A minha namorada Flávia por ter me aturado nesses anos, sempre presente nos momentos bons e difíceis ao longo desses anos.

A minha Faculdade UNIPINHAL (Universidade de Espírito Santo do Pinhal - São Paulo) pelos ensinamentos e a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – Campos de Botucatu, ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária e a Seção de Pós-graduação pela oportunidade concedida.

Aos meus amigos Hedão, Daniel, Marcião, Durock, Carmo, Rodrigo, André, Piolho, Vivi, Ieda, Guta, Bruna, Jeane, Gustavo, Camila, Bruno, Bethânia, Ana Isabel, Ian, Rosiara, Daniela, Fernanda, Boka de Alicate, Danilinho, Cassinha, Perna pela convivência e momentos de alegria que passamos juntos.

E aos funcionários Márcio Figueira, Miguel, Tico (*in memoriam*), Cristina, Edílson, Walter, Dona Raquel por suas ajudas durante o trabalho e momentos de descontração.

Aos meus avós que devem estar muito orgulhosos de mim e aos meus tios, primos.

A Maria, Sr. Pedro, Ana pelo carinho e também pelos almoços deliciosos fornecidos durante esses anos.

A Empresa Biotech pelos materiais fornecidos ao longo do meu trabalho e aos funcionários pelo carinho e atenção.

A todos os estagiários que participaram do meu projeto.

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO.....	5
2) REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1) Biotecnologia de Sêmen eqüino.....	7
2.1.1) Sêmen congelado.....	7
2.1.2) Princípios de criopreservação.....	7
2.1.3 Criopreservação com diluentes quimicamente definidos.....	10
2.1.3.1 Lecitina de soja.....	11
3) OBJETIVOS.....	16
CAPÍTULO 1: Efeito da substituição da gema de ovo pela lecitina de soja na criopreservação de sêmen eqüino	17
DISCUSSÃO	25
CONCLUSÕES.....	29
BIBLIOGRAFIA.....	30
Anexos.....	..34

FELÍCIO, G.B. **Efeito da substituição da gema de ovo pela lecitina de soja na criopreservação de sêmen eqüino**. Botucatu, 2008. 35p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi verificar a eficiência na congelabilidade e fertilidade da substituição da gema de ovo pela lecitina de soja no diluidor comercial Botu-Crio[®] (BC). Foram realizados dois experimentos laboratoriais e os respectivos testes de fertilidade. No experimento I comparou-se o diluente Botu-Crio[®] com o diluidor o Botu-Crio em que a gema de ovo foi substituída pela lecitina de soja numa concentração de 45g/L (BCLS45). Utilizou-se um ejaculado de 15 garanhões da raça Brasileiro de Hipismo (BH). Para o teste de fertilidade do Experimento I foi utilizado um garanhão da raça BH. Foram inseminados 12 éguas com o BC e 17 com o BCLS45. No experimento II comparou-se o diluente BC com o Botu-Crio sem gema de ovo (BCLS) acrescido de diferentes concentrações de lecitina de soja: 10,0; 12,5; 15,0; 17,5 e 20,0g/L (BCLS10; BCLS 12,5; BCLS15; BCLS17,5 e BCLS 20). Para tal, foram utilizados 1 ejaculado de 10 garanhões de diferentes raças. Para o teste de fertilidade do experimento II utilizou-se um garanhão da raça Trakener e foram realizadas inseminações comparativas entre BC e BCLF20, sendo utilizadas 12 éguas com BC vs 10 éguas com BCLS20. Também comparou-se os diluente BC com o BCLS10, no qual foi utilizado um garanhão da raça Westfalen e foram inseminadas 8 éguas com BC vs 12 éguas com BCLS10. No Experimento I, os resultados de motilidade total, ($61,4 \pm 16,2$ vs $61,4 \pm 15,9$); motilidade progressiva, ($27,0 \pm 9,8$ vs $26,7 \pm 10,6$); integridade da membrana plasmática (IMP) ($53,4 \pm 11,5$ vs $57,4 \pm 7,0$); respectivamente para os diluidores Botu-Crio[®] e BCLS45, não havendo diferença entre os parâmetros espermáticos ($p > 0,05$). No experimento II também não foram observadas diferenças entre os parâmetros avaliados, sendo para motilidade total BC ($68,1 \pm 15,9$) e BCLS10; BCLS12,5; BCLS15; BCLS17,5 e BCLS20 ($65,8 \pm 13,5$; $65,9 \pm 17,6$; $67,6 \pm 11,2$; $64,0 \pm 15,3$ e $60,5 \pm 15,3$), motilidade progressiva: BC ($28,8 \pm 9,2$) e BCLS 10; BCLS 12,5; BCLS15; BCLS17,5 e BCLS 20 ($29,8 \pm 9,8$; $29,6 \pm 9,7$; $31,4 \pm 8,2$; $30,2 \pm 10,5$ e $26,6 \pm 11,5$) e IMP BC ($50,7 \pm 10,3$) e BCLS10,

BCLS 12,5; BCLS15; BCLS17,5 e BCLS20 ($47,5 \pm 8,5$; $46,6 \pm 12,2$; $49,9 \pm 8,8$; $46,1 \pm 10,3$ e $43,6 \pm 10,9$). Com relação a fertilidade foram desenvolvidos três experimentos ou seja: BC vs BCLS45 com resultados de 66% e 17% respectivamente ($p < 0,01$), BC vs BCLS20 obteve-se 66% e 40% e BC vs BCLS10 75% e 41% de taxas de prenhes respectivamente. Os resultados dos parâmetros espermáticos foram semelhantes entre o BC e BCLS com diferentes concentrações de lecitina de soja. Apesar da similaridade dos achados laboratoriais, a fertilidade não acompanhou tais resultados, mostrando principalmente que o diluente BCLS45 apresentou taxas inferiores ao BC, enquanto que o BCLS20 e BCLS10 mostraram índices semelhantes ao BC. Com base nos resultados pode-se concluir que o diluente BCLS pode ser uma alternativa futura para criopreservação de sêmen eqüino, livre de agentes microbiológicos, havendo necessidade de novos estudos relacionados com a concentração ideal de lecitina de soja no meio de congelação nesta espécie.

Palavras-chave: eqüino, sêmen congelado, gema de ovo, lecitina de soja, fertilidade

FELÍCIO, G.B. **Effect of egg yolk replacement by soy bean lecithin on equine semen cryopreservation.** Botucatu, 2008. 35p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Abstract

The objective of the present study was to verify the freezability and fertility of the BotuCrio without egg yolk extender where the egg yolk was replaced by soy been lecithin. Two experiments were performed on experiment 1 Botu-Crio[®] (BC) and Botu Crio without egg yolk containing 45g/L soy been lecithin (BCLS45) were compared. One ejaculated from 15 stallions from Brazilian Jump Horse Bred were used. On experiment 2, different concentrations of de soy bean lecithin: 10,0; 12,5; 15,0; 17,5 e 20,0g/L (BCLS10, BCLS12,5, BCLS17,5 e BCLS20) were compared. On the first fertility trial 12 mares were inseminated. With BC and 17 mares with Botu-Crio without egg yolk (BCLS45) using semen from only one stallion. On the second fertility trial 12 mares were inseminated with BC and another 10 mares with BCLS20. In another fertility trial 12 mares were inseminated with Botu-Crio vs and 8 mares with BCLS10 using frozen semen from a Westfalen stallion. No differences were observed on total motility (61.4 x 61.4); progressive motility, (27.0x26.7); plasmatic menbrane integrity (IMP) (53.4x57.4); between Botu-Crio[®] and Botu-Crio without egg yolk, (p>0,05). Also no differences were observed when different concentrations of soy been lecithin were used. The results were : For total motility BC (68,1±15,9) BCLS10, BCLS12,5, BCLS17,5 , BCLS20 (65,8±13,5; 65,9±17,6; 67,6±11,2; 64,0±15,3 ,60,5±15,3), for progressive motility: BC (28,8±9,2) and BCLS10, BCLS12,5, BCLS17,5 e BCLS20(29,8±9,8; 29,6±9,7; 31,4±8,2; 30,2±10,5 and 26,6±11,5) and IMP BC (50,7±10,3) and BCLS10, BCLS12,5, BCLS17,5 e BCLS20 (47,5±8,5; 46,6±12,2; 49,9±8,8; 46,1±10,3 and 43,6±10,9). The results of the fertility trials were: BC vs BCLS45 , 66,0 e 17% respectively (p<0,01); BC vs BCLS20 66,0 e 40,0% e BC vs BCLS10 75,0 e 41,0 respectively. In spite of similar laboratorial finds the fertility was different between some treatments showing that as higher the concentration of lower was the fertility rates. Based on observed results we can concluded that the use of BCLS can be an alternative to be used on future for free pathogens equine semen preservation however the decrease on fetility rates is a matter of concern. Further studies are

necessary to clarify the reasons for the decrease on fertility and also to determine the ideal soy bean lecithin concentration to be use on stallion freezing extenders.

Key words : equine, freezing semen, egg yolk, soy been lecithin, fertility

1) INTRODUÇÃO

A utilização do sêmen congelado de eqüinos em programas de inseminação artificial tem sido bem aceita na ultima década pelas Associações de Criadores de Cavalos no Brasil, principalmente pela evolução que esta biotecnologia alcançou.

Segundo Squires et al. (1999) a aceitação do uso da inseminação artificial pela maioria das Associações de Raças Eqüinas teve um efeito significativo na indústria do cavalo, ganhando popularidade em todo mundo, já que resulta em uma melhora da qualidade da produção.

Esse incremento na indústria eqüina está ocorrendo principalmente devido ao desenvolvimento e utilização de novas biotécnicas de reprodução assistida, como o sêmen refrigerado, transportado e sêmen congelado. A congelação de sêmen umas das biotecnologias mais antigas relacionada à reprodução, teve sua descoberta de uma maneira acidental, onde Polge et. al. (1949) constataram que ao adicionar glicerol em meios diluentes para congelação de espermatozóides, estes preservaram sua motilidade após a descongelação.

Atualmente, o interesse pela utilização da inseminação artificial com sêmen congelado na espécie eqüina é crescente, e esse crescimento está relacionado às diversas vantagens que esta biotecnologia oferece, como a eliminação dos custos e diminuição dos riscos no transporte da égua para cobertura, facilidades na aquisição e transporte do sêmen de animais geneticamente superiores através de países ou continentes e possibilidade da utilização de sêmen de garanhões mesmo que estes estejam participando de eventos hípicas, doentes ou mesmo mortos (Squires, 1999).

Novos diluidores foram desenvolvidos e colaboraram para obtenção de índices de congelabilidade e fertilidade satisfatórios. Porém, a utilização de componentes de origem animal, tais como leite e gema de ovo em diluentes para congelação de sêmen vem se tornando uma preocupação das autoridades que controlam as barreiras sanitárias no contexto nacional e principalmente internacional.

Esta preocupação se deve ao grande trânsito de material genético entre países e estes produtos serem de fácil proliferação e veiculação de agentes microbiológicos. Alguns diluentes com constituintes de origem vegetal estão disponíveis no mercado para outras espécies, mas apresentam baixos índices de fertilidade quando comparados com os diluidores que contém gema de ovo e ou leite.

Com relação a espécie eqüina não há ainda no mercado nacional e internacional, diluidores sem a presença de componentes de origem animal. Portanto o presente projeto teve como objetivo verificar a eficiência na congelabilidade e fertilidade do diluidor Botu-Crio, em que a gema de ovo foi substituída pela lecitina de soja.

2)REVISÃO DE LITERATURA

2.1) Biotecnologia de Sêmen eqüino

O emprego da biotecnologia de sêmen congelado eqüino tem apresentado inúmeras vantagens, como redução dos gastos e estresse relacionados ao transporte da égua. A utilização do sêmen criopreservado viabiliza o uso do reprodutor em momentos nos quais não seria possível a monta natural ou ainda do sêmen fresco ou refrigerado, como é o caso da participação do animal em atividades esportivas e também nos casos onde o animal está inapto à reprodução ou mesmo veio a óbito. Esta biotécnica viabiliza a utilização de garanhões geneticamente superiores de diversos locais do mundo sem os gastos proibitivos inerentes ao transporte tanto do macho como da fêmea, além de aumentar o número de animais a serem acasalados com um determinado reprodutor (Graham, 1996).

No entanto, esta técnica não se apresenta amplamente difundida, devido às taxas razoáveis de fertilidade por parte de alguns garanhões, a necessidade de um técnico capacitado para efetuar não apenas o processamento do sêmen desde a colheita até a criopreservação, como também na utilização adequada do mesmo nos programas de inseminação artificial, sendo muitas vezes necessário o deslocamento do garanhão a locais habilitados onde o sêmen possa a ser colhido e processado adequadamente, o que implica em gastos adicionais (Graham, 1996).

Melo et. al. (2007) objetivando otimizar a técnica de congelação de sêmen de garanhões, desenvolveram uma metodologia que torna possível congelar o sêmen após 24 horas de refrigeração, sem que haja alterações na viabilidade e fertilidade quando comparado a metodologia convencional.

2.1.1) Princípios de criopreservação

Durante o processo de criopreservação, o sêmen deve ser resfriado desde a temperatura corpórea até a temperatura ambiente ($37^{\circ}\text{C} \rightarrow 20^{\circ}\text{C}$), o que parece não ocasionar danos aos espermatozóides quando este se encontra diluído em meio adequado (Moran, 1992 apud Keith, 1998). O estresse inicial se dá quando o espermatozóide passa da temperatura

ambiental para 5⁰C (Squires et.al., 1999). Isto é devido à fase de transição da membrana plasmática do estado líquido cristalino, para o estado de gel (Graham, 1996). Para minimizar este efeito é necessário controlar a taxa de resfriamento entre as temperaturas de 19⁰ a 8⁰C e pela adição de lipídeos (gema de ovo) ou lipoproteína (leite) ao diluente (Graham, 1996), além do uso de curvas de resfriamento lentas (-0,05⁰C /min.). A gema de ovo no meio diluente de criopreservação beneficia os espermatozóides por manter a pressão coloidal do meio e também por uma lipoproteína de baixa densidade, a qual estabiliza a membrana espermática durante a congelação e descongelação (Foulkes, 1977; Watson, 1990).

Holt (2000), revisou os aspectos relacionados a congelação de sêmen e relatou que os efeitos crioprotetores da gema de ovo estão envolvidos com a porção lipoprotéica de baixa densidade a qual protege as células espermáticas do choque térmico, da fase de transição dos lipídeos e danos a membrana plasmática a temperaturas abaixo do ponto de congelação da solução. De Leeuw et al. (1993), concluíram que a gema de ovo desempenha um importante papel na criopreservação de espermatozóides de touros e constataram que a exclusão da mesma dos meios diluentes contendo propanediol, sucrose ou sucrose com polivinilpirrolidone, levou a uma redução da porcentagem de células viáveis durante a refrigeração e congelação.

Vishwanath & Shannon (2000) relataram a ação protetora da gema de ovo nos espermatozóides bovinos contra os efeitos tóxicos do plasma seminal. Entretanto, ela também fornece substratos (aminoácidos aromáticos tais como a L-fenilalanina) para a produção de agentes oxidativos (H₂O₂) pela liberação de aminoácido aromático oxidase (AAAO) pelas células mortas. A quantidade de gema de ovo necessária para promover a proteção contra os efeitos das toxinas do plasma seminal é proporcional à quantidade de plasma seminal no sêmen diluído. Desta forma, quanto mais diluído o sêmen, maior a concentração necessária de gema de ovo.

Bedford et al. (1995) estudaram os efeitos da gema de ovo e do glicerol no sêmen de garanhões e observaram um efeito nocivo da gema quando em interação com o plasma seminal das amostras refrigeradas a 5⁰C no período de 6 a 24 horas de refrigeração nos parâmetros de motilidade total e

progressiva. Esses autores concluíram que a gema de ovo e o glicerol adicionados ao meio diluente a base de leite desnatado (com o plasma seminal) não deprimiram a motilidade total ou progressiva do sêmen refrigerado de garanhões, mas agiram adversamente na fertilidade.

Embora a gema de ovo e o leite desnatado beneficiem o espermatozóide na criopreservação, estes compostos, que são de origem animal, podem representar risco ao potencial das células, por conter agentes microbiológicos específicos, comprometendo a qualidade espermática (Gil et al. 2003). Na adição de lecitina, como a vagem de lecitina de soja, tem sido testada como um substituto de gema de ovo e leite nos diluentes (Gil et al. 2003).

Segundo Landfeld et al. (2002), a pasteurização da gema de ovo pode ser uma alternativa para substituir a gema de ovo fresca. Contudo, não se sabe se o processo de pasteurização é suficiente para garantir o não crescimento de microorganismos nos diluentes de sêmen. Na adição do processo de pasteurização, que requer temperaturas elevadas, pode induzir modificações bioquímicas na gema do ovo, podendo também induzir coagulação e sedimentação das lipoproteínas compostas nos diluentes afetando a qualidade espermática após descongelação.

Os eventos ocorridos no processo de criopreservação envolvem os seguintes passos: redução da temperatura, desidratação celular, congelamento e descongelamento (Medeiros et al. 2002). Estes procedimentos ocasionam danos celulares devido à mudança na temperatura, formação de cristais de gelo, injúrias oxidativas, alterações na membrana do espermatozóide, lesões do DNA, estresse osmótico além da toxicidade dos crioprotetores (Ball & Vo, 2001). A célula espermática parece sensível ao estresse osmótico como também a adição e a remoção de crioprotetores (Watson, 2000; Ball & Vo, 2001).

O processo de descongelamento de sêmen eqüino envolve inúmeros processos físicos e químicos, que são responsáveis pela manutenção da integridade e viabilidade espermática, assim com a fertilidade de sêmen congelado de eqüino. A água pura se congela e forma cristais de gelo a 0°C, enquanto o ponto de congelamento de uma solução é mediado pela concentração de partículas ou soluto que ela contém. Segundo bases físico-químicas, a lesão celular, durante os processos de congelamento e descongelamento, é causada pela

formação de cristais de gelo intracelular que afetam a estrutura da célula, pela concentração de soluto resultante da congelação da água pura e da interação entre estes dois fatores (Graham, 1996).

Embora os crioprotetores sejam fundamentais para a sobrevivência dos espermatozóides no processo de congelação, eles podem também, exercer efeitos tóxicos e diminuir as taxas de fertilidade quando presentes em altas concentrações (Rossi et. al, 2003).

A utilização de diversos crioprotetores e suas respectivas combinações podem minimizar e controlar os processos deletéricos que ocorrem na célula espermática durante a congelação e descongelação, possibilitando dessa maneira, resultados mais satisfatórios de motilidade e viabilidade pós-descongelação e conseqüentemente melhores taxas de prenhes (Medeiros et. al, 2002; Rossi et. al, 2003).

Segundo Graham (1996), para minimizar este efeito é necessário controlar a taxa de resfriamento entre as temperaturas de 19° a 8°C , fazendo o uso de curvas lentas de resfriamento ($-0,05^{\circ}\text{C} / \text{min.}$) e adicionar lipídeos (gema de ovo) ou lipoproteína (leite) ao diluente.

Uma taxa de refrigeração lenta e a adição de substâncias ao meio de congelação como açúcares, gema de ovo, lipoproteínas do leite, glicerol, BSA, álcool polivinil e lipossomas, minimizam os danos às células espermáticas durante a fase de refrigeração (Amann & Pickett, 1987; Katila, 1997).

Segundo Gao & Critser (2000), caso a célula espermática seja refrigerada rapidamente, esta não tem tempo suficiente para desidratar-se e manter o equilíbrio osmótico, tornando-se altamente refrigerada, com possibilidade de formação de cristais de gelo intracelular, o que pode causar danos irreversíveis à célula.

2.1.2) Criopreservação com diluentes quimicamente definidos

Com a aceitação do uso de sêmen congelado por muitas associações de raça na última década, houve uma renovação e estímulo a pesquisas sobre protocolos para congelação de sêmen de garanhões (Alvarenga et al., 2005).

Conseqüentemente, os meios diluentes também passaram a ser foco dessas pesquisas. A maioria dos meios contém uma fonte de lipoproteínas,

através da incorporação de produtos do leite, gema de ovo ou uma combinação destes dois ingredientes, que auxiliam na estabilização das membranas durante os ciclos da congelação/descongelação. Monossacarídeos (glicose ou frutose), dissacarídeos (sucrose ou lactose) e trissacarídeos (rafinose) também são comumente incorporados. Os dissacarídeos e trissacarídeos são açúcares não permeáveis, usados principalmente por suas propriedades osmóticas. Os monossacarídeos também possuem efeitos osmóticos, porém eles podem ser utilizados pelos espermatozóides como uma fonte de energia. Entre os crioprotetores penetrantes o glicerol é o crioprotetor universalmente utilizado, embora outros agentes estejam sendo empregados, como o dimetilsulfóxido, etileno glicol, metilformamida e dimetilformamida (Alvarenga et al, 2003; Varner, 2003). Outros componentes como EDTA, detergentes, tampões e antibióticos também são incluídos nos meios (Cotorello & Henry, 2002).

Os meios a base de lecitina de soja ou contendo lipoproteínas de baixa densidade (LDL) foram desenvolvidos para substituir a gema de ovo ou a combinação de gema de ovo e leite. Deste modo, já são encontrados comercialmente diluentes a base de lecitina de soja para congelação de sêmen bovino (Bioxcell[®], IMV, L'Aigle, France; AndroMed[®], Minitüb, Tiefenbach, Germany).

2.1.2.1) Lecitina de soja

A substituição da gema de ovo pela lecitina de soja não ficou restrita somente à espécie bovina e tem se expandido para os meios de congelação utilizados em outras espécies domésticas.

Hinsch et al. (1997) publicaram um estudo comparativo entre o desempenho de um diluente a base de gema de ovo (Trilady[®], Minitüb, Tiefenbach, Germany) e um meio a base de lecitina de soja (Biociphos[®], IMV, L'Aigle, France) para criopreservação de sêmen bovino, no qual avaliaram os parâmetros de motilidade, viabilidade celular, integridade acrossomal e fertilidade. Os resultados não apresentaram diferenças significativas entre os meios, destacando-se a similaridade nas taxas de não retorno ao cio aos 60-90 dias (Trilady[®]: 68,66% vs. Biociphos[®]: 67,81%), de modo que os autores

concluíram que ambos os diluentes possuíam qualidade equivalente para criopreservação de sêmen bovino.

Em 1998, Bousseau et al. realizaram uma série de experimentos que, entre os objetivos, vislumbravam detectar possíveis contaminações por bactérias ou micoplasmas em gemas de ovo provenientes de várias fontes comerciais e em diluentes tanto a base de gema de ovo (Laiciphos[®], IMV, L'Aigle, France; Triladyl[®], Minitüb, Tiefenbach, Germany) como a base de lecitina de soja (Biociphos plus[®], IMV, L'Aigle, France), ambos destinados à criopreservação de sêmen bovino. Também foram realizados experimentos comparativos avaliando a capacidade fertilizante, *in vitro* e *in vivo*, do sêmen congelado nos meios Laiciphos[®] e Biociphos plus[®]. De acordo com os resultados obtidos, os autores puderam concluir que a contaminação bacteriana está presente não apenas na gema de ovos frescos como também em várias preparações comerciais (gema na forma líquida ou em pó). Além disso, a presença de vários antibióticos nos meios Triladyl[®] e Laiciphos[®] não suprimiu a contaminação bacteriana. No entanto, a ausência de bactérias ou micoplasmas nas partidas de Biociphos plus[®] avaliadas confirmaram sua segurança sanitária como um meio diluente de sêmen. Os testes de fertilidade realizados entre os meios Laiciphos[®] e Biociphos plus[®] não apontaram diferenças significativas: taxas de embriões desenvolvidos *in vitro* (touro 3: 10,8% e touro 4: 8,1% vs. touro 3: 18,2% e touro 4: 16,1%), taxas de não retorno ao cio em condições controladas (55,4% vs. 55,3%) e taxas de não retorno ao cio em condições a campo (60,4% vs. 61,6%), demonstrando o papel protetor da lecitina de soja sobre o espermatozóide bovino ao substituir a gema de ovo ou a associação de gema de ovo e leite.

No trabalho desenvolvido por Gil et al. (2000) sobre criopreservação de sêmen bovino, novamente comparou-se o desempenho do diluente a base de gema de ovo Triladyl[®] com o meio à base de lecitina de soja Biociphos-Plus[®], obtendo-se resultados semelhantes aos de Hinsch *et al.* (1997), quanto aos parâmetros de fertilidade (Triladyl[®]: 69,1% vs. Biociphos-Plus[®]: 69,2%). Concluiu-se que a fertilidade não foi afetada pelo meio à base de lecitina de soja, que também produziu resultados equivalentes ou superiores durante as avaliações realizadas laboratorialmente.

Aires et al. (2003) compararam os efeitos do meio a base de lecitina de soja (AndroMed®) e do meio a base de gema de ovo (Tris-gema) sobre parâmetros espermáticos avaliados *in vitro* e sobre a fertilidade *in vivo* do sêmen bovino criopreservado. Não foram encontradas diferenças significativas entre os meios quanto às avaliações *in vitro* do número de espermatozóides ligados à zona pelúcida, capacidade de ligação à zona pelúcida e capacidade de indução da reação acrossomal. No entanto, a motilidade espermática pós-descongelção foi significativamente mais baixa nas amostras congeladas com o meio Tris-gema em todos os períodos pós-descongelção avaliados (10 e 30 minutos e 1, 2 e 4 horas). Por fim, no teste de fertilidade avaliando as taxas de não retorno ao cio aos 56 dias revelaram uma diferença significativa entre os meios (AndroMed®: 70,45% vs. Tris-gema: 67,85%), demonstrando que o meio livre de proteína animal é adequado para inseminação artificial em bovinos, sendo uma alternativa viável aos meios tradicionais à base de gema de ovo.

Dell'Aqua Junior et al. (2007) compararam os meios Tris-gema de ovo e Botu-Bovi® (Biotech-Botucatu-Ltda, São Paulo, Brasil) quanto à eficiência para congelação de sêmen bovino. Os resultados demonstraram que o meio livre de componentes de origem animal foi similar ou superior dentre os parâmetros avaliados, destacando-se a sua superioridade para o parâmetro de motilidade progressiva (Tris-gema de ovo: 48% vs. Botu-Bov Com®: 65%).

No entanto, alguns trabalhos não obtiveram o sucesso relatado acima com os meios à base de lecitina de soja. Em 2000, Van Wagtendonk-de Leeuw et al. ao comparar o desempenho de dois meios a base de gema de ovo - Tris e Tris-concentrado (Gibco-BRL, Life Technologies, Breda, The Netherlands) e o meio a base de lecitina de soja Biociphos-Plus® na congelação de sêmen de touros, não encontraram diferenças significativas entre os meios a base de gema de ovo quanto ao parâmetro de motilidade (Tris: 41,9% vs. Tris-concentrado: 42,2%), observando-se porém, que o meio Biociphos-Plus® obteve um desempenho significativamente pior (39,2%). No teste de fertilidade (taxa de não retorno ao cio aos 56 dias), também não houve diferença entre os meios à base de gema de ovo, porém novamente o meio à base de lecitina de soja foi inferior (Tris: 68,7%; Tris-concentrado: 68,2%; Biociphos-Plus®: 64,3%). Os autores ressaltaram que a ausência de diferença nos teste de fertilidade

entre os diluentes a base de gema de ovo e de lecitina de soja presente em estudos anteriores poderia decorrer da utilização de altas doses inseminantes, mascarando o efeito do diluente sobre a população espermática.

No estudo desenvolvido por Thun et al. (2002), avaliou-se a eficiência do meio Tris-gema de ovo sob dois protocolos de congelação e do meio a base de lecitina de soja Biociphos-Plus[®] utilizando apenas um dos protocolos para a criopreservação de sêmen bovino. Foram verificadas diferenças significativas entre os meios, resultando em superioridade do diluente Tris-gema de ovo sob o diluente Biociphos-Plus[®] nos testes de avaliação laboratorial (motilidade e choque hiposmótico). No entanto, no teste de fertilidade (taxa de não retorno ao cio aos 75 dias) não foi observada diferença entre os meios.

O trabalho realizado por Celeghini et al. (2008) investigou os efeitos de dois diluentes na criopreservação de sêmen bovino: um a base de gema de ovo (Botu-Bov[®], Biotech-Botucatu-Ltda, São Paulo, Brasil) e outro à base de lecitina de soja (Bioxcell[®], IMV, L'Aigle, France). Dentre os parâmetros espermáticos avaliados, foram identificadas diferenças significativas entre os meios na avaliação computadorizada dos movimentos espermáticos, destacando-se a motilidade total (Botu-Bov[®]: 40,1% vs. Bioxcell[®]: 24,1%) e a motilidade progressiva (Botu-Bov[®]: 20,8% vs. Bioxcell[®]: 10,7%). Na avaliação de integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial mitocondrial, também foram encontradas diferenças significativas entre os meios: membrana plasmática intacta (Botu-Bov[®]: 28,8% vs. Bioxcell[®]: 18,1%), acrossomo intacto (Botu-Bov[®]: 68,8% vs. Bioxcell[®]: 55,2%), alto potencial mitocondrial (Botu-Bov[®]: 23,9% vs. Bioxcell[®]: 16,9%) e células com membranas plasmática e acrossomal intactas e alto potencial mitocondrial (Botu-Bov[®]: 20,8% vs. Bioxcell[®]: 11,1%). Pelos resultados obtidos, os autores concluíram que o meio a base de gema de ovo (Botu-Bov[®]) teria maior vantagem em termos de preservação celular.

Apesar da divergência nos resultados dos experimentos envolvendo o emprego de meios a base de lecitina de soja para criopreservação de sêmen bovino, a utilização de formulações compostas por lecitina de soja estendeu-se para outras espécies.

Dessa forma, em um trabalho sobre criopreservação de sêmen na espécie ovina, Gil et al. (2003) destacaram que países produtores de lã (ex.: Uruguai) vivem sob pressão econômica, sendo o melhoramento genético do rebanho através de inseminação artificial com sêmen congelado, uma importante ferramenta para melhorar a produtividade dos rebanhos. No entanto, o uso desta biotecnologia não poderia envolver riscos sanitários. Conseqüentemente, realizou-se um estudo comparativo entre um meio a base de leite e gema de ovo e do meio a base de lecitina de soja (Bioxcell[®]) originalmente empregado na congelação de sêmen bovino. Entre os resultados obtidos, não foram encontradas diferenças significativas entre o Bioxcell[®] e o meio a base de leite e gema de ovo para os parâmetros de motilidade (47% vs. 46,5%), integridade de membrana (38% vs. 37,7%), espermatozóides não-capacitados (28,5% vs. 26,3%) e fertilidade: taxas de não retorno ao cio aos 21 dias (35,9% vs. 33,2%) e aos 36 dias (34,8% vs. 32,6%) e diagnóstico ultrassonográfico (28,4% vs. 27,2). Pelos resultados obtidos, os autores concluíram que o meio Bioxcell[®] constitui uma alternativa ao meio convencional a base de leite e gema de ovo, fornecendo resultados de fertilidade semelhantes após a inseminação artificial cervical sob condições de manejo extensivo, sendo uma alternativa segura na introdução de um novo material genético em um rebanho ou país.

Bittencourt et al. (2007) apresentaram um trabalho no qual, entre os objetivos propostos, encontrava-se a avaliação do meio comercial a base de lecitina de soja (Bioxcell[®]) para congelação de sêmen ovino. Apesar do meio Bioxcell[®] não apresentar os melhores resultados nas avaliações das características do movimento espermático e de integridade da membrana plasmática, os valores obtidos foram semelhantes aos encontrados com o meio Tris-gema de ovo padrão.

Na mesma linha de pesquisa, Bittencourt et al. (2007) apresentaram outro trabalho avaliando, entre outros meios, o meio Bioxcell[®] para congelação de sêmen caprino. Dentre os resultados obtidos, o meio Bioxcell[®] apresentou resultados semelhantes aos demais nas avaliações das características do movimento espermático, sendo que todos os outros diluentes apresentavam gema de ovo em sua constituição. No entanto, na avaliação de integridade da

membrana plasmática, o meio Bioxcell® foi inferior a dois meios (Tris-gema de ovo + 0,5% de dodecil-sulfato de sódio e Tris-gema de ovo + 0,5% de dodecil-sulfato de sódio + 0,1% de EDTA).

Ricker et al. (2006) avaliaram o efeito da substituição da gema de ovo no meio de congelação para sêmen eqüino INRA82® pela fosfatidilcolina de soja e fosfatidilcolina de ovo. Não foram encontradas diferenças significativas entre os meios INRA82® com gema de ovo, INRA82® com fosfatidilcolina de soja e INRA82® com fosfatidilcolina de ovo quanto aos parâmetros de motilidade pré-congelação (total e progressiva) e motilidade (total e progressiva) e integridade de membrana pós-descongelação. Também foi realizado um estudo preliminar de fertilidade entre o meio INRA82® com gema de ovo e o meio INRA82® com fosfatidilcolina de soja, não havendo diferença significativa entre os meios (55% vs. 36%), porém vale destacar que o número de inseminações realizadas para ambos os grupos foi extremamente baixo ($n = 11$). Como conclusão, verificou-se que ambos os diluentes quimicamente definidos (INRA82® com fosfatidilcolina de soja e com fosfatidilcolina de ovo) apresentaram-se comparáveis ao INRA82® convencional na preservação da motilidade e viabilidade espermática. Além disso, os espermatozóides criopreservados no meio INRA82® com fosfatidilcolina de soja foram capazes de efetuar a fertilização. Portanto, os dois diluentes quimicamente definidos mostraram ser alternativas viáveis ao meio INRA82® composto com gema de ovo para congelação de sêmen eqüino.

3) OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo testar a eficiência da congelabilidade e fertilidade do diluidor Botu-Crio® (Biotech Botucatu, Brasil), em que a gema de ovo foi substituída pela lecitina de soja.

3.1) Hipótese: a lecitina de soja apresenta a mesma eficácia da gema de ovo na manutenção da viabilidade de sêmen criopreservado eqüino.

4) MATERIAL E MÉTODOS

As atividades experimentais deste trabalho foram desenvolvidas no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ-UNESP-Botucatu e no Haras Agromen, Orlândia – São Paulo no período de janeiro à maio de 2007 e outubro de 2007 à 10 março de 2008.

4.1) Animais

Para a congelação e análises do sêmen nos experimentos I e II foram utilizados 27 garanhões com idade entre 5 e 15 anos, pertencentes ao Haras Agromen, Orlândia – São Paulo e FMVZ- UNESP - Botucatu.

4.1.1) Colheita de sêmen

O sêmen foi colhido com a utilização de vagina artificial modelo Botucatu (Biotech®, Botucatu, Brasil), usando a metodologia de colheita fechada, com a temperatura da vagina artificial em torno de 40°C e a utilização de uma égua no cio, devidamente contida.

4.1.2) Análise e Processamento do sêmen a fresco

Após as colheitas, o sêmen foi imediatamente filtrado, para retirada da fração gel, e posteriormente foram analisados os parâmetros de volume, cor, aspecto, motilidade total óptica, vigor espermático e concentração através de câmara de Neubauer.

A análise da motilidade foi realizada segundo a metodologia descrita por Krause (1966) Malmgren (1997), que consiste na deposição de uma gota de sêmen sobre uma lamina histológica aquecida a 37°C, recobrimo-a com uma lamínula (22 x 22mm) e sendo a motilidade avaliada com auxílio de um microscópio de luz com contraste de fase sob o aumento de 200X. O resultado foi emitido em percentual (0 a 100%), além da motilidade a qualidade e a intensidade do movimento espermático denominado vigor também pode ser avaliado e sendo os resultados emitidos em escala de 0 a 5.

A concentração foi inferida com auxílio de uma câmara de Neubauer e microscópio óptico de contraste de fase, sob o aumento de 200X, utilizando o fator de diluição de 1 parte de sêmen para 19 partes de água destilada. O número de espermatozóides contados foi multiplicado por 1000 e expressos em número de espermatozóides por milímetro cúbico (mm^3).

Após as avaliações o sêmen foi diluído em meio diluente de centrifugação a base de leite desnatado Botu-Semen[®], na proporção de uma parte de sêmen para uma parte de meio diluente para centrifugação (1:1). Duas amostras de sêmen foram centrifugadas a uma força de centrifugação de 600xg por 10 minutos.

O sobrenadante das amostras foi desprezado e os *pellets* ressuspensos com dois meios de congelação: Botu-crio[®] com gema de ovo (BC) e botucio com lecitina de soja (BCLS), segundo os experimentos I e II.

As amostras de sêmen foram acondicionadas em palhetas de 0,5 ml em uma concentração de 100 milhões de espermatozóides por palheta (200 milhões de espermatozóides/ mL), sendo em seguida as palhetas colocadas em geladeira comercial da Minitüb do Brasil na temperatura de 5°C, as quais permaneceram por um período 20 minutos.

Posterior a período de estabilização em geladeira, as palhetas foram colocadas a seis cm do nível do nitrogênio em caixa de isopor de aproximadamente 40 litros, por um período de 20 minutos e após este período as mesmas foram imersas no nitrogênio líquido e estocadas em botijão criobiológico para posterior análise.

4.1.3) Descongelação do Sêmen

As palhetas foram descongeladas em banho-maria, a 46°C por 20 segundos, segundo técnica descrita por Papa & Dell'Aqua Jr (2001).

Após descongeladas, as amostras foram avaliadas através da análise computadorizada da motilidade (CASA - Hamilton Thorn – HTM-IVOS 12 – Anexo I). Os parâmetros avaliados foram os de motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) expressos em percentagem, VAP (velocidade espermática ao longo de uma trajetória média, expresso em $\mu\text{m}/\text{segundos}$),

VSL (velocidade espermática considerando-se uma trajetória retilínea com origem no primeiro ponto analisado e final no último, expresso em $\mu\text{m}/\text{seg.}$), VCL (velocidade espermática real, expresso em $\mu\text{m}/\text{seg.}$), LIN (linearidade, expresso em percentagem), Rápidos (percentual de espermatozóides rápidos).

Utilizaram-se as sondas Diacetato de Carboxifluoresceína e o Iodeto de Propídio, segundo a técnica descrita por Harrison & Vickers (1990) e modificada por Zúccari (1998). Uma alíquota de sêmen de 10 μl foi diluída em 40 μl da solução de trabalho, preparada a partir de uma solução de estoque. A avaliação foi realizada com o auxílio de um microscópio de epifluorescência (BX 60, Olympus América INC, através de excitação em filtro BW) sob aumento de 400X. Foram contadas 200 células em uma mesma lâmina e classificadas como integras e lesadas, conforme sua coloração.

Íntegros = Espermatozóides corados em verde, em toda sua extensão.

Lesados = Espermatozóides corados em vermelho.

5) TESTE DE FERTILIDADE

Para avaliação de fertilidade, as éguas foram monitoradas diariamente por palpação retal e ultra-sonografia até a detecção de um folículo de diâmetro de 35mm, sendo posteriormente aplicado, por via intramuscular, 1,0 mg de acetato de deslorelina. Após 36 horas da indução da ovulação as éguas foram inseminadas pré-ovulação e com 48 horas já ovuladas inseminadas pós-ovulação na extremidade do corno uterino ipsilateral ao ovário que apresentava o folículo ovulatório.

6) ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para esse estudo foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, no qual os ejaculados foram considerados repetições e os protocolos de processamento do sêmen (diferentes diluidores) foram considerados os tratamentos.

Para a análise estatística das características avaliadas, foi empregado o pacote estatístico Statistical Analysis System (SAS) – versão 5.0 (1996). Para tanto realizou-se a seguinte seqüência de análises:

1- A consistência dos dados e a análise descritiva (médias e desvio-padrão) das características de interesse ao estudo foram realizadas mediante o emprego do PROC MEANS.

2- As variáveis estudadas (MT, MP, VAP, VCL, VSL, ALH, STR, LIN e integridade de membrana) foram comparadas entre os diferentes grupos experimentais, por meio do PROC GLM, utilizando-se para tanto o teste de Student Newman Keuls (SNK), com nível de probabilidade de cinco por cento.

7) DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

7.1) Experimento I

Objetivou-se testar o diluidor Botu-Crio® (composto a base de gema de ovo), em comparação ao BCLS45 (substituição da gema de ovo por 45g/L de lecitina de soja¹). Após a descongelação avaliou-se os parâmetros espermáticos pela análise computadorizada (HTM – IVOS 12), e percentagem de células com membrana plasmática íntegra através de microscopia de epifluorescência, bem como teste de fertilidade. Foram utilizados um ejaculado de 15 garanhões para os testes laboratoriais.

Para fertilidade foram utilizadas éguas 29 éguas com idade entre 5 e 7 anos, com histórico de fertilidade conhecido e um garanhão da raça Westfalen de 12 anos de idade, com fertilidade comprovada com sêmen congelado. Foram realizadas 12 inseminações com sêmen congelado com o diluente Botu-Crio e 17 com o BCLS45.

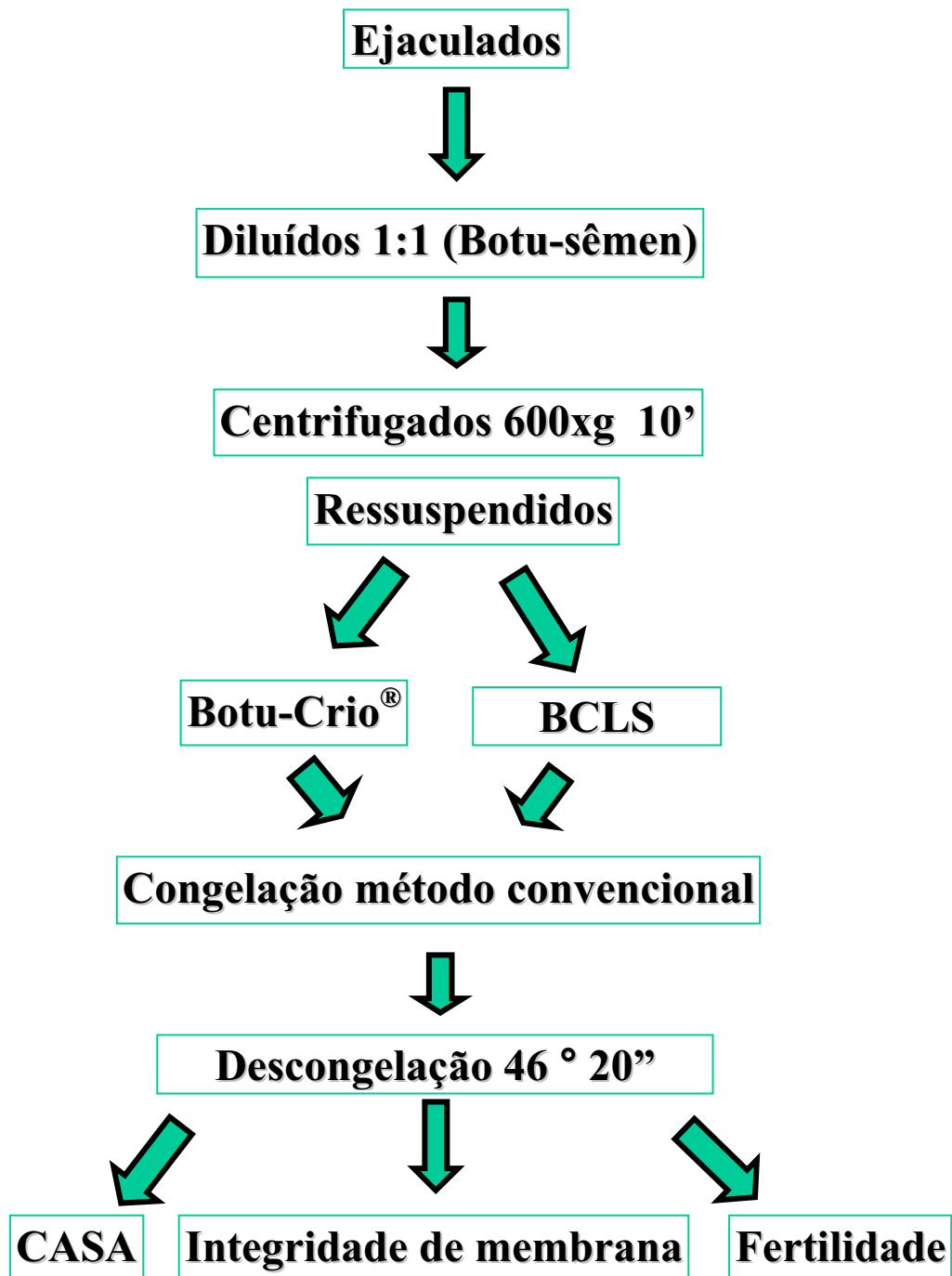
7.2) Experimento II

Neste experimento objetivou-se testar o diluidor Botu-Crio® (composto a base de gema de ovo), em comparação ao BCLS com diferentes concentrações de lecitina de soja: 10,0; 12,5; 15,0; 17,5 e 20,0g/L (BCLS10; BCLS12,5; BCLS15; BCLS17,5 e BCLS20 respectivamente). Foram utilizados um ejaculado de 10 garanhões para os testes laboratoriais.

¹ Sigma P5638 (L- α -Phosphatidylcholine from soybean, Type II-S)

Para o teste de fertilidade utilizou-se 6 ejaculados de um garanhão da raça Trakener e foram realizadas inseminações comparativas entre BC e BCLS20, sendo utilizadas 12 éguas com BC vs 10 éguas com BCLS20. Também comparou-se os diluente BC com o BCLS10, no qual foram utilizados 4 ejaculados de um garanhão da raça Westfalen e foram inseminadas 8 éguas com Botu-Crio vs 12 éguas com BCLS10.

Organograma dos Experimentos I e II



8) Resultados

8.1) Experimento I

Os resultados dos parâmetros espermáticos: Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), VAP (velocidade de trajeto), VCL (velocidade curvilínea), VSL (velocidade real) analisados pelo CASA, bem como a integridade da membrana plasmática (IMP) analisada pela microscopia de epi-fluorescência, de amostras congeladas com os diluentes Botu-Crio e Botu-Crio Com*, encontram-se na Tabela 1.

Não foram observadas diferenças estatísticas ($p>0,05$), quando se comparou os resultados dos parâmetros espermáticos e a integridade da membrana plasmática, dos diluentes testados.

Tabela 1: Valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos pós-descongelação nos diluentes Botu-Crio® e Botu-Crio com 45g/L de Lecitina de Soja (BCLS45)

Parâmetro	Botu-Crio®	BCLS45
MT (%)	61,4±16,2	61,4±15,9
MP (%)	27,0±9,8	26,7±10,6
VAP (µm/s)	92,6±13,3	97,1±13,8
VCL (µm/s)	167,5±21,7	176,3±22,9
VSL (µm/s)	73,0±8,8	75,0±10,3
ALH (µm)	6,7±0,5	6,0±0,4
STR (%)	78,1±5,2	77,0±2,4
LIN (%)	46,2±5,1	43,3±1,9
IMP (%)	53,4±11,5	57,4±7,0

($p>0,05$)

MT (Motilidade Total), MP (Motilidade Progressiva), VAP (Velocidade de Trajeto), VCL (Velocidade Curvilínea), VSL (Velocidade Linear), ALH (Amplitude Lateral de Cabeça), STR (Retilinearidade), LIN (Linearidade), IMP (Integridade da Membrana Plasmática).

8.2) Experimento II

Tabela 2: Valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos pós-descongelamento nos diluentes Botu-Crio® e Botu-Crio com diferentes concentrações de Lecitina de Soja

Parâmetro	Botu-Crio®	BCLS10 ¹	BCLS12,5 ²	BCLS15 ³	BCLS17,5 ⁴	BCLS20 ⁵
MT (%)	68,1±15,9	65,8±13,5	65,9±17,6	67,6±11,2	64,0±15,3	60,5±15,3
MP (%)	28,8±9,2	29,8±9,8	29,6±9,7	31,4±8,2	30,2±10,5	26,6±11,5
VAP (µm/s)	95,4±9,2	110,1±12,7	105,4±12,2	106,7±11,5	111,5±12,3	105,7±13,1
VCL (µm/s)	174,7±11,9 ^b	200,7±18,2 ^a	195,9±20,0 ^{ab}	196,2±19,6 ^{ab}	204,2±19,1 ^a	196,5±32,3 ^{ab}
VSL (µm/s)	74,0±7,0 ^b	84,8±9,8 ^{ab}	81,0±7,1 ^{ab}	81,9±7,9 ^{ab}	86,0±8,6 ^a	78,9±8,7 ^{ab}
ALH (µm)	7,0±0,5	7,3±0,6	7,4±0,5	7,4±0,5	7,6±0,7	7,5±0,4
STR (%)	76,9±3,2	76,7±2,7	76,5±3,2	76,4±1,9	77,0±3,8	74,6±3,5
LIN (%)	43,2±2,9	43,0±1,8	42,3±1,3	42,6±1,3	43,3±1,9	41,6±1,9
IMP (%)	50,7±10,3	47,5±8,5	46,6±12,2	49,9±8,8	46,1±10,3	43,6±10,9

^{ab} Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si (p<0,05)

¹BCLS10 (Botu-Crio 10g/L de lecitina de soja); ²BCLS12,5 (Botu-Crio Com, 12,5g/L de lecitina de soja);

³BCLS15 (Botu-Crio Com, 15g/L de lecitina de soja); ⁴BCLS17,5 (Botu-Crio Com, 17,5g/L de lecitina de soja);

⁵BCLS20 (Botu-Crio Com, 20g/L de lecitina de soja)

MT (Motilidade Total), MP (Motilidade Progressiva), VAP (Velocidade de Trajeto), VCL (Velocidade Curvilínea), VSL (Velocidade Linear), ALH (Amplitude Lateral de Cabeça), STR (Retilínea), LIN (Linearidade), IMP (Integridade da Membrana Plasmática).

9) Teste de fertilidade

Os resultados de fertilidade dos experimentos I e II encontram-se dispostos nas tabelas 3, 4 e 5 .

Tabela 3: Taxas de gestação de éguas inseminadas com sêmen congelado com Botu-Crio e BCLS (45g/L lecitina de soja)

	Botu-Crio	BCLS/45
IA (n)	8/12	3/17
Fert. (%)	66,0 ^a	17,0 ^b

^{ab}Letras diferem entre si (p<0,01)

Tabela 4: Taxas de gestação de éguas inseminadas com sêmen congelado com Botu-Crio e BCLS (20g/L lecitina de soja)

	Botu-Crio®	BCLS/20
IA (n)	8/12	4/10
Fert. (%)	66,0	40,0

(p>0,05)

Tabela 5: Taxas de gestação de éguas inseminadas com sêmen congelado com Botu-Crio e BCLS (10g/L lecitina de soja)

	Botu-Crio	BCLS/10
IA (n)	6/8	5/12
Fert. (%)	75,0	41,0

(p>0,05)

10) DISCUSSÃO

O desenvolvimento de meios diluidores sem a presença de componentes de origem animal tem sido a grande preocupação de pesquisadores das mais diversas regiões do mundo. Essa preocupação deve-se ao fato de possíveis contaminações microbiológicas e como consequência a introdução de doenças exóticas em rebanhos de abrangência nacional e internacional.

Na maioria dos meios encontra-se o leite e/ou a gema de ovo como fonte de lipoproteínas com o intuito de proteger os espermatozóides de danos causados pelo choque térmico (Cotorello & Henry, 2002; Aurich, 2005). No entanto, têm sido levantadas algumas questões quanto à utilização de tais compostos, como por exemplo: grande variação entre os lotes de matéria-prima (leite e ovo), dificuldades ou mesmo impossibilidade de obtenção de certificados de qualidade; necessidade de utilização de matéria-prima livre de contaminação (ex.: ovos SPF). Outros citam riscos de contaminação microbiológica com os efeitos subseqüentes relacionados a introdução de doenças exóticas em rebanhos ou países e a produção de endotoxinas deletérias à capacidade fertilizante dos espermatozóides; e maiores exigências na estocagem dos produtos associadas às condições específicas necessárias para manutenção da integridade dos constituintes do meio (Batellier et al., 1997; Bousseau et al., 1998; Aires et al., 2003; Gil et al., 2003; Ricker et al., 2006).

Os resultados encontrados nos experimentos I e II possibilitam observar que o diluidor BCLS foi tão eficiente quanto o BC na congelação de sêmen eqüino, demonstrando que a gema de ovo pode ser substituída pela lecitina de soja na composição do diluente de congelação mantendo a qualidade espermática, concordando os achados nas espécies: bovina Aires et. al. (2003), Gil et al.(2000), Hinsch et. al. (1997), ovina Bittencourt et. al. (2007a) Gil et al. (2003) caprina Bittencourt et. al. (2007b) e equina Rickers et. al. (2006). Contrariamente, diversos autores não obtiveram melhoria nos parâmetros espermáticos com a presença da lecitina de soja, conforme pode ser constatado pelos achados de DeLeeuw et. al. (1993), Thun et. al. (2002) e Celeghini et. al. (2008). Já Dell'Aqua Jr. et. al. (2007) observaram resultados

superiores do diluente com lecitina de soja em comparação ao meio tradicional Tris-gema.

Quando comparamos os resultados laboratoriais dos experimentos I e II do presente trabalho observamos que os mesmos encontram-se em consonância com os de Rickers et. al. (2006), os quais avaliaram o efeito da substituição da gema de ovo no meio de congelação para sêmen eqüino INRA82[®] pela fosfatidilcolina de soja e fosfatidilcolina de ovo. Estes autores não encontraram diferenças significativas entre os meios INRA82[®] com gema de ovo, INRA82[®] com fosfatidilcolina de soja e INRA82[®] com fosfatidilcolina de ovo quanto aos parâmetros de motilidade pré-congelação (total e progressiva) e motilidade (total e progressiva) e integridade de membrana pós-descongelação.

Tal semelhança tem estimulado o desenvolvimento de novas pesquisas voltadas para a remoção da gema de ovo, que a despeito de conter em sua composição substâncias lipoproteicas que estabilizam as membranas (Watson,1990), De Leeuw et al.(1993), Holt (2000) Vishwanath & Shannon (2000), a mesma pode ainda promover ações tóxicas (Bedfor et. al. (1995), como também um veiculador de agentes contaminantes (Gil et al. 2003).

Com base em informações do fabricante, o diluente BC é composto de vários aminoácidos combinados, o que pode ter fornecido aos espermatozóides uma ação crioprotetora ao BCLS com diferentes concentrações de lecitina de soja, durante o processo de congelação. Esta ação benéfica por parte dos aminoácidos foi relatada por Kundu et al. (2001) quando congelaram espermatozóides da cauda de epididimo da caprinos e concluíram que os aminoácidos são moléculas eletricamente carregadas e interagem eletrostaticamente com os grupos fosfatos da membrana plasmática, formando uma camada DNA superfície dos espermatozóides, melhorando a ação dos crioprotetores.

No experimento I foi utilizado uma concentração de 45g/L de lecitina de soja substituindo a gema de ovo no diluente BC. Para conseguir esta concentração foram realizados inúmeros pré-experimentos e somente com essa quantidade do produto obteve-se porcentagens de motilidade total e progressiva e integridade da membrana plasmática em níveis razoáveis. A

partir dos resultados laboratoriais alcançados foi planejado o experimento I e realizadas inseminações artificiais. Quando foram comparadas as taxas de prenhes entre o BC e BCLS45 observou-se uma superioridade do diluente comercial, como havia sido constatado na espécie bovina por DeLeeuw et. al. (1993) e inferiores aos de Rickers et. al. (2006), a despeito de não ter sido relatado as concentrações de fosfatidilcolina utilizadas por esses autores.

Com base nos baixos índices de fertilidade do experimento I, optou-se pela comparação de concentrações decrescentes de lecitina de soja, sendo estas compreendidas entre 10 e 20g/L de lecitina de soja, reproduzindo os mesmos resultados laboratoriais obtidos com o BCLS45 em comparação ao BC. Isso evidenciou que a diminuição da concentração da substância química de 45 para 10g/L não alterou os resultados *in vitro* na congelabilidade de sêmen eqüino. O teste de fertilidade foi baseado na semelhança entre os parâmetros de motilidades total e progressiva, bem como da integridade da membrana plasmática entre as diferentes concentrações de lecitina de soja levando a escolha dos extremos: BCLS20 e BCLS10. A redução da concentração de lecitina de soja viabilizou um incremento na fertilidade tanto para o diluente BCLS20 (40%) e como para o BCLS10 (41%), sendo semelhantes aos obtidos com o BC (66% e 75%). Esses resultados se assemelham aos encontrados nas espécies: bovina com Bosseau et. al.(1998), Gil et.al. (2000), Hinsh et. al. (1997), Aires et. al. (2003), Van Wagtendonk-DeLeeuw et. al. (2000), Thun et. al. (2002), Gil et.al. (2003), em equinos (RICKERS et. al. 2006).

Com relação aos baixos resultados alcançados com BCLS45 em comparação ao BC, isto pode estar relacionado segundo De Leeuw et. al. (1993) por uma maciça aderência de lipídeos da lecitina de soja na superfície da membrana plasmática devido a alta concentração da substância no meio diluidor, bem como as modificações da composição da própria membrana ou mesmo uma forte interação dos lipídios presentes na lecitina de soja com a membrana espermática durante o processo de congelação e descongelação (et al. 2006). A alta concentração desses lipídeos da lecitina de soja provavelmente inibe os fatores ligados ao processo de capacitação, como foi observado por Zahn et. al. (2002) que realizaram um experimento utilizando a incorporação do colesterol na membrana de espermatozóides eqüinos por meio

da ciclodextrina. Neste experimento observaram que as amostras incubadas em colesterol não foram capazes de sofrer a reação acrossomal induzida e que a fertilidade destas amostras foi muito reduzida, quando comparadas com amostras controle não incubadas em colesterol (75%vs25%), resultados estes muito próximos dos obtidos no presente trabalho quando testados o BC e BCLS45 respectivamente.

Com relação aos índices de fertilidade obtidos com os meios BCLS20 e BCLS10, pode-se hipotetizar que as concentrações utilizadas não apresentaram a ação crioprotetora esperada na membrana espermática apesar destes lipídeos promoverem uma barreira física contra crioinjúrias, visto que esses lipídeos do diluente, segundo Rickers et. al. (2006), apresentam a capacidade de revestirem a membrana espermática, sem contudo haver uma interação destes com os lipídeos da membrana plasmática.

Assim como Rickers et. al. (2006) e com base no presente estudo novas investigações deverão ser realizadas para aprimorar os resultados de fertilidade com os meios com lecitina de soja de modo a se assemelharem com os obtidos com diluentes convencionais contendo gema de ovo.

Deste modo, com base nos resultados apresentado, o desenvolvimento de um diluente a base de lecitina de soja pode ser uma alternativa aos diluentes convencionais contendo leite e/ou gema de ovo. No entanto, a despeito de não haver diferenças na fertilidade dos diluentes BCLS20 e BCLS10 quando comparados ao BC, estes índices podem e devem ser melhorados, através de estudos que possam não só encontrar a concentração ideal de lecitina de soja como também um produto a base de soja ou similar que contenha nacional e principalmente internacionalmente substâncias lipoprotéicas capazes de substituir as da gema de ovo ou leite e como consequência índices de fertilidade similares.

11) CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente experimento, pode-se concluir:

- 1- Com relação aos parâmetros espermáticos pós-descongelação, não foram observadas diferenças entre o diluente Botucrio contendo gema de ovo e as amostras com diferentes concentrações de lecitina de soja.
- 2- A taxa de prenhes com sêmen congelado com BC foi superior as amostras congeladas com BCLS contendo 45g/L de lecitina de soja.
- 3- Não foram observadas diferenças entre as taxas de prenhes Botucrio com gema de ovo (BC) quando comparadas com amostras congeladas com baixas concentrações de botucrio lecitina de soja 10% (BCLS 10) e 20% (BCLS 20%).

12) Consideração Final

Novas pesquisas deverão ser desenvolvidas para que os diluentes a base de lecitina de soja possam apresentar resultados equivalentes aos obtidos com os diluentes convencionais com gema de ovo.

13) BIBLIOGRAFIA

AIRES, V.A.; HINSCH, K-D.; MUELLER-SCHLOESSER, F.; BOGNER, K.; MUELLER-SCHLOESSER, S.; HINSCH, E In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology**, v. 60, p. 269-279, 2003.

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 105-113, 2005.

AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Principals of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **J Equine Vet Science**, v.7, p.145-73, 1987.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 65-75, 2005.

BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **J. Andrology**, v.22 (6), p.1061-1069, 2001

BATELLIER, F.; MAGISTRINI, M.; FAUQUANT, J.; PALMER, E. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 48, p. 391-410, 1997.

BEDFORD, S.J., JASKO, D. J., GRAHAM, J. K., AMANN, R. P., SQUIRES, E. L., PICKETT, B. W. Effect of seminal extenders containing egg yolk and glycerol on motion characteristics and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.43 (5), p.955-967, 1995.

BITTENCOURT, R.F.; BICUDO, S.D.; RIBEIRO FILHO, A. de L.; GUSMÃO, A.L.; VASCONCELOS, M.F.; BISCARDE, C.E.A.; SIQUEIRA, J.B.; OBA, E. O efeito de um quelante de cálcio, de um surfactante e da lecitina de soja sobre a viabilidade do sêmen ovino criopreservado. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, Suplemento 3, v.35, p. 1000, 2007a.

BITTENCOURT, R.F.; BICUDO, S.D.; RIBEIRO FILHO, A. de L.; CHALHOUB, M.; VASCONCELOS, M.F.; BISCARDE, C.E.A.; SIQUEIRA, J.B.; ALVES, S.G.G.; OBA, E. Viabilidade do sêmen caprino criopreservado em diluidores contendo surfactante, quelante de cálcio e lecitina de soja. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, Suplemento 3, v.35, p. 998, 2007b.

BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J.P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GUÉRIN, B.; CAMUS, A.; LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, v. 50, p. 699-706, 1998.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; RODRIGUES, P.H.M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 119-131, 2008.

COTTORELLO, A.C.P.; HENRY, M. Princípios da criopreservação, congelação e avaliação do sêmen eqüino (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p. 14-25, 2002.

DE LEEUW, F.E., DE LEEUW, A.M., DEN DAAS, J.H.G, COLENBRANDER, B., VERKLEIJ, A.J. Effects of various crioprotective agents and membrana-stabilizing compounds on bull sperm membrana integrity alter cooling and freezing. **Cryobiology**, v.30 p.32-44, 1993,

DELL'AQUA JR, Jose Antonio ; PAPA, F. O. ; ALVARENGA, Marco Antonio ; ZAHN, Fabíola Soares . Effect of warming rate on sperm parameters and of insemination site and dose on the fertility of equine frozen semen.. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 344-345, 2001.

DELL'AQUA JUNIOR, J.A.; PAPA, F.O.; FREITAS, C.P.; ALVARENGA, M.A.; MELO, C.M.; CRESPILO, A.; SIQUEIRA FILHO, E.R.; ALBERTI, K.; DE VITA, B.; BARCELLOS, G.; MEDEIROS, A.S.L. Nova proposta de diluidor para sêmen bovino quimicamente definido. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, Suplemento 3, v.35, p. 1001, 2007.

FOULKES, J.A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on motility and integrity of bovine spermatozoa. **J. Reprod. Fert.** v.49, p.277-284, 1977.

GAO, D.; CRITSER, J.K. Mechanisms of cryoinjury in living cells. **ILAR Journal**, v.41(4), p.187-196, 2000.

GIL, J. JANUSKAUSKAS, A.; HAARD, M.Ch.; et al. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-Plus and Tryladil. **Reproduction in Domestic Animals**, v.35, p.69 – 77, 2000.

GIL, J., RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M., LUNDEHEIM, N., SÖDERQUIST, L., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial insemination, **Theriogenology**, v.59 (5-6), p.1157-1170, 2003.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.12, n.1, p.131-147, 1996.

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.343-52, 1990.

HINSCH, E.; HINSCH, K-D.; BOEHM, J.G.; SCHILL, W-B.; MUELLER-SCHLOESSER, F. Functional parameters and fertilization success of bovine semen cryopreserved in egg-yolk free and egg-yolk containing extenders. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 32, p. 143-149, 1997.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**. v. 53, p. 47-58, 2000.

KATILA, T. Procedures for handling fresh stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, p. 1217-1227, 1997.

KUNDU, C.N.; DAS, K.; MAJUMDER, G.C. Effect of amino acid on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using chemically defined model system. **Cryobiology**, v.41, p.21-27, 2001.

LANDFELD, A., RUDOLF, Z., MILAN, H., KAREL, K., PAVLA, N. **Residence Time Distribution during Egg Yolk Pasteurisation** *Czech J. Food Sci.* v. 20, No. 5: 193–201, 2002.

MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M.; CARMO, M.T.C.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v.58, p.273-276, 2002.

MELO, C.M., ZAHN, F. S., MARTIN, I., ORLANDI, C., DELL'AQUA JUNIOR, J. A., ALVARENGA, M. A., PAPA, F.O. Influence of semen storage and cryoprotectant on post-thaw viability and fertility of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.27, p.171 - 175, 2007.

MORAN, D.M. Effects of cooling rate and storage temperature on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Fort Collins, 1992. Dissertação (Mestrado) – Colorado State University.**

POLGE, C.; SMITH, A.V.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v.164, p.666, 1949.

RICKER, J.V.; LINFOR, J.J.; DELFINO, W.J.; KYSAR, P.; SCHOLTZ, E.L.; TABLIN, F.; CROWE, J.H.; BALL, B.A.; MEYERS, S.A. : Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. **Biology of Reproduction**, v. 74, p. 359-365, 2006.

ROSSI, T.C., PAPA, F.O., SANTOS, T.B., MACEDO, L.P., ALVARENGA, M.A., MELO, C.M., DELL'AQUA Jr., J.A. Efeito da utilização de diferentes crioprotetores e suas associações no processo de congelamento de sêmen equino com meio MP50. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.350-352, 2003.

SAS. User's guide: Statistics, version 5. Cary: SAS Institute Inc., 1996. 956p.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. **Cooled and frozen stallion semen**. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, Bulletin nº9, 1999.

THUN, R.; HURTADO, M.; JANETT, F. Comparison of Biociphos-Plus® and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. **Theriogenology**, v. 57, p. 1087-1094, 2002.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M.; HARING, R.M.; KAAL-LANSBERGEN, L.M.T.E.; DEN DAAS, J.H.G. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. **Theriogenology**, v. 54, p. 57-67, 2000. (A.M. van Wagtendonk-de Leeuw, R.M. Haring, L.M.T.E. Kaal-Lansbergen and J.H.G. den Daas)

VARNER, D.D. Approaches to cryopreservation of equine semen. Current techniques for semen cryopreservation and new investigative strategies that may improve performance of cryopreserved semen from a higher percentage of stallions. **Congresso Nazionale Multisala SIVE, 9., 2003, PISA**. Disponível em: <<http://www.ivis.org>>. Acesso em: 14 set. 2006.

VISHWANATH, R. & SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v.62,p.23-53, 2000.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.481-492, 2000.

ZAHN, F. S. ; Papa, F.O. ; Dell'Aqua Jr., J.A. . Cholesterol incorporation on equine sperm membrane: effects on post-thaw parameters and fertility. **Theriogenology**, Estados Unidos, v. 58, p. 237-240, 2002.

ZÚCCARI, C.E.S.N. Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina. Botucatu, 1998. 121p. **Tese (Doutorado)** - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

ANEXOS

Anexo I

AJUSTE DO HTMA-IVOS-10 PARA ANÁLISE SEMINAL EM EQUÍNOS

CARACTERÍSTICAS	AJUSTE
Número de pontos examinados	30
Contraste das células em relação ao campo	60 pixels
Tamanho mínimo da célula	3 pixels
Contraste para células imóveis	30 pixels
Limite inferior para índice retilíneo	80 %
Referência para velocidade média (VAP)	<70 $\mu\text{m/s}$
Referência para velocidade lenta (VAP)	<30 $\mu\text{m/s}$
Referência para velocidade lenta (VSL)	<20 $\mu\text{m/s}$
Limite inferior de tamanho	0,62 pixels
Limite superior de tamanho	2,98 pixels
Limite inferior de intensidade	0,24
Limite superior de intensidade	1,19
Limite inferior de alongamento	0%
Limite superior de alongamento	100%
Lentos contados como móveis	Não
Magnificação	1,95

Anexo II

PREPARO DAS SONDAS FLUORESCENTES

Solução de estoque das sondas fluorescentes

Soluções	Constituintes	Quantidade
Estoque IP	Iodeto de Propídeo ¹	10mg
	Solução fisiológica	20mL
Estoque CFDA	Diacetato	de 9,2mg
	carboxifluoresceína ²	
	DMSO	20mL
Estoque de Formaldeído	Formalina a 40%	1mL
	Solução fisiológica	79mL
Estoque de citrato de Sódio	Citrato de sódio	3g
	Solução fisiológica	100mL

¹ P 4170 - Sigma

² C 5041 – Sigma

Solução de trabalho

Solução	Quantidade
Solução de Citrato de Sódio 3%	0,96mL
Solução de formaldeído	10 μ L
Solução de Iodeto de Propídeo	10 μ L
Solução de Carboxifluoresceína	20 μ L