

## USO DE LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE E DE GEMA DE OVO NA PRESERVAÇÃO DO SÊMEN ASININO RESFRIADO A 6°C\*

Maria Isabel Vaz de Melo<sup>1+</sup>, Yolanda de Fátima Resende<sup>2</sup>, Elton Pavão Rezende<sup>2</sup>, Paola Pereira das Neves Snoeck<sup>3</sup>, Daniel de Moura Lima Gomes<sup>2</sup>, Tharley Teixeira Cardoso Carvalho<sup>2</sup>, Alan Vinícius Duarte Silva<sup>2</sup>, Mariana Machado Neves<sup>4</sup>, Danilo Gonçalves Bastos<sup>5</sup> e Marc Roger Jean Marie Henry<sup>6</sup>

**ABSTRACT.** de Melo M.I.V., Resende Y. de F., Rezende E.P., Snoeck P.P. das N., Gomes D. de M.L., Carvalho Th.T.C., Silva A.V.D., Neves M.M., Bastos D.G. & Henry M.R.J.M. [**Low density lipoprotein and egg yolk to preserve cooled donkey sêmen**]. Uso de lipoproteínas de baixa densidade e de gema de ovo na preservação do sêmen asinino resfriado a 6° C. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 34(4):288-294, 2012. Departamento de Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Unidade Betim, Rua do Rosário, 1081, Bairro Angola, Betim, MG 32604-115, Brasil, E-mail: bel.melo@terra.com.br

The aim of this study was to evaluate the characteristics of cooled asinine sperm. Six Pêga donkeys were used. Semen was diluted 1:3 in extenders: D1 - Botusêmen®; D2 - Botusêmen® + 10% egg yolk; D3 - Botusêmen® + 10% egg yolk, centrifuged at 800 X g for 15'; D4 - Botusêmen® + 6.8% low density lipoprotein of egg yolk. The diluted semen was submitted to the cooling rate of 0.65° C / minute to achieve 5°C. It was transported and kept in a trade refrigerator at 6° C for three days. It was used the computerized system sperm analysis (CASA) to assess the characteristics of sperm every 24 hours of the cooling period. D3 (Botusêmen + egg yolk - centrifuged) was superior compared to other extenders studied the preservation of sperm characteristics, increasing storage time, mainly distinguished themselves in the percentage of motile sperm, rapidly speed, rectilinear and curvilinear velocity of displacement.

**KEY WORDS.** Donkey semen, egg yolk, milk, LDL, cooled.

**RESUMO.** O objetivo deste experimento foi avaliar o espermatozóide asinino resfriado mantido em diferentes diluidores. Foram utilizados neste experimento seis jumentos da raça Pêga. O sêmen foi diluído 1:3 nos diluidores: D1 - Botusêmen®; D2 - Botusêmen® + 10 % de gema de ovo; D3 - Botusêmen® + 10 % de gema de ovo, centrifugado a

800 X g por 15 minutos; D4 - Botusêmen® + 6,8 % LDL. O sêmen assim diluído foi submetido à curva de resfriamento de 0,65°C/ minuto até alcançar 5°C. Foi transportado e mantido em geladeira comercial a 6°C por três dias. Utilizou-se o sistema computadorizado CASA (computer assisted sperm analysis) para avaliar as características espermáticas a cada

\*Recebido em 13 de fevereiro de 2012.

Aceito para publicação em 17 de agosto de 2012.

<sup>1</sup> Médica-veterinária, D.Sc. Departamento de Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Unidade Betim, Rua do Rosário, 1081, Bairro Angola, Betim, MG 32604-115, Brasil. \*Autor para correspondência. E-mail: bel.melo@terra.com.br

<sup>2</sup> Curso de Medicina Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Unidade Betim, Rua do Rosário, 1081, Bairro Angola, Betim, MG 32.604-115.

<sup>3</sup> Médica-veterinária, D.Sc. Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus-Itabuna, Km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45650-000, Brasil. E-mail: paolasnoeck@uesc.br

<sup>4</sup> Médica-veterinária, DSc. Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs s/n, Campus Universitário, Viçosa, MG 36570-000. E-mail: mmachadoneves@yahoo.com.br

<sup>5</sup> Analista de sistemas. Unidade de Processamento de Dados, Departamento de Zootecnia, Escola de Veterinária (EV), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos 6627, Caixa Postal 567, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brasil. E-mail: danilobg2005@yahoo.com.br

<sup>6</sup> Médico-veterinário, Dr.Med.Vet., EV, UFMG, Av. Antônio Carlos 6627, Caixa Postal 567, Belo Horizonte, MG 31270-901. E-mail: henrym2601@gmail.com.

24 horas do período de resfriamento. O diluidor 3 (Botusêmen + gema de ovo - centrifugado) sobressaiu em relação aos outros diluidores estudados na preservação das características espermáticas, à medida em que se aumentou o tempo de armazenamento, se destacando principalmente no percentual de espermatozoides móveis, com velocidade rápida de deslocamento e com velocidade curvilínea e retilínea de deslocamento.

**PALAVRAS-CHAVE.** Sêmen asinino, gema de ovo, leite, LDL, resfriamento.

## INTRODUÇÃO

A espécie asinina tem se tornado ao longo dos anos um importante nicho do mercado agropecuário, na produção tanto de jumentos como principalmente de muaras. Reconhece-se assim seu valor histórico, e a necessidade da evolução nas pesquisas e trabalhos em seu âmbito reprodutivo.

São poucos os trabalhos e pesquisas relacionados ao resfriamento do sêmen na espécie asinina. Em sua maioria são empregadas metodologias para o processamento do sêmen equino, que além de ser o mais próximo do asinino, foi até hoje o mais pesquisado e há mais tempo trabalhado.

O processo de resfriamento do sêmen asinino ainda apresenta questões não definidas no que se refere ao efeito da centrifugação, macromolécula constituinte do diluidor, base do antibiótico utilizado, curva de resfriamento deve ser lenta ou rápida, entre outras. Importante busca se refere à macromolécula, sendo bastante utilizado a gema de ovo e o leite como constituintes dos diluidores.

Pesquisas relatam a superioridade dos diluidores à base de gema de ovo na preservação do sêmen asinino. Ferreira (1993), trabalhando com sêmen de jumentos, obteve o sêmen viável por mais tempo, nas taxas de 0,6°C/min, 0,3°C/min, 0,2°C/min de resfriamento, no meio diluidor lactose gema de ovo, quando comparado ao meio diluidor leite em pó desnatado-glicose. Melo (2000) trabalhando com sêmen fracionado de jumentos testou dois diluentes, o de leite proposto por Kenney et al. (1975) e o de gema proposto por Baken e modificado por Nishikawa (1959). Em todos os tratamentos a motilidade total permaneceu acima de 10% até 168 horas de armazenamento. A partir de 24 horas pós-coleta, os tratamentos que utilizaram gema de ovo foram superiores aos do diluidor à base de leite. Cottorello et al. (2002), utilizando diluidores a base de leite em pó desnatado-glicose, Baken I (3% de

gema de ovo) e Baken modificado (10% de gema de ovo) observaram que o diluidor a base de gema de ovo preservou melhor o sêmen de jumentos *in vitro* comparado ao meio diluidor a base de leite resfriado a 0, 5 e 10°C no período de seis dias. Os autores relatam ainda que o aumento da concentração de gema de ovo no diluidor teve um efeito benéfico na preservação *in vitro* dos espermatozoides de jumentos em baixas temperaturas. Rota et al. (2008) trabalhando com sêmen asinino diluído obtiveram melhor preservação no meio INRA82-Y mantendo 75% de motilidade progressiva após 72 horas de resfriamento a 5°C.

Importante relatar a pesquisa *in vivo* realizada por Rossi (2008). O autor concluiu que o diluidor glicina-gema de ovo é uma boa alternativa na utilização do sêmen de asinino, proporcionando taxa de concepção de 54,6%, semelhante ao diluidor leite em pó desnatado-glicose de 63,6%, corroborando com a escolha da gema de ovo como macromolécula para diluidores para resfriamento de sêmen asinino.

Segundo Banaszak et al. (1991) e Kuksis (1992) *apud* Martin (2005) através de caracterização bioquímica, a fração protetora da gema de ovo é a lipoproteína de baixa densidade (LDL). A função de proteção exercida pela LDL está associada com sua aderência à membrana celular durante o processo de criopreservação, aumentando a concentração de fosfolípidios e a resistência da membrana plasmática ao resfriamento (Bergeron et al. 2004). Entretanto, na literatura consultada não foram encontrados trabalhos que utilizaram LDL na preservação do sêmen asinino. Portanto, o objetivo deste experimento foi comparar diluidor comercial à base de leite acrescido de gema de ovo e da fração de lipoproteínas de baixa densidade extraídas da gema de ovo, para o resfriamento e armazenamento do sêmen asinino a 6°C.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi realizado na Fazenda do Váu, município de Lagoa Dourada, MG. Situa-se a 20° 54' 50" de latitude S e 44° 4' 40" de longitude W Gr., em uma altitude média de 1124 metros e clima do tipo Cwa, inverno seco e verão chuvoso, de acordo com a classificação climática de Köppen-Geiger (5° Distrito de Meteorologia do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Foram utilizados seis jumentos da raça Pêga, com idades variando entre quatro e 25 anos. Estes foram man-

tidos sob manejo padronizado em baia de alvenaria individual com piso de cimento e cama de capim seco e, soltos em piquetes em dias alternados. Foram mantidos sob as mesmas condições de manejo nutricional e alimentados com capim napier, cana de açúcar, silagem de milho, concentrado fornecido duas vezes ao dia, sal mineral e água a vontade. Os jumentos estavam em atividade sexual, utilizados em monta natural.

A coleta do sêmen foi realizada com o auxílio de vagina artificial fechada modelo Botucatu®. Foram utilizadas jumentas e éguas manequins no cio e devidamente contidas em tronco de madeira, de acordo com a preferência de cada jumento, relatada pelo proprietário.

O sêmen foi coletado e levado imediatamente para o laboratório da fazenda. Todas as coletas de sêmen aconteceram no mesmo dia no período da manhã. No dia anterior à realização do experimento todos os jumentos foram coletados.

No laboratório na Fazenda do Váu foi feita análise do sêmen *in natura* quanto ao: volume, cor, aspecto, motilidade total (MT) e progressiva (MP) e vigor espermático (V). As avaliações da MT, MP e V foram feitas subjetivamente em microscopia óptica convencional, por pelos menos dois avaliadores.

O sêmen foi diluído e distribuído em tubos Falcon em volumes iguais e em quatro tratamentos diferentes, sendo chamados de D1, D2, D3 e D4, sendo: D1 - Botusêmen®; D2 - Botusêmen® + 10 % de gema de ovo; D3 - Botusêmen® + 10 % de gema de ovo, centrifugado a 800 X g por 15 minutos após a adição da gema de ovo; D4 - Botusêmen® + 6,8 % LDL.

Todos os diluidores foram preparados na semana anterior ao experimento e congelados. O D3 após a adição de 10% de gema de ovo foi centrifugado e posteriormente congelado. A LDL utilizada no preparo do D4 também estava congelada, sendo utilizado para a sua extração o método descrito por Moussa et al. (2002) modificado por Neves (2008). Os diluidores foram descongelados no dia do experimento e mantidos a 34°C para o processamento do sêmen.

Foi estabelecido fixar a diluição 1:3, sendo uma parte de sêmen para duas partes de diluidor. Logo após a diluição uma amostra foi retirada para a avaliação da MT, MP e V. Os tubos contendo as amostras de sêmen diluídas nos quatro diferentes diluidores (D1 a D4) foram acondicionadas em uma caixa de isopor contendo gelo reciclável para ser submetido a uma curva de resfriamento de 0,65°C/min até alcançar 5°C. Após alcançar 5°C os tubos Falcon

foram transferidos para uma caixa de resfriamento e transporte de sêmen modelo Botuflex® para garantir manutenção a 5°C até serem acondicionadas em geladeira. O Botuflex® foi montado pelo menos seis horas antes da sua utilização para que o ambiente da caixa estivesse estabilizado à temperatura de 5° C, no momento que recebesse os tubos Falcon, preparando assim as amostras de cada jumento dentro de cada caixa de transporte. Estas caixas foram mantidas lacradas até laboratório de análises da cinética espermática, onde foram transferidas e mantidas em geladeira comercial mergulhadas em água em caixa de isopor, em temperaturas que variaram de 6 a 8°C, durante o período de três dias.

Utilizou-se o equipamento SCA® (Sperm Class Analyzer®, Microptic) para avaliação da cinética espermática (Computer Assisted Semen Analysis – CASA) que captura a imagem das amostras por um microscópio acoplado ao computador e envia os dados para análise do movimento espermático, sendo previamente ajustado para análise de espermatozóide equino. Das variáveis analisadas pelo CASA foram utilizadas: a motilidade progressiva (MP), a motilidade não progressiva, velocidade curvilínea (VCL), velocidade linear progressiva (VSL), velocidade média do trajeto (VAP) e a velocidade de deslocamento linear rápido dos espermatozoides. A motilidade total (MT) foi calculada posteriormente pelo somatório direto do percentual de espermatozoides com motilidade progressiva e do percentual de espermatozoides com motilidade não progressiva.

O delineamento experimental consistiu em blocos ao acaso, considerando jumento como bloco e o tratamento foi em parcela subdividida, considerando os tempos de leitura as subparcelas. As variáveis que não apresentaram distribuição normal sofreram transformação logarítmica [ $\log_{10}(\text{var} + 1)$ ], sendo estas a MP e o VSL. O modelo foi avaliado pelo teste de Fisher. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey. A variável MT foi submetida à análise não paramétrica. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para comparação dos diluidores dentro de cada dia e o teste de Friedman para comparação dos dias dentro de cada diluidor. Utilizou-se para as análises os programas Excel (2003), SAEG (2007), SAS (1999) e SISVAR (2007).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os seis jumentos avaliados tiveram a libido satisfatória, não havendo insucesso nas colheitas. A vagina artificial para equino (modelo Botucatu®) foi

adequada para a coleta de jumentos. Nas análises físicas, os ejaculados dos jumentos, livres da porção gel, apresentaram odor *sui generis*, aspecto leitoso a aquoso e cor branco-acinzentado não diferindo dos trabalhos relatados na literatura (Santos 1994, Melo 2000).

A diluição foi benéfica para os espermatozoides asininos, apresentando valores médios pós-diluição acima de 70% de motilidade progressiva, variando de 72,5 a 80,0%.

Os valores gerais de motilidade total dos espermatozoides asininos mantidos a 6°C em diluidores à base de leite acrescido de gema e LDL se encontram dentro do padrão de normalidade para a espécie. A MT, em análise geral, sofreu queda de aproximadamente 4% ao dia, sem considerar a superioridade de alguns tratamentos, estando este declínio de acordo com o ideal encontrado na literatura (Melo 2000).

Foi constatada interação significativa entre os diluidores e os dias de resfriamento. Primeiramente, observando-se na Tabela 1 o comportamento de cada diluidor, verificou-se que para o diluidor (D1) à base de leite a queda da motilidade total foi signifi-

ficativa dentro do período de resfriamento. Entretanto, nos diluidores à base de leite acrescido de gema de ovo, o período de resfriamento não teve efeito sobre a motilidade total, permanecendo esta característica espermática constante do dia 1 ao dia 3, a 6°C (Tabela 1). Estes resultados indicam que o acréscimo de gema de ovo em diluidor à base de leite propicia melhor preservação da motilidade total do sêmen asinino mantido a 6°C até 72 horas. Os tratamentos contendo gema de ovo 24 horas pós-coleta foram superiores ( $p<0,05$ ) ao diluidor a base de leite estando também de acordo com o trabalho de Melo (2000).

Ferreira (1993) e Cotorello et al. (2002) também trabalhando com sêmen de jumento observaram que os diluidores a base de gema de ovo preservaram melhor a MT, MP espermática do que os diluidores a base de leite. Nishikawa (1959) *apud* Rossi (2008) relatou longevidade espermática de 337 horas em meio Baken (a base de gema de ovo) resfriado a 4°C. O diluidor contendo gema de ovo mantém maior longevidade espermática em relação ao diluidor a base de leite, possivelmente pelo fato da gema

Tabela 1. Motilidade total (%) dos espermatozoides asinino resfriado a 6°C pós-diluição do sêmen avaliada no período de três dias.

Dia	Diluidor				Média ± DP
	1	2	3	4	
1	42,3 ± 25,8 a A	84,7 ± 11,7 a b A	87,9 ± 18,9 b A	84,3 ± 19,7 a b A	74,8 ± 26,6
2	15,3 ± 10,2 a B A	78,2 ± 18,4 a b A	93,8 ± 5,9 b A	94,5 ± 5,1 b A	70,5 ± 34,8
3	9,9 ± 4,6 a B	80,5 ± 20,1 a b A	96,6 ± 2,8 b A	79,2 ± 15,9 a b A	66,5 ± 36,3
Média ± DP	22,5 ± 21,1	81,1 ± 16,3	92,8 ± 11,5	86,0 ± 15,5	

Diluidor 1 - Botusêmen

Diluidor 2 - Botusêmen + 10% de gema de ovo

Diluidor 3 - Botusêmen + 10% de gema de ovo centrifugado

Diluidor 4 - Botusêmen + 6,8% de LDL

Comparação dos diluidores dentro de cada dia de resfriamento – letras minúsculas diferentes nas linhas indica diferença entre os valores ( $p<0,05$ ).

Comparação dos dias de resfriamento dentro de cada diluidor - letras maiúsculas diferentes nas colunas indica diferença entre os valores ( $p<0,05$ ).

Análise não paramétrica. Foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis para comparação dos diluidores dentro de cada dia e teste de Friedman para comparação dos dias dentro de cada diluidor.

Tabela 2. Motilidade progressiva (%) do sêmen asinino resfriado a 6°C pós-diluição do sêmen avaliada no período de três dias.

Dia	Diluidor				Média ± DP
	1	2	3	4	
1	12,2 ± 10,6 a A	20,6 ± 10,6 a b A	43,7 ± 20,3 b A	21,9 ± 9,1 b A	24,6 ± 17,3
2	0,8 ± 0,5 a B	14,9 ± 06,1 b A	38,2 ± 24,6 b A	25,0 ± 19,4 b A	19,7 ± 20,4
3	0,3 ± 0,4 a B	19,9 ± 11,5 b A	52,6 ± 07,8 c A	19,9 ± 07,1 b A	23,1 ± 20,5
Média ± DP	4,4 ± 8,1	18,5 ± 9,5	44,8 ± 18,8	22,2 ± 12,4	

Diluidor 1 - Botusêmen

Diluidor 2 - Botusêmen + 10% de gema de ovo

Diluidor 3 - Botusêmen + 10% de gema de ovo centrifugado

Diluidor 4 - Botusêmen + 6,8% de LDL

Comparação dos diluidores dentro de cada dia de resfriamento – letras minúsculas diferentes nas linhas indica diferença entre os valores (Teste de Tukey -  $p<0,05$ ).

Comparação dos dias de resfriamento dentro de cada diluidor - letras maiúsculas diferentes nas colunas indica diferença entre os valores (Teste de Tukey -  $p<0,05$ ).

de ovo manter a estrutura da cromatina espermática e a integridade da membrana espermática (Scobey et al. 1995 *apud* Melo 2000).

Ao se analisar a motilidade progressiva também foi constatada interação significativa entre os diluidores e os dias de resfriamento (Tabela 2). O comportamento de cada diluidor dentro do período de resfriamento foi semelhante ao observado na característica de motilidade total, sendo que o período de resfriamento só teve efeito deletério sobre a motilidade progressiva no diluidor 1. Em geral os diluidores à base de gema de ovo e suas derivações (D2, D3 e D4) preservaram melhor a motilidade progressiva do sêmen asinino mantido a 6°C até 72 horas, sendo observado somente no dia 1 de resfriamento resultados de motilidade progressiva nos diluidores 1 e 2 semelhantes. Observa-se ainda a tendência de superioridade do D3 em relação aos demais diluidores, confirmada no dia 3 do resfriamento. Os valores de motilidade progressiva no D3 à base de leite acrescido de gema de ovo e centrifugado antes do acréscimo do sêmen são mais compatíveis com

os quesitos mínimos preconizados para outras espécies animais para uso em inseminação artificial, observando-se nesta tabela a menor média de MP do sêmen asinino no D3 foi de  $38,2 \pm 24,6\%$ .

Rota et al. (2005) trabalhando com sêmen equino obteve melhor preservação na MT, MP após 48h com diluidor a base de leite (INRA96) do que a base de gema de ovo (INRA82Y), diferindo da espécie asinina. Isto reforça a necessidade de se trabalhar com as especificidades em se tratando de processamento de sêmen.

Pode-se observar na Tabela 3 que não houve diferença na velocidade rápida de deslocamento linear dos espermatozoides mantidos nos diluidores 1 e 2 durante os três dias resfriados. Entretanto, no primeiro e no terceiro dia de resfriamento a velocidade de deslocamento linear rápida foi superior para os espermatozoides asininos mantidos no diluidor à base de leite acrescido de gema de ovo e centrifugado, em relação aos demais diluidores, sugerindo maior potencial de fertilidade no sêmen mantido no D3.

Na Tabela 4 estão discriminados os resultados

Tabela 3. Velocidade média do trajeto (VAP  $\mu\text{m/s}$ ) do espermatozoide asinino resfriado a 6°C pós-diluição do sêmen em diferentes diluidores, avaliada no período de três dias.

Dia	Diluidor				Média $\pm$ DP
	1	2	3	4	
1	18,6 $\pm$ 17,9 a A	14,6 $\pm$ 5,4 a A	74,6 $\pm$ 10,8 b A	33,0 $\pm$ 17,2 a A	35,2 $\pm$ 27,5
2	0,5 $\pm$ 0,4 a B	15,4 $\pm$ 7,0 a A	47,4 $\pm$ 22,2 b B	34,9 $\pm$ 22,2 b A	24,5 $\pm$ 23,7
3	0,4 $\pm$ 0,3 a B	18,6 $\pm$ 14,0 a b A	67,3 $\pm$ 9,4 c A	23,5 $\pm$ 16,0 b A	27,4 $\pm$ 27,3
Média $\pm$ DP	6,5 $\pm$ 13,1	16,2 $\pm$ 9,1	63,1 $\pm$ 18,6	30,4 $\pm$ 18,2	

Diluidor 1 - Botusêmen

Diluidor 2 - Botusêmen + 10% de gema de ovo

Diluidor 3 - Botusêmen + 10% de gema de ovo centrifugado

Diluidor 4 - Botusêmen + 6,8% de LDL

Comparação dos diluidores dentro de cada dia de resfriamento – letras minúsculas diferentes nas linhas indica diferença entre os valores (Teste de Tukey -  $p < 0,05$ ).

Comparação dos dias de resfriamento dentro de cada diluidor - letras maiúsculas diferentes nas colunas indica diferença entre os valores (Teste de Tukey -  $p < 0,05$ ).

Tabela 4. Velocidade curvilinear (VCL- $\mu\text{m/s}$ ) dos espermatozoides asininos resfriado a 6°C, pós-diluição do sêmen em diferentes diluidores, avaliada no período de três dias.

Dia	Diluidor				Média $\pm$ DP
	1	2	3	4	
1	51,4 $\pm$ 27,2 a A	50,4 $\pm$ 7,2 a A	115,9 $\pm$ 19,4 b A	70,6 $\pm$ 18,1 a A	72,1 $\pm$ 32,6
2	23,6 $\pm$ 3,0 a B	52,0 $\pm$ 8,0 b A	80,2 $\pm$ 19,1 c B	69,3 $\pm$ 21,1 b c A	56,3 $\pm$ 25,9
3	20,8 $\pm$ 8,0 a B	52,8 $\pm$ 13,9 b A	102,3 $\pm$ 10,9 c A	72,7 $\pm$ 22,8 b A	62,2 $\pm$ 33,4
Média $\pm$ DP	31,9 $\pm$ 21,0	51,7 $\pm$ 9,6	99,5 $\pm$ 22,0	70,9 $\pm$ 19,5	

Diluidor 1 - Botusêmen

Diluidor 2 - Botusêmen + 10% de gema de ovo

Diluidor 3 - Botusêmen + 10% de gema de ovo centrifugado

Diluidor 4 - Botusêmen + 6,8% de LDL

Comparação dos diluidores dentro de cada dia de resfriamento – letras minúsculas diferentes nas linhas indica diferença entre os valores (Teste de Tukey -  $p < 0,05$ ).

Comparação dos dias de resfriamento dentro de cada diluidor - letras maiúsculas diferentes nas colunas indica diferença entre os valores (Teste de Tukey -  $p < 0,05$ ).

da velocidade curvilinear (VCL) dos espermatozoides asininos, nos diferentes diluidores ao longo de três dias mantidos a 6°C. No primeiro dia a VCL dos espermatozoides asininos foi superior quando mantidos no D3 em relação aos demais diluidores. A superioridade dos diluidores acrescidos de gema de ovo ou derivados se mostrou patente a partir do segundo dia de resfriamento.

A velocidade linear progressiva (VSL) é a velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide (Matos et al. 2008). A VSL não diferiu dentro do período de resfriamento para os espermatozoides asininos mantidos nos diluidores 2 e 4. Nos diluidores 1 e 3 a VSL no primeiro dia de resfriamento foi superior aos dias 2 e 3. Analisando-se o efeito do diluidor dentro de cada dia observa-se que o diluidor 3 foi superior aos demais nos dias 1 e 3 do resfriamento (Tabela 5).

Verstegen et al. (2002) ao relacionar os parâmetros do CASA com a taxa de fertilidade, verificou que os valores de VAP, VSL e VCL são significativamente maiores em amostras que produzem mais de 50% de oócitos fertilizados do que naquelas onde a taxa de fertilidade é menor que 50%. Amostras com valores maiores de velocidade, LIN (linearidade) e BCF (frequência de batimento flagelar cruzado) apresentam melhor migração e penetração no muco cervical. Esta relação permite inferir que o D3 avaliado pela VSL e VCL possivelmente representa o tratamento de maior potencial de fertilidade.

Os resultados do CASA podem ser alterados quando a concentração espermática das amostras diluídas está acima de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL e em diluidores a base de leite e gema de ovo, que contém partículas com tamanho da cabeça dos espermatozoides. Entretanto, buscou-se com a limpe-

za de imagens do CASA, a eliminação de partículas que pudessem ser confundidas com o espermatozoide estático e a eliminação de leituras extremas, fora do comportamento da amostra. Portanto, acredita-se que este não seja um fator com efeito sobre estes resultados aqui apresentados, atribuindo-se aos resultados o efeito direto do diluidor empregado.

O acréscimo da gema de ovo e derivações ao diluidor à base de leite teve efeito benéfico sobre as características do espermatozoide asinino armazenado a 6°C. Entretanto, observou-se a superioridade dos diluidores acrescidos de 10% de gema de ovo e centrifugado (D3) e do diluidor acrescido de 6,8% de LDL (D4) em relação ao diluidor acrescido de 10% de gema de ovo sem centrifugação (D2). No terceiro dia de armazenamento os efeitos benéficos do D3 foram mais expressivos. De acordo com as avaliações utilizadas no presente trabalho foi observado que o diluidor 3 (Botusêmen + gema de ovo centrifugada) sobressaiu em relação aos outros diluidores estudados, à medida em que se aumentou o tempo de armazenamento, se destacando principalmente nas características de MT, percentual de espermatozoides com velocidade rápida de deslocamento, com VCL e VSL. Ressalta-se que nas outras características avaliadas o D3 teve comportamento semelhante ao D4 (diluidor com 6,8% de lipoproteína de baixa densidade).

Analisando a forma de preparo destes diluidores deve-se ressaltar que apesar de se preconizar melhor padronização da lipoproteína de baixa densidade em relação à gema de ovo total, o preparo da lipoproteína é complexo e requer equipamentos mais elaborados, mesmo se trabalhando na simplificação da técnica de extração desta lipoproteína. Esta complexidade não foi sustentada por resultados destacadamente superiores ao da gema total centrifugada.

Tabela 5. Velocidade linear progressiva (VSL- $\mu\text{m/s}$ ) do espermatozoide asinino resfriado a 6°C, pós-diluição do sêmen em diferentes diluidores, avaliada no período de três dias.

Dia	Diluidor				Média $\pm$ DP
	1	2	3	4	
1	28,7 $\pm$ 16,7 a A	22,3 $\pm$ 4,3 a A	75,3 $\pm$ 13,7 b A	35,2 $\pm$ 7,5 a A	40,4 $\pm$ 23,7
2	6,8 $\pm$ 1,7 a B	22,2 $\pm$ 5,3 b A	45,5 $\pm$ 21,3 c B	30,7 $\pm$ 15,5 b c A	26,3 $\pm$ 19,0
3	5,1 $\pm$ 2,5 a B	22,6 $\pm$ 9,0 b A	56,7 $\pm$ 5,4 c A B	31,5 $\pm$ 9,3 b A	29,0 $\pm$ 20,1
Média $\pm$ DP	13,6 $\pm$ 14,4	22,4 $\pm$ 6,1	59,2 $\pm$ 18,9	32,5 $\pm$ 10,8	

Diluidor 1 - Botusêmen

Diluidor 2 - Botusêmen + 10% de gema de ovo

Diluidor 3 - Botusêmen + 10% de gema de ovo centrifugado

Diluidor 4 - Botusêmen + 6,8% de LDL

Comparação dos diluidores dentro de cada dia de resfriamento – letras minúsculas diferentes nas linhas indica diferença entre os valores (Teste de Tukey -  $p < 0,05$ ).

Comparação dos dias de resfriamento dentro de cada diluidor - letras maiúsculas diferentes nas colunas indica diferença entre os valores (Teste de Tukey -  $p < 0,05$ ).

Características bioquímicas deste diluidor (D3) devem ser analisadas e testes de fertilidade devem ser realizados para se comprovar a eficácia deste diluidor para a espécie asinina.

## CONCLUSÃO

Baseado nas características da cinética espermática e na praticidade de preparo, o diluidor à base de leite acrescido de 10% de gema de ovo e centrifugado antes da sua utilização, foi superior na preservação do sêmen asinino a 6°C.

**Agradecimentos.** Ao Dr. José Antônio Dell'aqua Júnior, BOTUPHARMA-Biotecnologia Animal, pela colaboração na realização desse experimento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bergeron A., Crête M., Brindle Y. & Manjunath P. Low-density lipoprotein fraction from Hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol. Reprod.*, 70:708-717, 2004.
- Cottorello A.C.P., Amancio R.C., Henry M. & Borges I. Effect of storage temperature and extenders on in-vitro activity of donkey spermatozoa. *Theriogenology*, 58:325-328, 2002.
- Cottorello A.C.P., Snoeck P.P.N., Becker A.R.C.L. & Henry M. Efeito da rediluição na longevidade do sêmen asinino (*Equus asinus*) preservado a 5°C. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 27:342-344, 2003.
- Ferreira M.F.L. Efeito de diluente e taxa de resfriamento sobre a motilidade espermática e fertilidade do sêmen de jumentos (*Equus asinus*). Dissertação (Medicina Veterinária), Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, 1993. 67f. (Disponível em: <[http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/1843/SSLA-87APC5/1/pdf\\_ufmg.pdf](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/1843/SSLA-87APC5/1/pdf_ufmg.pdf)>.)
- Martin C.E.G. Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre algumas características funcionais dos espermatozoides equinos criopreservados. Dissertação (Medicina Veterinária), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005. (Disponível em: <<http://www.tkreproducao.com.br/enviados/2009828181439.pdf>>.)
- Matos D.I., Araújo A.A., Roberto I.G. & Toniolli R. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 32:225-232, 2008.
- Melo S.L.V., Henry M., Souza M.C. & Oliveira S.M.P. Effect of split ejaculation and seminal extenders on longevity of donkey semen preserved at 5°C. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 52:372-378, 2000.
- Moussa M., Martinet V., Trimeche A., Tainturier D. & Anton M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 57:1695-1706, 2002.
- Neves M.M. Extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de *Gallus domesticus* e sua aplicação na criopreservação do sêmen canino. Tese (Ciência Animal), Escola de Veterinária, UFMG, 2008. (Disponível em: <[http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/1843/SSLA-7UEHL3/1/mariana\\_machado\\_neves.pdf](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/1843/SSLA-7UEHL3/1/mariana_machado_neves.pdf)>.)
- Rossi R. Comparação de dois diluentes na fertilidade de éguas inseminadas com sêmen asinino a fresco ou resfriado. Dissertação (Medicina Veterinária), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008. 209p. (Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1843/SSLA-87APC5>>.)
- Rota A., Magelli C., Panzani D. & Camillo F. Effect of extender, centrifugation and removal of seminal plasma on cooled-preserved Amiat donkey spermatozoa. *Theriogenology*, 69:176-185, 2008.
- SAEG, FUNARBE Versão 9.1, UFV, Viçosa, 2007.
- Santos G.F. Efeito do método e de taxas de resfriamento sobre características físicas e morfológicas dos espermatozoides de jumentos (*Equus asinus*) preservado a 5°C. Dissertação (Medicina Veterinária), Escola de Veterinária da UFMG, 1994, 82p. (Disponível em: <[www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/.../1/pdf\\_ufmg.pdf](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/.../1/pdf_ufmg.pdf)>.)
- SAS, SAS/STAT User's guide. SAS INSTITUTE INC. Version 8, Cary, SAS Institute Inc., 1999.
- SISVAR, DEX/UFLA, Versão 5.0, UFLA, Lavras, 2007.
- Varner D.D., Blanchard T.L., Love C.L., Garcia M.C. & Kenney R.M. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*, 28:709-723, 1987.
- Verstegen J., Iguer-Ouada M. & Onclin K. Computer Assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57:149-179, 2002.