



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAL

Paula Miranda Costa

COMPARAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES DILUIDORES NA
VIABILIDADE ESPERMÁTICA PÓS-CONGELAÇÃO DE SÊMEN BOVINO

São Luís – MA

2012

Paula Miranda Costa

COMPARAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES DILUIDORES NA
VIABILIDADE ESPERMÁTICA PÓS-CONGELAÇÃO DE SÊMEN BOVINO

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação da Universidade
Estadual do Maranhão para obtenção
do título de mestre em Ciência Animal.

Área de concentração:

Conservação e Reprodução Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Corallo Nicacio

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Andrade Sousa

São Luís – MA

2012

Costa, Paula Miranda.

Comparação da influência de diferentes diluidores na viabilidade espermática pós-congelamento de sêmen bovino / Paula Miranda Costa.– São Luís, 2012

55f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Alessandra Corallo Nicacio

1. sêmen. 2. Criopreservação. 3. Diluidores. 4. Viabilidade espermática. 5. Bovino.
I.Título

CDU: 636.2.082.454

Dissertação de Mestrado e aprovada em _____ de _____ de 2012 pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

1º Membro

Prof. Dr. Jorge André Matias Martins

2º Membro

Prof. Dr. Ricardo de Macêdo Chaves

Orientador (a)

Profa. Dra. Alessandra Corallo Nicacio

“Acredito na ideia de que, nas nossas vidas, Deus põe as pessoas certas. Aquelas que vão te criticar para que possas descobrir sua força e seu poder em vencer teus obstáculos. Aquelas que vão estender a mão para que você descubra o quão verdadeira possa ser uma amizade e o quanto o ser humano pode valer a pena. Aquelas que apenas com um olhar vai fazer você vê que um mundo de possibilidades está à sua frente, pronto para te fazer feliz.”
(Paula Miranda Costa)

Dedico à todas as pessoas que fizeram parte desse trabalho e, principalmente, da minha vida. Minha família abençoada, meus amigos queridos e a todos que de bom coração contribuíram para realização de um sonho.

**“Se eu soubesse o que estava
fazendo, não chamaria de pesquisa”**

Albert Einstein

Agradecimentos

À DEUS por ter me dado a honra e a benção de ser sua filha, por me fazer forte em cada amanhecer para superar as dificuldades desta jornada e estar vivenciando o momento de realização junto às pessoas que amo.

À Universidade Estadual do Maranhão, em especial à Escola de Medicina Veterinária, por ter me dado a chance de realizar esse curso e ter acreditado em mim enquanto profissional da área.

Ao curso de pós-graduação, Mestrado em Ciência Animal por ter acreditado no meu profissionalismo.

À FAPEMA, pela concessão da bolsa de estudos.

À minha avó e minha tia, Magnólia e Fátima, que sempre me deram apoio e conselhos quando eu tinha incertezas em meu coração e que sempre torceram e torcem, não só pelo meu sucesso como pela minha felicidade.

Aos meus pais, Carlos Alberto e Avelina Oliveira, pelo apoio e amor incondicionais.

À toda minha família, aos que estão perto e aos que estão longe, mas que sempre estarão dentro do meu coração. Obrigada pelo simples fato de existirem em minha vida.

À minha orientadora Profa. Dra. Alessandra Corallo Nicacio que mesmo sem saber quem eu era acreditou em mim e em meu potencial. Obrigada por ter atendido aquele telefonema no aeroporto e mesmo sem poder olhar para mim disse sim em vez de não.

Ao Professor Ricardo Macêdo Chaves, pelo seu bom coração e por sempre se mostrar disponível em ajudar nos momentos difíceis desse trabalho. Obrigada pelo apoio dado nos meus momentos de desânimo.

Ao meu co-orientador Professor Fernando Andrade de Sousa, por sua imensa contribuição; por ter me dado bons conselhos para melhoria do trabalho e por

ter me ajudado a por de pé esse projeto e fazer com que desse certo no final. Obrigada por sua gentileza e ajuda.

Ao Professor Hamilton Pereira dos Santos, por sua contribuição no trabalho, por ter me cedido de bom grado as palhetas francesas utilizadas no experimento e por me ajudar a conseguir propriedade para realizar o trabalho.

Ao Professor Daniel Praseres, por ter cedido sua propriedade por um longo período de tempo para que eu realizasse o experimento.

À banca examinadora, Professor Jorge André Matias Martins, por sua disponibilidade em participar da banca e pela gentileza em contribuir para o trabalho com a análise estatística.

Ao médico veterinário William Modesto por ter cedido a fazenda Bom Jardim para que eu pudesse finalizar meu experimento.

Aos meus amigos Lyah Lamarck, Ilderlane Silva, Eric Takashi, Elka Ferreira, Nayanna Galvão, Larissa Sarmiento, Hérica Cipriano e Naia Alves pelos momentos de descontração e alegria que tive com vocês, e pelos momentos de desabafo também. Pelo apoio e amizade.

Agradeço imensamente aos meus grandes e verdadeiros amigos Sâmara Cristine, Mysa Tatiana, Israel Pires, Giovanni Júnior, Júlio Henrique e Ulisses Fernando. Obrigada não só pela mão estendida e por ter adotado meu experimento com sendo o de vocês também, mas obrigada principalmente por terem me dado a chance de tê-los em minha vida, pelo privilégio ter a amizade de vocês, por terem sempre uma palavra amiga quando eu precisei, por tomarem atitudes quando eu era inércia. Obrigada por acreditarem em mim quando eu mesma não acreditava, por me deixarem fazer parte de suas vidas e sonhos. Obrigada pelos momentos de alegrias, de risadas frouxas, de seriedade, de trabalho árduo, de tristezas também, porque amigo é isso: é estar em todas as horas independente de como você esteja. Obrigada de coração porque o que vocês fizeram por mim, não foi coisa de meros colegas de laboratório foi digno de VERDADEIROS AMIGOS!

Autora: Paula Miranda Costa¹

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Corallo Nicacio²

Resumo

O objetivo desse trabalho foi comparar três diluidores usados no congelamento de sêmen bovino em relação a parâmetros como motilidade pós-descongelamento (teste de termoresistência) e viabilidade e integridade de membrana (testes hiposmótico e coloração Trypan-blue e Giemsa, respectivamente) para uso em propriedades rurais no Estado do Maranhão. Para o estudo foram utilizados 6 touros da raça Nelore, obtendo-se 6 ejaculados de cada animal. Os ejaculados foram fracionados em três alíquotas iguais e submetidos à criopreservação com os diluidores Botu-Bov®, gema-citrato de sódio e Nagase. Foram realizados os testes de termoresistência rápido, hiposmótico e de integridade e viabilidade de membrana através da coloração Trypan-blue e Giemsa. Os dados foram analisados pelo programa *Statistical Analysis System* (SAS), comparando-se as médias pelo procedimento PROC Mixed e teste do Qui-Quadrado. Observou-se que não houve diferença significativa entre os três diluidores para o teste hiposmótico, porém verificou-se diferença significativa para o teste de integridade e viabilidade de membrana (coloração Trypan-blue e Giemsa) e para o teste de termoresistência rápido entre os três grupos estudados. Não foi observada influência dos três diluidores nas três repetições feitas. Os dados gerais permitem concluir que as partidas congeladas não obtiveram resultados satisfatórios para os critérios exigidos de motilidade progressiva retilínea e viabilidade espermática.

Palavras-chave: sêmen, criopreservação, diluidores, viabilidade espermática, bovino.

¹Mestranda do curso de pós-graduação Mestrado em Ciência Animal da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA

²Pesquisadora da Embrapa Gado de Corte – Campo Grande / MS

Abstract

The aim of this study was to compare three extenders used in the freezing of bovine semen, related to parameters such as: post thawing motility (thermo-resistance test) and integrity and viability of the membrane (hypoosmotic test and Trypan-blue and Giemsa staining, respectively) to use in rural properties of Maranhão State. For this study 6 Nellore bulls were used, obtaining 6 ejaculates of each animal. The ejaculates were distributed in three equal parts and subjected to cryopreservation with Botu-Bov®, Sodium-citrate yolk-egg and Nagase. It was done the tests of quick thermo-resistance, hypoosmotic, and membrane integrity and viability through Trypan-blue and Giemsa staining. Data was analyzed by Statistical Analysis System (SAS) program, compared means through PROC Mixed procedure and Chi Square test. It was seen that the three extenders didn't differ for the hypoosmotic test; however, it showed difference for the integrity and membrane's viability test (Trypan-blue and Giemsa staining) and for the quick thermo-resistance test within the three studied groups. It wasn't seen influence of the extenders in the three replicates done. General data allows us to conclude that the frozen batches of semen didn't achieve satisfactory results for the required criteria of (straight progressive motility) and sperm viability.

Key-words: semen, cryopreservation, extenders, sperm viability, bovine.

SUMÁRIO

1.	Introdução	01
2.	Hipótese	04
3.	Objetivos	05
3.1.	Objetivo geral	05
3.2.	Objetivos específicos	05
4.	Revisão de literatura	06
4.1.	Estrutura do espermatozóide	06
4.1.1.	Cabeça	06
4.1.2.	Flagelo	07
4.1.3.	Membrana plasmática	08
4.2.	Criopreservação de sêmen	09
4.3.	Diluidores	11
4.4.	Crioprotetores	11
4.4.1.	Crioprotetores não-penetrantes	12
4.4.2.	Crioprotetores penetrantes	12
4.4.3.	Etapa da refrigeração do sêmen	13
4.4.4.	Etapa da congelamento do sêmen	14
4.4.5.	Pós-descongelamento	15
4.4.6.	Viabilidade após a criopreservação	18
5.	Material e métodos	20
5.1.	Seleção de animais	20
5.2.	Colheita do sêmen e análise do sêmen	21
5.3.	Congelamento	22
5.4.	Descongelamento e análise do sêmen após o descongelamento	24
5.5.	Análise estatística	25
6.	Resultados e discussão	26
7.	Conclusões	34
	Referências bibliográficas	35

Lista de tabelas

Tabela 1. Valores médios (\bar{x}) e desvios padrão (DsP) de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico do sêmen congelado com os diluidores Nagase, Gema-citrato de sódio e Botu-Bov®, São Luís – Maranhão, 2012.....27

Tabela 2. Valores médios (\bar{x}) e desvios padrão (DsP) da porcentagem da motilidade espermática progressiva retilínea no teste de termoresistência rápido (TTR) do sêmen pós-descongelamento com Nagase, Gema-citrato de sódio e Botu-Bov® nas 1º, 2º e 3º repetições, São Luís – Maranhão, 2012.....28

Tabela 3. Médias (\bar{x}) e desvios padrão (DsP) das porcentagens de células espermáticas com acrossomo intacto ou reagido da amostra de sêmen criopreservado com Nagase, Gema-citrato de sódio e Botu-Bov® na 1º, 2º e 3º repetições, São Luís – Maranhão, 2012.....29

Lista de figuras

Quadro 1. Composição do diluidor Nagase.....23

Quadro 2. Composição do diluidor Gema-citrato de sódio.....23

Figura 1. Classificação de espermatozoides analisadas pela técnica de coloração Azul de Trypan-blue e Giemsa. A: Espermatozóide com acrossomo intacto. B: Espermatozoide sem acrossomo. Fotografia digital obtida a partir da ocular do microscópio. Aumento mínimo de 1000X.....32

Lista de abreviaturas e símbolos

°C = graus Celsius

I.A. = inseminação artificial

TE= transferência de embriões

FIV = fecundação *in vitro*

DNA = ácido desoxirribonucléico

CCOs = complexo *cummulus*-ócito

ATPase= enzima que catalisa a hidrólise do ATP

ATP = adenosina trifosfato

nm = nanômetro

pH = potencial de hidrogênio iônico

Tris = tris(hidroximetil)aminometano - (HOCH₂)₃CNH₂

mOsm= osmolaridade

BSP = binder of sperm

kDa= unidade de massa atômica

ROS = espécies reativas ao oxigênio

mm³ = milímetro cúbico

TTR = teste de termoresistência rápido

mL = mililitro

q.s.q = quantidade suficiente para (química)

UI = unidades internacionais

mg = miligrama

g = grama

g/L = gramas por litro

μ L = microlitros

SAS = "Statistical Analysis System"

HOST = teste hiposmótico

A.I. = acrossomo intacto

A.R. = acrossomo reagido

1. INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen é uma maneira de preservar germoplasma para posterior uso na pecuária, aquicultura e até mesmo na conservação de espécies ameaçadas de extinção (ANDRABI e MAXWELL, 2007). Trata-se de uma técnica que permite conservar os espermatozóides por tempo indeterminado em nitrogênio líquido, a temperatura de -196°C , preservando sua estrutura e funcionalidade.

A gradativa melhora nas condições de manejo, alimentação e sistema de criação de bovinos, assim como a exigência de maior produtividade, tanto nos rebanhos elite como nos de criação industrial, tem imposto a crescente necessidade de utilização de biotecnologias reprodutivas como criopreservação de sêmen, inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE), fecundação *in vitro* (FIV), entre outras (SIQUEIRA et al., 2007). O congelamento de sêmen obtém resultados favoráveis apesar da relativa baixa fertilidade devido ao processo. Esta relativa baixa fertilidade é compensada pela quantidade de espermatozoides na dose inseminante (WATSON, 2000).

Segundo BARBAS e MASCARENHAS (2008), a inseminação artificial junto com o congelamento de sêmen são essenciais para a criação e programas de seleção que contribuem com o aumento da produção pecuária.

O congelamento de sêmen provoca impacto e uma boa relação custo/benefício ao produtor no que diz respeito ao uso de animais com genética superior. Algumas vantagens são levadas em consideração no processo de congelação entre elas pode-se citar o controle de sanidade com reduzido risco de transmissão de doenças sexualmente transmissíveis, facilidade em realizar teste de progênie, conservação do germoplasma, baixo custo com transporte e alimentação de reprodutores. Apesar de todas essas vantagens o congelamento de sêmen ainda possui problemas sendo o principal deles a relativa baixa fertilidade após descongelação.

A criopreservação do sêmen causa diminuição da capacidade fecundante dos espermatozóides. Este prejuízo surge da combinação de dois aspectos: morte dos espermatozoides e danos da capacidade fecundante dos sobreviventes (WATSON, 2000). Durante a congelação, os espermatozoides

podem sofrer danos físicos, bioquímicos, estruturais e funcionais, o que conseqüentemente leva à baixa taxa de concepção mesmo que esses espermatozoides estejam em movimento. TARESSON et al. (1977) afirmaram que após a congelação do sêmen a motilidade é melhor preservada que a integridade acrossomal dos espermatozoides. Já NATH (1972) enfatizou que 40 a 50% dos espermatozoides após congelação e descongelação tiveram danos mitocondriais e a estrutura do axonema foi prejudicada. Os procedimentos de congelação/dcongelação do sêmen ocasionam danos celulares devido à mudança na temperatura, formação de cristais de gelo, injúrias oxidativas, alterações na membrana do espermatozoide, lesões no DNA, estresse osmótico, além da toxicidade dos crioprotetores (BALL; VO, 2001).

As etapas da criopreservação de sêmen (diluição, resfriamento, congelação e descongelação) são conhecidas por causar danos à membrana plasmática dos espermatozoides (HAMMERSTEDT et. al., 1990). Porém, todas essas etapas são atípicas para as células espermáticas, fazendo com que o processo ocorra em detrimento da viabilidade celular. Cada uma dessas fases induz danos celulares de diferentes graus de gravidade, sendo, dessa maneira, o estado funcional desses espermatozoides resultante das lesões acumuladas ao longo do processo (MEDEIROS et al., 2002). Os eventos que influenciam negativamente no congelamento são a mudança de temperatura, o estresse osmótico e tóxico representado pela exposição aos crioprotetores e diluidores e formação e dissolução de cristais de gelo extracelulares (WATSON, 2000).

Cinquenta anos após o primeiro sucesso no congelamento de sêmen, essa biotécnica se tornou parte integrante da indústria da criação de gado e evoluiu desde então (CURRY, 2000). O desenvolvimento de protocolos de congelação procura tornar a técnica mais eficiente, com objetivo de obter resultados mais eficazes no que diz respeito à perda da viabilidade espermática após o descongelamento. Além disso, o emprego desta técnica sob condições de campo, em propriedades rurais no Maranhão, se faz importante para impulsionar a pecuária do estado.

2. HIPÓTESE

A composição do diluidor influencia os resultados de viabilidade espermática ao final do procedimento.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- ✓ Avaliar o uso de três diluidores diferentes de criopreservação de sêmen bovino para uso a campo, em propriedades rurais do Estado do Maranhão.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a viabilidade espermática antes e após a criopreservação.
- ✓ Comparar os diluidores Botu-Bov®, Nagase e Gema-Citrato de Sódio quanto a viabilidade espermática após criopreservação.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Estrutura do espermatozoide

Os espermatozoides são células haploides, alongadas, resultantes do processo espermatogênico e maturação, sendo altamente especializadas em sua função – carregar a informação genética ao oócito (HAFEZ, 1988). É uma célula com motilidade ativa (GONÇALVES et al., 2008). Os movimentos que proporcionam aos espermatozoides a habilidade de propulsão são resultantes de elementos contráteis localizados nas fibras longitudinais da cauda (HAFEZ, 1988). São formados nos testículos (FRANCA et al., 2005) e sua maturação ocorre no epidídimo.

Embora exista diferença entre espécies, os espermatozoides dos animais domésticos apresentam plano estrutural similar (HAFEZ, 1988). O núcleo haploide está localizado na cabeça, sendo recoberto pelo acrossomo (capuchão cefálico). Apresenta, ainda, a cauda (ou flagelo) na outra extremidade. Todas essas estruturas são recobertas por membrana citoplasmática denominada plasmalema (GONÇALVES et al., 2008; HAFEZ, 1988).

4.1.1 Cabeça

As principais funções da cabeça do espermatozoide é armazenar o material genético contido no núcleo e promover a reação acrossômica e a fertilização (fusão dos gametas). O DNA no núcleo apresenta-se bastante compactado, de modo a diminuir seu volume e facilitar seu transporte (GONÇALVES et al., 2008; HAFEZ, 1988).

A extremidade anterior da cabeça do espermatozoide é recoberta pelo acrossomo, o qual é composto por uma fina membrana dupla que recobre dois terços do núcleo. O acrossomo é derivado do complexo de Golgi e contém inúmeras enzimas hidrolíticas necessárias para a penetração da matriz extracelular do oócito para que ocorra a fecundação (FLESCH e GADELLA, 2000; CELEGHINI et al., 2008). Várias enzimas estão presentes no acrossomo como é o caso da pró-acrosina e da hialuronidase. A pró-acrosina é precursora

da acrosina, que digere a zona pelúcida, já a hialuronidase atua dissolvendo as células do complexo *cumulus*-oócito (CCOs) (COTTORIELLO e HENRY, 2002; CELEGHINI, 2005). Durante a reação acrossômica, a membrana acrossomal externa e a membrana plasmática se fundem e liberam o conteúdo acrossomal (PATRAT et. al., 2000).

4.1.2 Flagelo

É a parte posterior do espermatozoide, sendo um filamento protoplasmático longo e móvel, cujo axonema central origina-se de um corpo basal situado próximo ao núcleo. É uma estrutura do citoesqueleto altamente especializada e que tem como função a motilidade da célula espermática. O axonema é formado por um anel de nove microtúbulos duplos envolvendo um par central. As responsáveis pela geração de energia para a força motora do flagelo são as dineínas – subunidades de ATPase – que transformam energia química em energia cinética (GIBBONS, 1965).

O flagelo subdivide-se em colo, peça intermediária, peça principal e peça terminal. O colo é a região de ligação entre cabeça e peça intermediária (GONÇALVES et al., 2008). A peça de conexão (colo) forma uma lâmina basal que se articula com uma depressão na superfície posterior do núcleo (HAFEZ, 1988). A peça intermediária se estende desde o colo até o *annulus*, se caracteriza por possuir nove fibras densas próximas a cada um dos pares de microtúbulos e uma bainha de mitocôndrias em arranjo helicoidal que envolve as fibras densas e o axonema (MORTIMER, 1997; TURNER, 2006). A bainha mitocondrial é rica em lipídios e contém o sistema citocromo do espermatozoide, onde é produzida energia, em forma de ATP (adenosina trifosfato), por meio de fosforilação oxidativa (FREY e MANELLA, 2000). Essa energia é muito consumida para manter a motilidade e o pouco retículo endoplasmático existente que mantém a integridade da membrana (MEDEIROS et al., 2002).

A peça principal compreende a parte imediatamente inferior ao anel terminal até quase o final da cauda. É caracterizada por uma bainha fibrosa, contém adenosina trifosfato armazenada e pares de microtúbulos contráteis ao

longo de todo o seu comprimento. Existe uma extensa ligação de dissulfureto entre as proteínas constituintes da bainha fibrosa, o que torna a estrutura muito estável e contribui para a hipótese de que essa estrutura oferece suporte ao flagelo no controle e restrição do movimento flagelar, auxiliando na motilidade dos espermatozoides (GONÇALVES et al., 2008; HAFEZ, 1988; MORTIMER, 1997).

A peça terminal é a porção da cauda posterior à extremidade da bainha fibrosa. Ela contém apenas o axonema central recoberto pela membrana plasmática (HAFEZ, 1988).

4.1.3 Membrana plasmática

A membrana plasmática envolve toda a superfície externa do espermatozoide (BORGES et al., 2011) de maneira contínua (KHOSRO; BEYGI; ZARGHAMI, 2007). Caracteriza-se por ser fina, flexível, autosselante e seletivamente permeável aos solutos polares, com espessura de 7,5 a 10nm, formada quase por completo por proteínas e lipídios (GUYTON e HALL, 1997). As estruturas membranosas são mais importantes pelo fato de serem mais afetadas pelo choque térmico e do estresse oxidativo (BORGES et. al., 2011). O modelo mosaico da membrana é fluido, pelo fato das interações entre os lipídeos e as proteínas serem covalentes, permitindo que as moléculas individuais dos lipídios e das proteínas movam-se lateralmente no plano da membrana (BORGES et al., 2011). Segundo LEHNINGER et al. (2000), na membrana plasmática, certos lipídios são tipicamente encontrados na face externa da camada (esfingomiélna e fosfatidilcolina) e outros na face interna, região citoplasmática (fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol). Embora exista diferença considerável entre as espécies de mamíferos, em geral a membrana plasmática contém aproximadamente 70% de fosfolipídios, 25% de lipídios neutros e 5% de glicolipídios (em base molar) (FLESCHE e GADELLA, 2000). Os lipídios são responsáveis pela integridade estrutural, as proteínas pela ocorrência da maioria dos processos dinâmicos e os carboidratos desempenham papel importante nas interações entre as células (MORTIMER, 1997).

CROSS (1998) relatou que a relação colesterol:fosfolípídeo existente na membrana espermática exerce importante papel regulador no processo de capacitação. Trocas de colesterol e fosfolípídeos entre a membrana plasmática e o meio externo, diminuindo o conteúdo de colesterol e aumentando, assim, sua fluidez, desencadeiam a reação acrossomal por diminuir a microviscosidade da membrana plasmática, reduzir a adesão entre os fosfolípídeos e, possivelmente, permitir maior influxo de cálcio. Todas estas etapas que intermediam a fusão da membrana plasmática com a membrana acrossomal externa determinam o processo fusogênico conhecido por reação do acrossomo (ARRUDA et al., 2010).

4.2 Criopreservação de sêmen

A criopreservação de sêmen busca a suspensão do metabolismo espermático e manutenção de suas características por um longo período de tempo (CELEGHINI et al., 2005). Quando é associada a outra biotécnica como a inseminação artificial, por exemplo, representa um mecanismo eficiente para promoção e difusão de material genético de alta qualidade. O congelamento é um processo complexo que exige atenção para diversos fatores a fim de obter resultados satisfatórios (CASTELO et al., 2008).

Embora seja um procedimento rotineiro, os protocolos de congelamento ainda resultam em número considerável de espermatozoides que não resistem ao processo, o que compromete a fecundação do oócito (NAGY et al., 2004).

Globalmente, o método de criopreservação inclui redução de temperatura, desidratação celular, congelamento e descongelamento (MEDEIROS et al., 2002). O resfriamento do sêmen desde a temperatura fisiológica até 5°C minimiza a atividade metabólica e aumenta a vida útil do espermatozoide. O congelamento pára a atividade celular, podendo haver retorno às funções celulares normais após o descongelamento (MAZUR, 1984).

4.3 Diluidores

Segundo GONÇALVES et al. (2008) os diluidores devem ter os seguintes componentes:

- Nutrientes adequados para fornecer energia aos espermatozoides;
- Tampões que impeçam mudanças prejudiciais de pH;
- Substâncias iônicas e não iônicas para manutenção da osmolaridade;
- Antibióticos para impedir a proliferação bacteriana;
- Substâncias de proteção contra o choque térmico durante o resfriamento;
- Crioprotetores para impedir lesões das membranas e organelas na congelação.

E deve satisfazer as seguintes condições:

- Ausência de toxidez aos espermatozoides;
- Ser de baixo custo e de fácil preparo;
- Não produzir metabólitos nocivos aos espermatozoides;
- Não mascarar o exame microscópico do sêmen diluído.

Os diluidores são utilizados com finalidade de proteger as células espermáticas, oferecendo a elas um ambiente adequado durante a criopreservação. A função exercida pelos diluidores depende das substâncias que os compõe (CROWE et al., 1987), onde as mais comuns são componentes iônicos e não iônicos que mantêm a osmolaridade. Eles devem ter pH entre 6,75 a 7 já que o sêmen de mamíferos varia entre 7,2 a 7,8 (BARBAS e MASCARENHAS, 2008), capacidade tamponante, osmolaridade adequada, manter o balanço de eletrólitos para o meio, inibir o crescimento de microorganismos (VISHWANATH e SHANNON, 2000) e por fim devem proteger as células espermáticas das injúrias do processo de congelamento (SALAMON e MAXWELL, 2000), além de aumentar o volume do ejaculado

para que possa ser utilizado em maior número de fêmeas (GONÇALVES et al., 2008).

O preparo e os componentes que constituem os meios diluidores podem interferir na qualidade do sêmen congelado (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2006). Essa interação entre diluidor e espermatozoides constitui fator importante para a integridade da membrana plasmática e também para a capacidade fecundante do espermatozoide (MANJUNATH et al., 2002). Geralmente os diluidores usados em criopreservação de sêmen incluem um tampão, um ou mais açúcares ou sais de sódio e antibióticos (BARBAS e MASCARENHAS, 2008).

Os açúcares não possuem a capacidade de se difundir através da membrana plasmática, desse modo eles criam uma pressão osmótica que induz a desidratação celular e impede que haja formação de cristais de gelo intracelular. Eles também interagem com os fosfolipídios da membrana preservando por mais tempo o sêmen quando do processo de criopreservação (AISEN et al., 2000).

Em relação à classe dos tampões o diluidor Tris é um dos exemplos pelo fato de ser bastante usado em sêmen de touros e carneiros (PURDY et al., 2006; SALAMON e MAXWELL, 2000).

Os sais usados nos diluidores são representados principalmente pelo Citrato, que geralmente é associado com gema de ovo. A solução apresenta pH igual a 6,8 ou 6,9 e osmolaridade em torno de 280 a 300mOsm que é compatível com o pH do líquido seminal (BARBAS et al., 2008).

Os diluidores têm como constituintes, ainda, antibióticos com função de impedir a ação de microorganismos patógenos durante o processo de congelamento. Exemplos de antibióticos são penicilina e estreptomicina. Essas substâncias têm concentrações ideais a serem utilizadas, caso contrário podem ser tóxicas aos espermatozoides (BARBAS et al., 2008).

Também são componentes dos diluidores os crioprotetores, responsáveis por evitar o choque térmico e oferecer energia (VISHWANATH e SHANNON, 2000; AIRES et al., 2003).

4.4 Crioprotetores

Os crioprotetores são substâncias necessárias para a criopreservação dos espermatozoides, pois protegem a célula espermática contra os danos inerentes ao processo de congelamento e descongelamento. Porém, também são componentes que podem interferir na congelação dependendo de quais crioprotetores são utilizados (LIU et al., 1998; GUTHRIE et al., 2002). São importantes para evitar a formação de gelo intracelular (MEDEIROS, 2002). Altas concentrações de crioprotetores são deletérias ao espermatozoide, devido a sua toxicidade, e podem resultar na redução da fertilidade. O mecanismo de ação ocorre pela redução do ponto de congelamento da solução, o qual é determinado como a temperatura onde ocorre a formação dos primeiros cristais de gelo puro (GUTHRIE et al., 2002).

A estrutura molecular é um parâmetro importante para determinar a eficiência dos crioprotetores, uma vez que possuem afinidade pela água o que é devido a presença de grupamentos amina e hidroxila em sua composição, os quais favorecem a formação de pontes de hidrogênio com as moléculas de água (BAUDOT et al., 2002). Os açúcares, proteínas, e polímeros sintéticos são crioprotetores extracelulares, ou seja, não penetram na célula espermática. Eles agem no meio extracelular aumentando a pressão osmótica que induz a desidratação da célula (CELEGHINI et al., 2008). Eles se comportam como solutos não como solventes (GRAHAM et al., 1996). Os mais comumente usados são açúcares, leite e gema de ovo, porém a desvantagem é que como são de origem animal existe certo risco de contaminação por patógenos associados aos produtos além de dificultar a padronização do meio diluidor. Dessa maneira surgiu a lecitina de soja, uma alternativa que não possui origem animal (THUN et al., 2002; DE LEEUW et al., 2000).

Os crioprotetores penetrantes atuam tanto no meio intra como extracelular e os mais utilizados são glicerol, etilenoglicol e as amidas (WATSON, 2000). Têm a capacidade de proteção intracelular das células espermáticas (NASH, 1966). O mecanismo de ação destes crioprotetores baseia-se em moléculas que promovem ligações de hidrogênio com as moléculas da água. Estas ligações mudam a orientação da molécula da água

nos cristais de gelo, criando um ambiente menos nocivo para as células (DALIMATA e GRAHAM, 1997).

O crioprotetor intracelular mais utilizado no congelamento de sêmen bovino é o glicerol. Ele exerce função tanto extra como intracelular. Sua ação extracelular atua na desidratação osmótica da célula com consequente diminuição do volume de água intracelular, já sua ação intracelular é de permear a membrana celular e assim reduzir o estresse osmótico (MEDEIROS et al., 2002; VISHWANATH et al., 2000; AIRES et al., 2003). Outros crioprotetores intracelulares utilizados em menor escala são o dimetilsulfóxido, 1,2-propanodiol e o etilenoglicol. A substituição do glicerol por crioprotetor de menor toxicidade aumenta a sobrevivência dos espermatozoides sem reduzir sua capacidade fecundante após a descongelação (LEITE et al., 2011).

4.4.1 Etapas do resfriamento do sêmen

A refrigeração do sêmen diluído se inicia com a amostra em temperatura fisiológica, próxima a 37°C, até atingir temperatura entre 5°C e 0°C, período, este, de adaptação do espermatozoide a fim de reduzir seu metabolismo (MAZUR, 1984). Segundo SALAMON e MAXWELL (2000), a fase de equilíbrio tem sido considerada como o tempo total em que a célula espermática permanece em contato com o glicerol e os outros componentes do diluente antes da congelação, estabelecendo um balanço entre o meio intra e extracelular. Sabe-se que a interação entre glicerol-espermatozoide é rápida, portanto o tempo de equilíbrio parece ser importante para que as membranas plasmáticas se adaptem às baixas temperaturas (MUIÑO et al., 2007). O objetivo do tempo de equilíbrio a certas temperaturas é permitir a translocação da água e reduzir o efeito negativo da formação de cristais de gelo durante a congelação e descongelação (LEITE et al., 2011).

A refrigeração do sêmen pode ser feita em refrigeradores, isopor, caixas térmicas ou outros recipientes. O processo de refrigeração rápido de sêmen de 30°C para temperaturas próximas a 0°C pode ser letal para os espermatozoides, desse modo a refrigeração deve ser feita de maneira cuidadosa (WATSON, 2000). Esse processo aumenta a permeabilidade das

membranas espermáticas, afetando a regulação do cálcio e conseqüentemente a função da célula (WATSON, 2000), havendo também a redução da motilidade na descongelação (MEDEIROS et al., 2002).

A taxa de refrigeração do sêmen diluído pode influenciar significativamente a sobrevivência espermática após a congelação (SALAMON e MAXWELL, 2000). Se o resfriamento for feito de maneira inadequada, o espermatozoide sofre um fenômeno conhecido como choque térmico, a qual induz danos irreversíveis ao espermatozoide que se caracterizam por alterações nos padrões normais de motilidade (movimento circular ou retrógrado), perda rápida de motilidade, danos ao metabolismo, membrana plasmática e acrossomo (GRAHAM, 1996; OSÓRIO, 2008).

4.4.2 Etapa de congelamento do sêmen

Para algumas espécies de mamíferos apenas o resfriamento do sêmen é possível, como é o caso do suíno. Entretanto, é possível congelar o sêmen da maioria das espécies de mamíferos, e para tanto passam tanto pela etapa de resfriamento como pela etapa de congelamento, até chegarem a uma temperatura de -196°C , sendo conservados em nitrogênio líquido por um prolongado período de tempo (CURRY, 2000).

A congelação altera a estrutura da membrana e quando uma solução é submetida a temperaturas abaixo do ponto de congelamento cristais de gelo são formados fora da célula, solutos se concentram na fração restante de água, o que aumenta a pressão osmótica extracelular. A duração da exposição dos espermatozoides a estes eventos pode ser minimizada por uma taxa de congelamento rápida. No entanto, a taxa deve ser lenta o suficiente para permitir que água deixe a célula por osmose, prevenindo, assim, a formação intracelular de gelo, a qual é potencialmente letal (WATSON, 2000).

A velocidade de resfriamento usada varia de protocolo para protocolo, geralmente têm se utilizado velocidades de congelamento que vão desde -10°C a -100°C por minuto, conseguindo boas taxas de sobrevivência pós-descongelação (SALAMON e MAXWELL, 2000). O desafio da célula espermática durante o processo de congelamento não é sua habilidade em

resistir à temperatura de armazenamento de -196°C , mas sim sua capacidade de suportar mudanças que ocorrem durante as zonas intermediárias de temperatura (19°C a 8°C e -15°C a -60°C), pela qual elas devem passar duas vezes, durante o congelamento e o descongelamento (MAZUR, 1984). As células espermáticas resistem bem à redução de temperatura, porém não suportam a formação de cristais de gelo, o que induz o desequilíbrio osmótico e consequente desidratação celular (HOLT, 2000).

4.4.3 Pós-congelamento

Os espermatozoides que são congelados em curva lenta requerem uma curva de descongelamento lenta, para permitir o descongelamento dos cristais de gelo extracelulares. O descongelamento desses cristais provoca a dissolução dos solutos e lentamente ocorre a reidratação das células. Se o sêmen for descongelado bruscamente, os cristais de gelo descongelam-se muito rapidamente e a água do meio extracelular invade o meio intracelular, provocando ingurgitamento e danos na membrana plasmática (AMANN e PICKETT, 1987; HOLT, 2000). Dentre os fatores que afetam o descongelamento estão o tipo de envase, espessura da parede da palheta e condutividade de calor e a temperatura. A temperatura e tempo utilizados rotineiramente são 37°C por 30 segundos (HOLT, 2000). Porém, existem outros protocolos de descongelação em que se utilizam temperaturas altas, como 75°C por 7 segundos seguido de imersão imediata em banho-maria a 37°C por mais 5 segundos (ARRUDA et al, 1992).

Para fecundar um oócito, o espermatozoide precisa apresentar pelo menos quatro atributos pós-descongelamento (AMANN e PICKETT, 1987):

- Metabolismo para a produção de energia;
- Motilidade progressiva;
- Enzimas acrossomais intactas, necessárias para a penetração do espermatozoide através das estruturas que circundam o oócito;

- Proteínas de membrana plasmática, importantes para a sobrevivência da célula espermática dentro do trato reprodutivo feminino e para a junção da mesma ao oócito no momento da fecundação.

Para saber o potencial fecundante dos espermatozoides após serem descongelados são realizados testes para avaliar características como motilidade, vigor, porcentagem de células vivas e mortas, modificações ultraestruturais e bioquímicas, reação acrossômica, entre outros. Para tais características existem testes específicos que, em combinação com outros, estimam com maior acuidade o potencial fecundante do sêmen (EVANS e MAXWELL, 1987). Entre os testes mais utilizados estão a motilidade progressiva retilínea, patologia espermática, teste de termoresistência rápido, teste hiposmótico e coloração Giemsa (CBRA, 1998; COSTA et al., 2010).

A motilidade progressiva retilínea e o vigor espermático são testes rotineiros usados para avaliar a viabilidade dos espermatozoides. Estes estão entre os principais parâmetros na avaliação da capacidade fecundante do sêmen. A motilidade é expressa em porcentagem conforme a proporção de espermatozoides que apresentam mobilidade. É uma avaliação subjetiva, podendo estar sujeita a variação na dependência do treinamento técnico. Esses índices apresentam correlação com a fertilidade do sêmen, sendo os padrões para sêmen congelado de bovinos de, no mínimo, 30% de motilidade com vigor 3 (CBRA, 1998; GONÇALVEZ et al., 2008). O vigor representa a força do movimento que acaba influenciando a velocidade com que os espermatozoides se movimentam, com índices que variam de 0 a 5 (CBRA, 1998).

A concentração espermática representa o número de espermatozóides na amostra e deve ser determinada utilizando câmara de Neubauer ou hemocitômetro (CBRA, 1998; GONÇALVEZ et al., 2008). Os defeitos dos espermatozoides podem ser estimados em maiores e menores, sendo essa classificação importante para classificar os efeitos sobre a fertilidade. Para avaliação é feito esfregaço com amostra de sêmen pura ou uma preparação de amostra de sêmen diluída em solução de formol-salina que deve ser avaliada entre lâmina e lamínula, denominada câmara úmida. Esta última é mais

indicada segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). Recomenda-se, para bovinos, que os defeitos maiores não ultrapassem 10% e que os defeitos menores não ultrapassem 20% (CBRA, 1998).

Os exames complementares são aqueles que não são obrigatórios. São utilizados com a finalidade de ressaltar uma característica e/ou qualidade do sêmen. Entre eles está o teste de termoresistência rápido, teste hiposmótico e a coloração Giemsa para o teste de reação acrossômica induzida (CBRA 1998).

O teste de termoresistência rápido consiste em descongelar a amostra e mantê-la em ao banho-maria, a 45°C por 30 minutos, sendo avaliada a porcentagem de espermatozoides apresentando motilidade progressiva, a cada 10 minutos (DIMITROPOULOS, 1967; CBRA, 1998). Esse teste constitui-se como uma prova de grande aplicabilidade (ARRUDA et al., 1992), principalmente por sua correlação com a fertilidade a campo. De acordo com o CBRA (1998) e HENRY e NEVES (1998) o sêmen bovino será considerado de boa qualidade se a amostra apresentar ao final do teste de termoresistência rápido pelo menos 15% de motilidade espermática progressiva retilínea e 3 de vigor espermático.

O teste hiposmótico tem sido um dos métodos usados para avaliar a integridade funcional da membrana das células espermáticas em várias espécies. Ele foi originalmente elaborado para uso com espermatozoide humano, com função de avaliar a atividade bioquímica da membrana espermática intacta (JEYENDRAN et al., 1984). O teste baseia-se na observação de espermatozoides após a incubação da amostra descongelada com solução hiposmótica. O espermatozoide será considerado íntegro se permitir a passagem da água pela membrana até o reestabelecimento do equilíbrio osmótico entre os fluidos extra e intracelular e apresentarão inchaço com posterior dobradura de cauda, já as células danificadas não apresentarão cauda dobrada (SANTOS et al. 2001; JEYENDRAN et al., 1984).

Coloração dupla de Trypan-blue e Giemsa é um método usado para avaliar a viabilidade e a condição acrossômica. Neste método o Trypan-blue detecta a população de espermatozoides vivos e mortos, e o Giemsa verifica a

presença ou ausência do acrossomo (DIDION et al., 1989). Ainda em relação à coloração, KOVACS e FOOTE (1992) também declararam que a avaliação simultânea da integridade e viabilidade do acrossoma de espermatozoides permite a diferenciação de reação acrossômica verdadeira da perda degenerativa do acrossoma após a morte celular.

4.4.4 Viabilidade após a criopreservação

O espermatozoide dos mamíferos é muito sensível ao resfriamento entre a temperatura fisiológica até próximo do ponto de congelação da água. O dano causado às células nas temperaturas entre 4°C e 5°C é denominado choque térmico e causa perda irreversível da viabilidade, pela rápida diminuição da motilidade ou surgimento anormal da mesma que passa a ser retrógrada ou circular (LEITE et al., 2011). Há também redução da taxa de glicólise, respiração celular e frutólise, aumento dos danos ao DNA e liberação de material intracelular (WATSON, 2000; HOLT, 2000). A redução da temperatura ocasiona a transformação dos lipídios da membrana plasmática que estão em estado líquido ou fluído para fase cristalina ou gel, o que conseqüentemente torna a membrana mais rígida. Outro aspecto a ser considerado é a presença, no plasma seminal, dentre outras, das proteínas BSP1, BSP3 e BSP5, coletivamente denominadas de *binder of sperm*. Estas constituem um grupo de moléculas que se liga aos fosfolipídeos da membrana espermática e atuam como fatores reguladores da capacitação espermática, estimulando o efluxo de colesterol e lipoproteínas da membrana plasmática. A preservação do plasma seminal à congelação expõe os espermatozoides às BSP e estas, ao promoverem o efluxo de colesterol, tornam os gametas mais sensíveis à criopreservação. Tal efeito pode ser minimizado pelas lipoproteínas de baixa densidade presentes nos crioprotetores extracelulares como a gema de ovo, pois estas se ligam de forma estável às BSP impedindo sua ação prejudicial sobre a membrana plasmática (MANJUNATH, 2002).

Um ponto crítico do congelamento envolve os crioprotetores que causam estresse osmótico às células espermáticas e define a proporção de espermatozoides que sobrevive à congelação (GUTHRIE et al., 2002). Os

efeitos deletérios dos crioprotetores estão relacionados a diversos fatores dentre os quais salienta-se, o aumento da permeabilidade da membrana plasmática, indução da fusão da mesma além da inibição da atividade enzimática (FAHY, 1990). Sua toxicidade pode resultar em desnaturação de proteínas e alterações das interações da actina (FAHY, 1990). O glicerol induz mudanças nos eventos citoplasmáticos por aumentar a viscosidade ao penetrar a célula espermática, causa alterações na polimerização da tubulina, na associação dos microtúbulos, no balanço bioenergético além de atuar diretamente de modo prejudicial na membrana plasmática, no glicocálix e nas proteínas de superfície celular (GRAHAM et al., 1996).

Em virtude do processo de criopreservação ocorre a peroxidação lipídica das membranas espermáticas, com geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS) que contribuem para a ocorrência de danos celulares (STRADAIOLI et al., 2007), uma vez que são responsáveis por processos como hiperativação, capacitação e reação acrossômica dos espermatozoides, bem como da fecundação (SOARES e GUERRA, 2009). Assim, o espermatozoide está continuamente susceptível a danos, uma vez que a produção controlada de ROS é de vital importância para a sua função normal, enquanto que a superprodução e/ou defesas antioxidantes inadequadas determinam estresse oxidativo, reduzindo a capacidade fecundante destas células (AITKEN et al., 1995).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Seleção de animais

O projeto foi realizado entre novembro de 2010 e julho de 2012, em cinco municípios do estado do Maranhão. Desses cinco municípios obteve-se um total de 69 (sessenta e nove) touros que foram submetidos a avaliação andrológica de acordo com os padrões do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). Na fazenda onde foi estabelecido o experimento avaliou-se 7 touros dos quais 6 (seis) desses animais foram selecionados para a etapa de criopreservação de sêmen.

Os animais selecionados pertencem à raça Nelore, com escore de condição corporal entre 2,5 e 3,5 (escala de 1 a 5, onde 1= muito magro e 5= muito gordo), com idade a partir dos dois anos. Os animais pertencem a fazenda Bom Jardim, localizada no município de Bom Jardim (MA), situado na mesorregião oeste do estado, microrregião de Itapecuru - Mirim, com latitude de 04°44'30" sul e longitude de 44°21'00" oeste, altitude de 40 metros, de clima seco com precipitação pluviométrica anual em torno de 1.700 a 2.000 mm³ e temperatura média de 30°C (mínima de 29°C e máxima de 36°C) e umidade relativa do ar em 80%.

Na avaliação andrológica foram feitos: identificação do animal, proprietário e propriedade; anamnese, exame clínico geral, exame do sistema genital e espermograma. Todas essas avaliações tiveram como finalidade verificar se os animais estavam saudáveis e aptos à reprodução.

Segundo SOARES et al. (2009), normalmente as avaliações laboratoriais realizadas com o objetivo de estimar o potencial de fertilidade de uma partida de sêmen são: motilidade espermática (%); vigor (1-5); concentração espermática (milhões/dose); anormalidades espermáticas (% - as quais são divididas em defeitos maiores e menores, onde animais selecionados apresentaram defeitos totais menores que 30%, sendo defeitos maiores < 10% e defeitos menores <20%) e teste de termoresistência rápido (TTR). O parâmetro para motilidade do sêmen foi fator de seleção imediata logo após a

colheita, onde o animal foi selecionado quando possuísse motilidade maior ou igual a 70%. Os outros parâmetros considerados foram vigor (3) e turbilhonamento (3), realizadas também imediatamente após a colheita, ainda na propriedade.

5.2. Colheita e análise do sêmen

A colheita do sêmen foi realizada pelo método de eletroejaculação (BOIJEKTOR® – 2001) em que a estimulação elétrica era feita de maneira alternada, isto é, 3 segundos de estimulação elétrica para 3 segundos sem a estimulação. Um tubo coletor previamente aquecido e mantido a 37°C recebe o ejaculado para que posteriormente esse sêmen fosse avaliado em todas as suas características, como volume, cor, aspecto, turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática.

Antes de cada colheita, era realizada a higienização do prepúcio do animal, com solução fisiológica para diminuir os riscos de contaminações do ejaculado.

Após a colheita do sêmen verificou-se o volume do ejaculado no próprio tubo coletor graduado, assim como o aspecto (que pode variar de branco leitoso a translúcido). A motilidade progressiva retilínea uniforme, vigor espermático e turbilhonamento (análise imediata) foram avaliados subjetivamente, logo após a colheita, sendo essas análises realizadas com auxílio de microscópio óptico (NOVA 107®). A patologia espermática foi avaliada no laboratório (análise tardia), em amostras armazenadas em tubos para microcentrífuga 1,5mL. Esses microtubos continham alíquotas previamente preparadas de 1mL de formol-salina, sendo acrescido 10µL de sêmen no momento da colheita. Foram feitas lâminas com 10µL de amostra de sêmen para leitura sob microscopia (Aumento de 1000x, sob óleo de imersão). Foram contadas 200 células para obtenção da porcentagem de espermatozoides normais e espermatozoides com patologias, os quais foram classificados em defeitos maiores ou menores.

5.3. Congelamento

As amostras dos touros selecionados foram colhidas e imediatamente analisadas para averiguar motilidade progressiva. O sêmen era mantido em banho-maria, a 37°C, dividido em três alíquotas iguais que eram previamente diluídas nos diferentes diluidores, na proporção de 1:1. Após análise da motilidade, foi feito o cálculo da diluição (CBRA, 1998), isto é, cálculo de quanto diluidor e crioprotetor eram necessários para atingir a concentração final de sêmen pré-determinada (concentração padronizada de 50×10^6 espermatozóide/mL). O cálculo da diluição foi feito com base nas fórmulas:

$$1^{\circ}) \text{ da concentração: } \frac{N/2}{1/10 \times 5/25 \times 1/100}$$

$$2^{\circ}) \text{ adição do diluidor: } C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$$

Onde N é o número de espermatozoides contados na câmara de Neubauer; C é a concentração e V, o volume.

Portanto, cada ejaculado foi dividido em três alíquotas, onde foi adicionado às frações os respectivos diluidores: Botu-Bov®, Nagase e o Gema-citrato de sódio, sendo estes últimos preparados no Laboratório de Reprodução Animal – UEMA. Os protocolos dos diluidores feitos no laboratório estão descritos abaixo:

Quadro 1: Composição do diluidor Nagase.

Componente	Fração
Água destilada	100 q.s.p.
Lactose	8,14g
Penicilina potássica	100.000U.I

Estreptomicina	1000mg
Gema de ovo	20mL
Glicerol	6mL

Quadro 2: Composição do diluidor Gema Citrato de sódio.

Componente	Fração
Água destilada	100 q.s.p.
Citrato de sódio	2,94g
Gema de ovo	20mL
Glicerol	7mL
Estreptomicina	0,1 g

Após a diluição, as frações devidamente identificadas foram envasadas em palhetas francesas de 0,25mL e vedadas com massa de cera. Posteriormente, as palhetas foram colocadas em máquina para congelamento de embriões e gametas (TK3000®), onde foram submetidas às curvas de congelação. A primeira curva é a de refrigeração (ou curva positiva) que começa em 28°C e chega até 5°C, com taxa de resfriamento de -0,5°C/minuto. Chegando a essa temperatura, as palhetas foram mantidas em temperatura constante por um período denominado de período de equilíbrio, permanecendo por quatro horas (para estabilização) nesta temperatura (5°C). Após este tempo, a máquina inicia a curva negativa, que terminava quando atingia a temperatura final de -120°C. As palhetas, então, foram retiradas da máquina e imersas diretamente em nitrogênio líquido para atingirem a temperatura de -196° C. Logo depois do término do processo, as palhetas foram armazenadas em botijão de nitrogênio líquido.

Foram realizadas três repetições do congelamento de cada um dos 6 (seis) touros selecionados, a fim de realizar a comparação entre os três diluidores e, verificar qual destes exerceu maior efeito deletério na congelação comparando com os dados de motilidade do sêmen a fresco.

5.4. Descongelamento e análise do sêmen após o descongelamento

A descongelação foi feita com a imersão das palhetas em água, a 37°C, por 30 segundos. Foram analisados parâmetros de motilidade progressiva retilínea, teste de termoresistência rápido (TTR), teste hiposmótico e coloração Trypan – blue e Giemsa .

O TTR foi realizado descongelando as palhetas em banho-maria, primeiramente a 37°C para averiguar a motilidade inicial e depois as palhetas foram mantidas em banho-maria, a temperatura de 45°C, durante 30 minutos, sendo avaliada a motilidade progressiva a cada 10 minutos, com objetivo de avaliar a resistência dos espermatozoides às condições impostas.

No teste Hiposmótico, as palhetas foram descongeladas em banho-maria, a 37°C, para análise de motilidade inicial. Alíquotas de 30µL de sêmen foram diluídas em 300µL de solução hiposmótica (composta por 3,68g/L de citrato de sódio + 6,75g/L de frutose homoeinizada em 500mL de água destilada). A mistura de sêmen e solução hiposmótica foi incubada por uma hora, para estabilizar, a 37°C. Outras alíquotas de 10µL das mesmas amostras foram separadas em tubos de microcentrífugas e adicionados 500µL de formol-salina para posterior cálculo de espermatozoides reativos ao HOST. Foram colocadas, entre lâmina e lamínula, 10µL de cada amostra para contagem de 100 espermatozoides, sob microscopia de contraste de fase (Aumento de 1000x, sob óleo de imersão). O cálculo do número de espermatozoides reativos ao teste Hiposmótico foi feito por intermédio da fórmula citada por MELO & HENRY (1999), a saber: $HO\% = (\% \text{ de alterações na região da cauda após teste HOST}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda antes do teste HOST})$.

Para a coloração Trypan blue e Giemsa incubou-se, em banho-maria, a 37°C, por 10 minutos, 200µL de suspensão de sêmen acrescido de 200µL de azul de Trypan. Após a incubação adicionou-se ao tubo 2mL de DMPBS® e centrifugou-se a 700g por 6 minutos (Centrífuga Excelsa II, modelo 206). Removeu-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspendido com 2mL de DMPBS®, sendo a centrifugação repetida até que a solução apresentasse cor azul pálido. Após ressuspender o sedimento final com DMPBS®, foram feitos

esfregaços fixados em metanol (C₃OH, Cromato produtos químicos LTDA.) e posterior coloração com solução Giemsa a 10%, que ficaram incubados por 40 minutos para corar. As lâminas foram, então, lavadas em água corrente e deixadas para secar ao ar. A análise foi feita sob microscopia de contraste de fase (Aumento de 400x), sendo contadas 100 células.

5.5. Análise estatística

Os dados foram analisados com auxílio do programa SAS *System for Windows*, pelo PROC Mixed e método LSD e teste de PROC. FREQ. Qui-Quadrado. O procedimento PROC Mixed foi escolhido por servir para realização de análise de modelos mistos.

Para descrição dos resultados, foram empregadas as médias, erros padrões da média e coeficientes de variação (média ± erro padrão da média) dos dados originais e os níveis de significância (p) dos dados originais.

O nível de significância usado para rejeitar H₀ (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias (tratamentos) para uma determinada variável resposta.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão mostrados e discutidos os resultados obtidos com a criopreservação de sêmen de bovinos, utilizando três diluidores diferentes (Nagase, Gema citrato de sódio e Botu bov®), em três repetições para cada animal e cada diluidor, em condições de campo, em propriedades rurais no interior do Estado do Maranhão.

Para realização do experimento, foram avaliados 69 (sessenta e nove) reprodutores, em diferentes propriedades particulares, no interior do Estado do Maranhão. Salienta-se que são animais utilizados em criadouros particulares, alguns dos quais sem programas de seleção e melhoramento genético, sem rotina de realização de exame andrológico, em condições de manejo nem sempre favoráveis. Dentre esses animais, apenas 6 (seis) foram considerados aptos à criopreservação de sêmen segundo os parâmetros do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), isto é, menos de 10% dos animais examinados. A baixa qualidade seminal encontrada pode ser por diferentes causas, como por exemplo, condições de manejo das propriedades, falta de programa de seleção e melhoramento, falta de preocupação dos técnicos das respectivas propriedades com esses parâmetros, entre tantos outros fatores.

Após a seleção dos animais, todas as amostras coletadas de sêmen foram avaliadas antes e depois da congelação. A análise da motilidade espermática subjetiva foi realizada considerando como momento zero o início dos testes realizados. Para a motilidade do sêmen fresco antes do congelamento obteve-se uma média de 79% de motilidade com desvio padrão de 0,08 para a 1ª repetição; média de 81% de motilidade com desvio padrão de 0,03 para a 2ª repetição e média de 76% de motilidade com desvio padrão de 0,09 para a terceira repetição. Esses dados demonstram que todas as amostras de sêmen estavam aptas ao processo de criopreservação.

Para o teste hiposmótico, estatisticamente não houve efeito de nenhum dos diluidores utilizados, nem efeito de nenhuma das repetições realizadas, ou seja, não houve interação entre os diluidores nem entre os diluidores e as

repetições. A Tabela 1 demonstra os valores médios e desvios padrões para os resultados obtidos pelo teste hiposmótico.

Tabela 1 - Valores médios (\bar{x}) e desvios padrão (DsP) de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico do sêmen congelado com os diluidores Nagase, Gema-citrato de sódio e Botu-Bov®, nas três repetições realizadas - São Luis - 2012.

Tratamento	1º repetição	2º repetição	3º repetição
Nagase	0,04± 0,032	0,04± 0,032	0,05± 0,024
Gema-citrato de sódio	0,06± 0,027	0,06± 0,038	0,06± 0,047
Botu-Bov®	0,03± 0,034	0,04± 0,026	0,03± 0,022

De acordo com os dados obtidos, observou-se que o Botu-Bov® teve a menor taxa de reação ao teste hiposmótico, com maior porcentagem de células espermáticas lesadas, sendo desse modo, considerado o diluidor menos eficaz neste parâmetro.

Os valores médios da motilidade progressiva retilínea pós-descongelamento avaliados pelo teste de termoresistência rápido estão demonstrados na Tabela 2. Esses valores indicam que ocorreu diferença significativa ($p < 0,05$) da motilidade progressiva retilínea entre os três diluidores em questão, porém, pelos valores mostrados observou-se que o Botu-Bov® apresentou, numericamente, os piores índices em todos os tempos (0, 10, 20 e 30 minutos), em comparação com o Gema-citrato de sódio e o Nagase. Além disso, o diluidor Nagase apresentou resultados numericamente melhores de motilidade que e o diluidor Gema-citrato, o qual apresentou valores intermediários entre os tratamentos testados. Observou-se, ainda, que os maiores valores para motilidade foram verificados, na análise estatística, nos momentos 0 e 10 minutos do teste de teste de termoresistência rápido.

Tabela 2 - Valores médios (\bar{x}) e desvios padrão (DsP) da motilidade espermática progressiva retilínea no teste de termoresistência rápida (TTR) de sêmen pós-descongelamento com os diluidores Nagase, Gema-citrato de sódio e Botu-Bov®, nas três repetições e nos tempos 0, 10, 20 e 30 minutos – São Luis - 2012.

	0	10'	20'	30'
Nagase	28,0± 12,6 ^a	15,8± 11,6 ^a	7,6± 9,8 ^a	3,2± 5,37 ^a
Gema-citrato de sódio	16,6± 20 ^b	14,4± 19,3 ^{ab}	8,8± 12,1 ^a	2,61± 4,2 ^{ab}
Botu-Bov®	5,8± 10,8 ^b	3,5± 5,3 ^b	0,3± 0,6 ^b	0,2± 0,4 ^b

Médias seguidas de letras distintas nas colunas diferem entre si pelo teste de FRIEDMAN ($p < 0,05$)

Neste experimento, o resultado obtido para o teste de viabilidade espermática mostrou diferença significativa pelo teste Qui-Quadrado, entre os diluidores e entre os diluidores e as repetições, exceto para as partidas de Nagase e Gema-citrato de sódio que, estatisticamente, não tiveram diferença entre si, sendo os valores mostrados na Tabela 3. O teste permitiu verificar que o efeito dos diluidores entre si e sobre as repetições variou significativamente ($p < 0,05$).

Tabela 3 - Médias (\bar{x}) e desvios padrão (DsP) das porcentagens de células espermáticas com acrossomo intacto (A.I.) ou acrossomo reagido (A.R.) das amostras de sêmen criopreservadas com Nagase, Gema-citrato de sódio e Botu-Bov® - São Luis – 2012.

	Nagase	Gema-citrato de sódio	Botu-Bov®
A.I.	61±7,9 ^a	59,7± 9,5 ^a	45,7±18,4 ^b
A.R.	39± 7,9 ^b	40,3±9,5 ^b	54,3± 18,4 ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para o teste do Qui-Quadrado ($p < 0,05$).

Para que o sêmen tenha boa capacidade fecundante após a criopreservação é importante que o acrossomo do espermatozoide esteja intacto. Assim, após a descongelação é possível que os espermatozoides passem pela reação acrossômica e possam fecundar o oócito. Portanto, o diluidor que apresentar maior porcentagem de células com acrossomo intacto deverá ser o que melhor índice de reação acrossômica e fecundação terá. Com base nos resultados obtidos, as amostras criopreservadas com o diluidor Nagase mostraram maior índice de espermatozoides viáveis e, portanto, com acrossomos intactos, em relação aos outros grupos testados. O diluidor Gema-citrato de sódio obteve nos testes já citados efeito intermediário em relação aos outros diluidores testados, com médias desejáveis para porcentagem de espermatozoides com acrossomo intacto. Os valores médios apresentados pelo diluidor Botu-Bov® mostrou que este foi o diluidor com menos eficácia dentre os três utilizados.

As pesquisas têm mostrado que entre os fatores que influenciam a taxa de viabilidade pós-descongelamento dos espermatozoides criopreservados pode estar o efeito que os diluidores exercem sobre o processo, como

mostrado nesse experimento. As porcentagens de espermatozoides íntegros e espermatozoides com acrossomo intacto e reagido e os números que refletem a viabilidade dos mesmos após 30 minutos descongelados demonstram essa influência. O efeito do diluidor tem sido relatado por outros autores como CELEGHINI et al.(2008), CRESPILO et al. (2006) e COELHO et al. (2000).

Os resultados que estão propostos na literatura para a motilidade espermática subjetiva aos diferentes diluidores e à taxa de fertilidade da amostra seminal não são concordantes. GARNER et al. (1997) discorrem que pode haver uma tendência a subestimar a porcentagem de espermatozoides vivos. Dessa maneira, é de suma importância que se faça testes complementares para que a subjetividade seja descartada (TARTAGLIONE e RITTA, 2004; MUKHPADHYAY et.al., 2010).

Para o teste hiposmótico, as células foram classificadas quanto à presença ou não de cauda dobrada, segundo descrito por KUMI-DIAKA (1993). Os percentuais médios de espermatozoides com membrana plasmática intacta foi de $5 \pm 0,01$, o que diferiu dos percentuais de BRITO et.al. (2003), que obtiveram diferença significativa entre os dados. Esses percentuais foram também muito inferiores em comparação àqueles relatados na literatura para sêmen bovino congelado de $48 \pm 4,7$ (CORREA e ZAVOS, 1994), $43,8 \pm 13,4$ (ROTA et al., 2000), $58,8 \pm 2,6$ (TARTAGLIONE e RITTA, 2004), $37,9 \pm 7,9$ (SIQUEIRA et al., 2007). Essa discordância deve-se, provavelmente, às diferenças na metodologia utilizada. A exemplo de SIQUEIRA et al. (2007) utilizou-se volume de solução hiposmótica e tempo de incubação diferentes. Além disso, nos experimentos citados houve ajuste da osmolaridade da solução, que não foi realizado no presente trabalho, o que pode ter influenciado negativamente o efluxo da solução hiposmótica para dentro da célula espermática e, conseqüentemente, a contagem das células responsivas ou não ao teste. A baixa resposta ao teste HOST após o descongelamento provavelmente foi causada, também, por danos na cauda dos espermatozoides durante o processo de congelamento/descongelamento, o que diminui a capacidade das células de reagirem ao aumento de volume celular em resposta à baixa osmolaridade (HOSSAIN et al. 1998). Além disso, o próprio

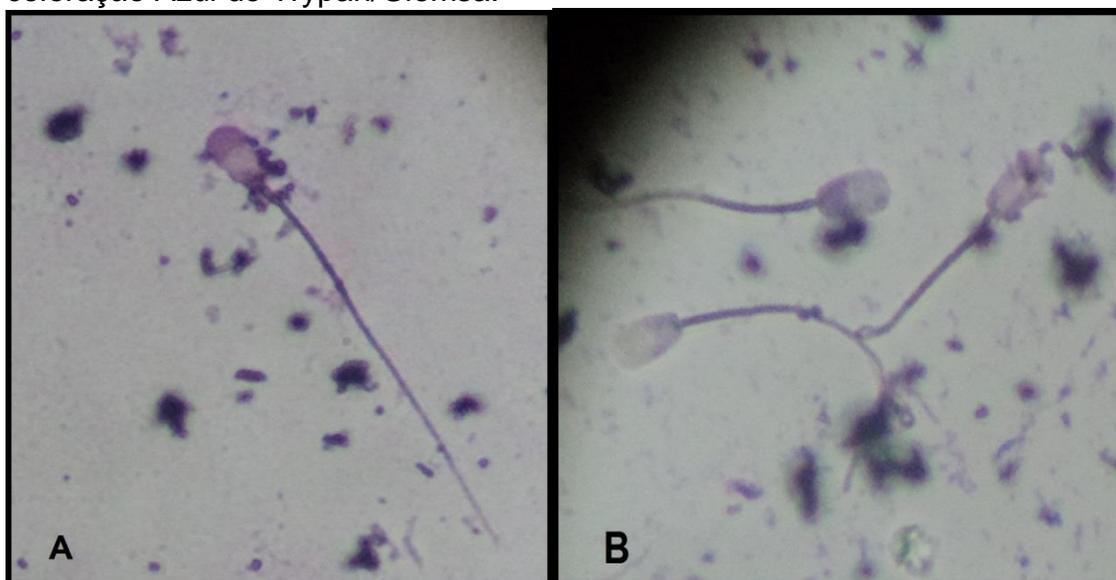
meio de congelamento pode acarretar ruptura de membrana e mudanças nas estruturas microtubulares da cauda (CORREA e ZAVOS, 1994).

Segundo as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998) o limite mínimo para o uso comercial de palhetas com sêmen congelado é de 15% de espermatozoides móveis na amostra, ao final do teste de termoresistência. Dessa maneira, as partidas analisadas não estão de acordo com os padrões estabelecidos, sendo o Nagase o único diluidor que alcançou valores desejáveis para a primeira e terceira repetições e apenas para os tempo 0 e 10'. Os diluidores Gema-citrato e Botu-Bov® não obtiveram resultados dentro dos padrões, sendo o Botu-Bov® o que apresentou os índices mais baixos. Os melhores resultados foram apresentados pelo diluidor Nagase, com médias de 28,61% (tempo 0), 18,61% (tempo 10'), 8,33% (tempo 20') e 3,27% (tempo 30'). Esses dados são muito inferiores quando comparados com os expostos por SIQUEIRA et al. (2007) que apresentou resultados com médias de 53,48% (tempo 0), 43,69% (tempo 60'), 35,88% (tempo 120') e 33,04% (tempo 180'). Essas diferenças entre os resultados obtidos no presente trabalho e os dados de literatura podem ser explicadas pelas condições experimentais, pois o presente trabalho foi realizado em propriedades rurais, nem sempre sob condições adequadas de controle de temperatura ambiente.

Pesquisas sobre a correlação entre os resultados do TTR e a fertilidade em bovinos são escassas (DIMITROPOULOS, 1967; ARRUDA et.al., 1992). Tais achados podem estar relacionados à própria metodologia empregada na realização do TTR, que submetem a amostra a condições não fisiológicas como estresse térmico (46°C) e osmótico (osmolaridade acima de 1000mOsm/L determinada pelo uso do crioprotetor glicerol) que não estão presentes nas reais condições encontradas pelos espermatozoides no trato reprodutivo feminino (CRESPILHO et al., 2006). No entanto, a grande aceitação do teste se deve ao fato de que este possui uma correlação positiva e altamente significativa com a fertilidade a campo, avaliada por meio da taxa de prenhez aos 60 e 90 dias (DIMITROPOULOS, 1967; BARNABE et. al., 1981).

Para integridade de membrana plasmática têm sido empregados vários testes, entre eles a coloração supra-vital Trypan-Blue e Giemsa (BRITO et al. 2003, ARRUDA et al., 2010, TARTAGLIONE e RITTA, 2004). Após a contagem das células obteve-se a porcentagem de espermatozoides com acrossomo intacto que se corou de rosa/vermelho e a porcentagem de espermatozoides sem acrossomo que se encontrou, descolorado, metodologia adaptada de FELICIANO SILVA, 1998 e DIDION et. al, 1989 como é mostrado na Figura 1.

Figura 1 - Classificação de espermatozoides analisadas pela técnica de coloração Azul de Trypan/Giemsa.



Legenda: A: Espermatozoide com acrossomo intacto. B: Espermatozoide sem acrossomo. Fotografia digital obtida a partir da ocular do microscópio. Aumento mínimo de 1000X.

As médias obtidas para células com e sem acrossomo intacto e corroboraram com os resultados de BERTOZZO e ZÚCCARI (2009), em que houve queda no número de espermatozoides com membrana acrossomal íntegra, provavelmente pelo fato de que o próprio processo de criopreservação causou injúrias à membrana por provocar formação de cristais de gelo (HOLT et al., 2000). Além disso, o processo de criopreservação pode ser responsável por promover uma capacitação parcial ou completa da célula espermática (CORMIER et. al., 1997) onde cerca de 30% dos espermatozoides bovinos

pós-descongelamento apresentam alterações compatíveis com a capacitação espermática (GIL et. al, 2000). Os resultados relacionados às porcentagens de espermatozoides com acrossomo intacto e reagido em amostras submetidas à centrifugação, também foi relatada em estudos anteriores, tanto em humanos (McCANN e CHANTLER, 2000) quanto em bovinos (HOSSEPIAN DE LIMA, 2007), em que relatam que a centrifugação pode lesar a membrana acrossomal por submeter a célula espermática a uma condição diferente do trato reprodutivo da fêmea.

Observou-se, neste experimento, que em todos os resultados encontrados, o diluidor Botu-Bov® obteve os piores índices (motilidade igual a zero ao final dos testes, em todas as amostras) tanto para motilidade quanto para taxa de sobrevivência e porcentagens de espermatozoides com acrossomo intacto, o que entra em discordância com os resultados obtidos por CRESPILO et. al. (2006) que encontraram valores de $61,8\% \pm 6,1$ para motilidade com o uso de Botu-Bov®.

Os baixos índices de viabilidade espermática obtidos no presente trabalho, em especial o obtido com o diluidor Botu-Bov® podem ser associados às condições experimentais. Devido às condições ambientais (experimento realizado a campo, em propriedades rurais no interior do Estado do Maranhão), o controle de temperatura ambiente e de transporte dos diluidores não foi sempre o ideal. A temperatura para manutenção do Botu bov®, por exemplo, para que sua capacidade criopreservante seja preservada deve ser em torno dos 15°C, fato este que não ocorreu durante o transporte do mesmo para a propriedade onde o trabalho foi realizado. O mesmo princípio pode ser aplicado aos outros diluidores, pois todos eram transportados conjuntamente. Outro fator a ser considerado em relação às condições ambientais está no funcionamento da máquina de criopreservação (TK3000®), a qual requer temperatura ambiente controlada, o que nem sempre é possível a campo no Estado do Maranhão, devido às condições climáticas da região.

7. CONCLUSÕES

Concluiu-se que os diluidores testados em protocolo de criopreservação de sêmen bovino não obtiveram resultados desejáveis para uso a campo em propriedades rurais do Estado do Maranhão.

Ao avaliar a viabilidade espermática antes e após a criopreservação, concluiu-se que o protocolo utilizado influenciou negativamente a viabilidade espermática após o processo. Nas condições experimentais apresentadas, os diluidores Botu bov®, Nagase e Gema-citrato de sódio não apresentaram resultados satisfatórios de viabilidade espermática após a criopreservação de sêmen segundo os parâmetros do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), sendo recomendado à adequação dos protocolos ao clima característico da região.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. **Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa.** Equine Veterinary Practice, v.7, n.3, p.145-173, 1987.

AISEN, E.G.; ALVAREZ H.L.; VENTURINO, A.; GARDE, J.J. **Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ramsemen diluents.** Theriogenology, v.53, p.1053 –1061, 2000.

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.269-79, 2003.

Aitken R.J., Ryan A.L., Curry B.J., Baker M.A. **Multiple forms of redox activity in populations of human spermatozoa.** Molecular Human Reproduction, v.9, p.645-661, 2003.

ANDRABI, S.; MAXWELL, W. **A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species.** Animal Reproduction Science, v.99. p. 223-243. 2007.

ARRUDA, R.P.; BARNABE, V.H.; ALENCAR, M.M.; BARNABE, R.C. **Avaliação de sêmen congelado de bovinos. Provas lenta e rápida de Termoresistência: efeitos sobre a fertilidade.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v.29, n.1, p.131-137, 1992.

ARRUDA, R.L.; ORRO, I.R.; PASSOS, T.S.; COSTA e SILVA, E.V.; ZÚCCARI, C.E.S.N. **Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros.** Revista Brasileira de Reprodução Animal., v.34, n.3, p.168-184, 2010. Disponível em www.cbra.org.br

BALL, B.A.; VO, A. **Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectant on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential.** Journal of Andrology, v. 22, p. 1061-1069, 2001.

BARBAS, J.P.; MASCARENHAS, R. D .**Cryopreservation of domestic animal sperm cells**. Cell and tissue banking, v. 10, p. 49-69, 2008.

BARNABÉ, V.H.; BARNABÉ, R.C.; VISINTIN, J.S.; **Estudo comparativa entre as provas rápidas e lenta de termoresistência para avaliação de sêmen congelado**. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.4, n. 3-4, p. 7-12, 1981.

BAUDOT, A.; CAULA, C.; DUARTE, M.L.; FAUSTO, R **Thermal study of simple aminoalcohol solution**, Cryobiology, v.44, p.150-160, 2002.

BERTOZZO, B.R., ZÚCCARI, C.E.S.N. **Efeito da adição de colesterol ao meio de incubação do sêmen bovino congelado sobre a integridade das membranas plasmática e acrossomal**.

BORGES, J.C.; SILVA, M.R.; GUIMARÃES, J.D.; ESPER, C.R.; FRANCESCHINI, P.H. **Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação**. Revista Brasileira de Reprodução Animal., Belo Horizonte, v.35, n.3, p.303-314, jul./set. 2011. Disponível em: www.cbra.org.br.

BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; BILODEAU – GOESSELS, S.; PANICH, P.L; KASTELIC, J.P. **Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with *in vitro* fertilization rate**. Theriogenology, v.60, p.1539-1551, 2003.

CASTELO, T.S.; FROTA, T.R.; SILVA, A.R. **Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos**. Acta Veterinaria Brasilica. v.2, n.3, p.67-75, 2008.

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

CELEGGHINI, 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.

COELHO, L.A.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; VANTINI,R.; ALMEIDA Jr, I.L.. **fecundação *in vitro* de ovócitos bovinos com sêmen submetidos a diferentes diluidores.** Revista Brasileira de Zootecnia, v. 29, n. 2, p. 397-402, 2000.

CBRA. 1998. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2ª Ed. Belo Horizonte: CBRA, 49.

CORMIER, N., SIRAR, A., BAILEY, J.L. **Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation.** Journal of Andrology, v.18, n.4, p.461-468, 1997.

CORREA, J.R.; ZAVOS, P.M. **The hypoosmotic swelling test: its employment as assay to frozen-thawed bovine sperm membrane.** Theriogenology, v. 42, p. 351-360, 1994.

COSTA, M.Z.; OLIVEIRA, L.Z.; RESENDE, M.V.; LUCIO, A.C.; PERINI, A.P.; MIGUEL, M.C.V.; LIMA, V.F.M.H. **Induction of the acrosome reaction test to *in vitro* estimate embryo production in Nelore cattle.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia., v.62, n.4, p.771-777, 2010.

COTTORELLO, A.C.P.; HENRY, M. **Princípios da criopreservação, congelação e avaliação do sêmen eqüino.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.26, n.1, p.14-25, 2002.

CRESPILHO, A.M.; PAPA, F.O.; ALBERTI, K.; SIQUEIRA FILHO, E.R.; MARTINS Jr A.; NOVAES, J.L.C.; DELL'AQUA, J.A. **Eficiência comparativa entre dois diluidores para a congelação de sêmen bovino sobre os padrões de motilidade e integridade de membrana plasmática.** Ars Veterinária, v. 22, n. 3, p. 229-235, 2006.

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CARPENTER, J.F. **Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars.** Biochemical Journal, v.242, p.1-10, 1987.

CROSS N. **Role of cholesterol in sperm capacitation.** Biology Reproduction, v.59, p.7-11, 1998.

CURRY, M.R. **Cryopreservation of semen from domestic livestock.** Journals of Reproduction and Fertility. v.5, p.46 - 52, 2000.

DALIMATA, A.M.; GRAHAM, J.K. **Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose.** Theriogenology, v.48, p.831-841, 1997.

DE LEEUW, A.M.V.W.; 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 soybean extract.** Theriogenology; v.54, p.57-67, 2000.

DHAMI, J.A.; SAHNI, K.L. **Evaluation of different cooling rates, equilibration periods and diluents of effects on deep-freezing, enzyme leakage and fertility of taurine bull spermatozoa.** Theriogenology, v.40, p.1269-1280. 1993.

DIAS, J.C.; ANDRADE, V.J.; FRIDRICH, A.B. **Aspectos andrológicos, biometria testicular e parâmetros genéticos de características reprodutivas de touros nelores, de dois e três anos de idade, criados extensivamente no Mato Grosso do Sul.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. v.58, p.388-393, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s010209352006000300016&script=sciarttext>.

DIDION, B.A.; DOBRINSKY, J.R.; GILES, J.R. **Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species.** Gamete Research. v.22, p. 51-57, 1989. DIMITROPOULOS, R. **La signification du test de la thermorésistance dans l'appréciation de la valeur fécondant du sperma congelé.** Animal Medicine Veterinary, v.4, p.215 - 224, 1967.

DIMITROPOULOS, R. **La signification du test de la thermorésistance dans l'appréciation de la valeur fécondant du sperma congelé.** Animal Medicine Veterinary, v.4, p.215-224, 1967.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. 1987. **Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats.** Australia: Star Printery Pty Ltd, 1987, 194 p.

FAHY, G.M.; LILLEY, T.H.; LINSDELL, H.; DOUGAS, M.S.; MERYMAN, H.T. **Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms.** Cryobiology, v.27, p.247-268, 1990.

FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. **Dynamics of the mammalian sperm membrane in the process of fertilization.** Biochimica et Biophysica Acta, v.1469, n.3, p.197-235, 2000.

FRANCA, L.R.; AVELAR, G. F.; ALMEIDA F.L. **Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs.** Theriogenology, v.63, p.300 -18, 2005.

FREY, T.G.; MANNELLA, C.A. **The internal structure of mitochondria.** Trends in Biochemical Science, v.25, n. 7, p. 319-324, 2000.

GARNER, D.L.; THOMAS, A.C; JOERG, H.W.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. **Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa.** Biology Reproduction. p.1401-1406, 1997.

GIBBONS, I.R. **Chemical dissection of cilia.** Archives de Biologie, v.76, n.2, p.317-352, 1965.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica.** 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 1014p.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal.** 2 ed., São Paulo: Roca, 2008.

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

GUTHRIE, H.D.; LIU, J.; CRITSER, J. K. **Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa.** Biology of Reproduction, v.67, p.1811-1816, 2002. Disponível: <http://naldc.nal.usda.gov/download/10150/PDF>.

HAFEZ, E.S.E., **Reprodução Animal**, Editora Manole LTDA. 4ª Edição, 719 pg, 1988.

HAMMERSTED, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. **Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive**. Journal of Andrology, n. 11, p. 73-88, 1990.

HENRY, M.; NEVES, J.P. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49p.

HOLT, W.V. **Basic aspects of frozen storage of semen**. Animal Reproduction Science, v.1/3, p.3-22, 2000.

HOSSAIN, A.M.; RIZK, B.; BARIK, S. **Time course of hyposmotic swellings of human spermatozoa: evidence of ordered transition between swelling subtypes**. Human Reproduction, v.13, p. 1578-1583, 1998.

HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. **Avanços metodológicos na seleção do sexo de espermatozoides bovinos para utilização no melhoramento genético e na produção animal**. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 36, suplemento especial, p. 219-228, 2007.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN H.H., PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L J. **Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics**. Journal Reproduction Fertility, v.70, p.219-228, 1984.

KHOSRO, B.A.; ZARGHAMI, N. **Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of stress biomarkers in subfertile males**. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, v.77, p.117, 2007.

KOVACS, A.; FOOTE, R.H., **Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit sperm**. Biotechnic Histochemistry, v.67, p.119-124, 1992.

KUMI-DIAKA, J. **Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test**. Theriogenology, v.39, p. 1279- 1289, 1993.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 838p.

LEITE, P.A; SCHREDER, G.G; ALMEIDA, C.R.L.de. **Criopreservação do Sêmen Bovino**. Científica Ciências Biológicas. Saúde; v.13, p.279-86, 2011. Disponível em:
http://sumarios.org/sites/default/files/pdfs/10criopreservacao_do_semen_bovino.pdf

LIU, Z.; FOOTE, H.R.; BROCKETT, C.C. **Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolality**. Cryobiology, v.37, p.219-230, 1998.

McCANN, C.T.; CHANTLER, E. **Properties of sperm separated using Percoll and IxaPrep density gradients. A comparison made using CASA, longevity, morphology and the acrosome reaction**. International Journal Andrology, v. 23, p. 205-209, 2000.

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

MAZUR, P. **Freezing of living cells: mechanisms and implications**. American Journal of Physiology, v.247, p.125-142, 1984.

MEDEIROS C.M.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. **Current status of sperm cryopreservation: why isn't better**. Theriogenology v.57, p.327-344, 2002.

MORTIMER, S.T. **A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals**. Human Reproduction Update, v.3, n.5, p.403-439, 1997.

MUIÑO, R.; FERNANDEZ, M.; PEÑA, A.I. **Post-thaw survival and longevity of Bull spermatozoa frozen with na egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18h**. Reproduction Domestic Animal. v. 42 p.305-11, 2007.

MUKHOPADHYAY, C.S.; GUPTA, A.K.; YADAV, B.R.; CHAUHAN, I.S.; MOHANTY, T.K.; RAINA, V.S. **Effect of cryopreservation on sperm chromatin integrity and fertilizing potential in bovine semen.** *Livestock Science*. v.136, p.114–121. 2010. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871141310004270>

NAGY, S.; HALLAP, T.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ; H. **Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry.** *Animal Reproduction Science*., v.80, p.225-35, 2004.

NASH, T. **Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing.** *Cryobiology*. p.179-210, 1966.

NATH, J. **Correlative biochemical and ultrastructural studies on the mechanism of freezing damage to ram semen.** *Cryobiology*, v.9, p.240-246, 1972.

OSÓRIO, J.P.; CANISSO, I.F.; SOUZA, F.A.; SILVA, E.C. de; LIMA, A.L. **Princípios do Congelamento de Sêmen do Garanhão.** *Ciências Biológicas e da Saúde*, v.10, n.2, p.15-22, Out. 2008.

PATRAT, C.; SERRES, C.; JOUVANNET, P. **The acrosome reaction in human spermatozoa.** *Biology of the cell*, v. 92, p. 255-266, 2000.

PURDY, P.H. **A review on goat sperm cryopreservation.** *Small Ruminant Res.*, v.63 , p.215-225, 2006.

ROTA, A.; PENZO, N.; VINCENTINI, L.; MANTOVANI, R. **Hypoosmotic Swelling (Hos) As a Screening Assay For Testing In Vitro Fertility Of Bovine Spermatozoa.** *Theriogenology*, v.53, p.1415-1420, 2000.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M. **Storage of ram semen.** *Animal Reproduction*, v.62, p.77–111, 2000.

SANTOS, A.D.F.; TORRES, C.A.A.; FONSECA, J.F.; BORGES, A.M.; ROVAY, H.; GORETTI, R.G.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P.; BARBOSA, L.P.; MAFFILI, V.V.; FRAGA, D.B.M. **Uso do teste hiposmótico (HOST) para avaliar a congelabilidade do sêmen de caprinos das raças Alpina e Saanen, jovens e adultos, submetidos ao manejo com luz artificial.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.25, n.3, 2001.

SILVA, A.E.D.F. **Reação acrossômica induzida: método indicador de fertilidade dos touros.** 1 ed., 38p., Brasília – DF, Embrapa, 1998.

SIQUEIRA, J.B.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P. da; HENRY, M.; TORRES, C.A.A.; SILVA, M.V.G.B. da; SILVEIRA, T.S. **Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática in vitro.** Revista Brasileira de Zootecnia, v. 36, n.2, p. 387-397, 2007.

SISTEMA NACIONAL DE DADOS AMBIENTAIS, disponível em: <http://sinda.crn2.inpe.br/PCD/metadados.jsp?uf=9&id=30882&tipo=MET>.

SOUZA, A.F; GUERRA, M.M.P; COLETO, Z.F. **Avaliação Microbiológica do sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos.** Revista. Animal, v.43, n.3, p. 329-336, 2006. Disponível em: <http://www.fumvet.com.br/novo/revista/43/n3/329-336.pdf>.

SOARES, A.T.; GUERRA, M.M.P. **Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática.** Revista Tecnologia & Ciência Agropecuária, v.3, n.2, p.53-63, junho/2009.

STRADAIOLI, G.; NORO, T.; SYLLA, L.; MONACI, M. **Decrease in glutathione (GSM) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders.** Theriogenology, v.67, p.1249-55, 2007.

WATSON, P.F. **The causes of reduced fertility with cryopreserved semen.** Animal Reproduction Science, v.60-1, p.481-492, 2000.

TARESSON, F.; AMIR, D.; SCHINDLER, H. **Acrossome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing.** Journal Reproduction and Fertility, v.51, p.461-462, 1977.

TARTAGLIONE, C.M.; RITTA, M.N. **Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen.** Theriogenology, v.62, p.1245-1252, 2004.

THUN, R.; HURTADO, M.; JANETT, F. **Comparison of Biociphos-Plus® and TRIS egg-yolk extender for cryopreservation of bull semen.** Theriogenology, v.57, p.1087-94, 2002.

TURNER, R.M. **Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation.** Reproduction Fertility and Development, v.18, n. 2, p. 25-38, 2006.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M. **Ovum pick up and *in vitro* production in the bovine after use in several generations.** Theriogenology, v.65, p.914-925, 2006.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. **Storage of bovine semen in liquid and frozen state.** Animal Reproduction Science, v.62, n.1-3, p.23-53, 2000.