UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos cursos de Pós-Graduação

TEMPO DE EQUILÍBRIO NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN: EFEITOS SOBRE CARACTERÍSTICAS DE MOTILIDADE E DE INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS ESPERMÁTICAS DE TOUROS GIR LEITEIRO

TICIANO GUIMARÃES LEITE

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2008

Ticiano Guimarães Leite

Tempo de equilíbrio na criopreservação do sêmen: Efeitos sobre características de motilidade e de integridade das membranas espermáticas de touros Gir leiteiro

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área: Reprodução Animal
Orientador: Prof. Vicente Ribeiro do Vale Filho

Co-Orientadores:
Prof. Venício José de Andrade
Prof. Rubens Paes de Arruda
Prof. Martinho Almeida e Silva

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2008

L533t Leite, Ticiano Guimarães, 1983-
Tempo de equilíbrio na criopreservação do sêmen: efeitos sobre características de motilidade e de integridade das membranas espermáticas de touros Gir leiteiro / Ticiano Guimarães Leite. – 2008.
121 p. : il.

Orientador: Vicente Ribeiro do Vale Filho
Co-orientadores: Venício José de Andrade, Rubens Paes de Arruda, Martinho de Almeida e Silva
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Gir (Zebu) – Reprodução – Teses. 2. Sêmen – Criopreservação – Teses. 3. Espermatozóides – Motilidade – Teses. 4. Citometria de fluxo – Teses. I. Vale Filho, Vicente Ribeiro do. II. Andrade, Venício José de. III. Arruda, Rubens Paes de. IV. Silva, Martinho de Almeida e. V.Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. VI. Título.

CDD – 636.291 926

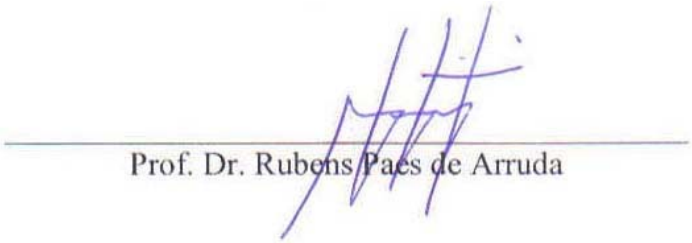
Dissertação defendida e aprovada em 28/01/2008, pela Comissão Examinadora constituída por:



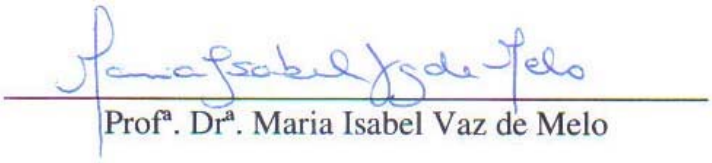
Prof. Dr. Vicente Ribeiro do Vale Filho
(Orientador)



Prof. Dr. Venício José de Andrade



Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda



Profª. Drª. Maria Isabel Vaz de Melo



Prof. Dr. Antônio Pinho de Marques Júnior

Aos meus pais, **Heber Antônio Leite** e **Maria Ana Ferreira Leite**, que sempre foram exemplos de determinação e honestidade, e que permitiram a realização dos meus sonhos.

À Minha irmã, **Emilly Anne G. Leite**, por sua grande amizade.

À **Andreza**, minha namorada, pelo amor e apoio nos momentos mais difíceis.

Dedico

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original."

Albert Einstein

"Eu sou a fonte original de toda vida.
Sou o chão que se prende à tua casa.
Sou a telha da coberta de teu lar.
A mina constante de teu poço.
Sou a espiga generosa de teu gado
e certeza tranqüila ao teu esforço.
Sou a razão de tua vida.
De mim vieste pela mão do Criador,
e a mim tu voltarás no fim da lida.
Só em mim acharás descanso e Paz."

Cora Coralina
(O Cântico da Terra)

"Se um dia tiver que escolher entre o mundo e o amor... Lembre-se. Se escolher o mundo ficará sem o amor, mas se escolher o amor com ele você conquistará o mundo."

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha família, sem a qual não teria chegado onde cheguei.

Aos meus pais pelo apoio, amizade, carinho, compreensão, pelos exemplos de caráter e dignidade, e principalmente pela confiança depositada em mim.

À minha família de BH, minha irmã **Emilly** e meu sobrinho **Luís Gustavo**, meus tios **Ivan Leite** e **Célia**, as primas **Camila** e **Cristiane**, minha tia **Itacymary**, pela ajuda e apoio incondicional. E a minha família de Goiás (tios, tias, primos), que sempre estão torcendo por mim, apesar da distância; meu primo **Renzzo**, meu melhor amigo, que sempre me deu apoio e estímulo.

À minha segunda família, **Vanessa**, **Carlos**, **Bebeto**, **Marina**, **Flávio**, e a todos os familiares dessa grande família que me acolheu como filho e que sempre me apoiaram e incentivaram.

Ao **Prof. Vicente Ribeiro do Vale Filho**, meu orientador, pela orientação, apoio, conselhos, pelos valiosos ensinamentos e principalmente pela amizade e agradável convívio durante essa caminhada.

Ao **Prof. Venício José de Andrade**, por sua grande colaboração como co-orientador, por sua amizade, companheirismo, pelos valiosos conselhos e sugestões, e pelos momentos de descontração que me trouxeram alegria nessa fase tão conturbada.

Ao **Prof. Rubens Paes de Arruda**, pela co-orientação, pelo apoio, pelo grande exemplo como profissional e pesquisador, e pela grande oportunidade de realizar parte dos experimentos nas dependências da USP em Pirassununga, e pelo grande exemplo como ser humano. Minha admiração e minha gratidão.

Ao **Prof. Martinho de Almeida e Silva**, pela co-orientação, pelas valiosas sugestões e pelo grande apoio no delineamento e nas análises estatísticas dos dados deste experimento.

Ao **Prof. Antônio de Pinho Marques Júnior**, pelos ensinamentos e pelo grande apoio durante o mestrado, por me mostrar os caminhos quando eu não conseguia enxergar, e pelos grandes conselhos nos momentos de dificuldade e de desespero.

Aos demais professores do setor de Reprodução Animal da EV-UFMG, pelos ensinamentos, sugestões e conselhos.

Ao técnico do laboratório de Reprodução Animal da EV-UFMG, **Dário Dias**, pela ajuda no laboratório.

Aos colegas **Gerusa da Silva Salles Corrêa** e **Bruno Dourado Valente**, pela ajuda com a análise estatística dos dados.

Aos amigos e colegas da pós-graduação da EV-UFMG, **Lucas L. Emerick**; **Jorge André M. Martins**; **Paulo Eduardo Machado Gonçalves**; **Fernando Andrade Souza**, **Juliano César**

Dias que contribuíram diretamente na realização desse experimento, e que me ensinaram muito sobre convívio e sobre a vida.

Aos demais colegas da pós-graduação da EV-UFMG, **Adriana**, **Raíssa**, **Letícia**, **Tadeu**, **Roane**, **Pedro Henrique**, **Luiza**, **Thiago** (minhoca), **Samuel**, **Mariana Magalhães**, **Dr. Wilson** que contribuíram com a sua amizade e torceram por mim.

Aos amigos e alunos de pós-graduação da FMVZ-USP, **André Furugen Cesar de Andrade**; **Cláudia Fernades Raphael**; **Fabiane G. Zaffalon**; **Juliana Nascimento**; **Fabian Bao** (Paraguaio) e **Simone Maria Massami Kitamura Martins** pela amizade e pela grande ajuda nas análises realizadas no CBRA da USP-Pirassununga, sem a qual com certeza esse experimento não seria o mesmo.

Aos amigos da pós-graduação da UFMG, **Lucas Maciel Cunha** e **Andréia Kelly Roberto Santos**, pela amizade e pela ajuda na correção da dissertação.

Ao **Dr. Marcos Brandão Dias Ferreira**, pela participação no projeto, pela organização e grande colaboração durante as etapas de coleta e criopreservação do sêmen, e pela disponibilização dos animais da EPAMIG, em Uberaba.

À EPAMIG e aos funcionários e estagiários da Fazenda Getúlio Vargas da EPAMIG, pela disponibilização dos animais para o experimento e pelo auxílio na realização deste.

À IMV Technologies, IVP do Brasil, pelo fornecimento do diluidor Bioxcell utilizado nesse experimento.

À TK congelação, na figura do **Sr. Motta**, pelo fornecimento das três maquinas de congelamento TK-3000, e por acreditar nesse trabalho.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, mas que, injustamente, por um lapso de memória não foram citados.

E por último, porém não menos importante, a **Andreza Formaggini Faria Moraes**, minha namorada, pelo seu amor, pelo seu carinho, compreensão, pelos sonhos compartilhados, pelo apoio incondicional, por todos os momentos inesquecíveis que passamos juntos, e por ser meu porto seguro nos momentos mais difíceis. Agradeço também por sua ajuda direta na preparação das tabelas e gráficos dessa dissertação, que com certeza foram fundamentais para minha vida e para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO 20
ABSTRACT 21
1 INTRODUÇÃO 22
2 HIPÓTESES 23
3 OBJETIVOS 23
4 REVISÃO DE LITERATURA 24
4.1 O espermatozóide 24
4.1.1 As membranas do espermatozóide 27
4.2 A criopreservação do sêmen 29
4.3 Princípios da criopreservação do espermatozóide bovino 30
4.3.1 Efeitos da variação de temperatura 31
4.3.2 Efeitos da Osmolaridade 32
4.3.3 Efeitos da formação de cristais de gelo 32
4.3.4 Efeitos das taxas de resfriamento 33
4.3.5 O tempo de equilíbrio 35
4.3.6 Efeitos das taxas de congelamento 38
4.3.7 Efeitos do descongelamento 40
4.4 Composição dos meios diluidores 41
4.4.1 Agentes crioprotetores 42
4.4.2 A função da gema de ovo 42
4.4.3 A substituição da gema de ovo 45
4.4.4 Crioprotetores intracelulares (Penetrantes) 46
4.5 Métodos de avaliação do sêmen criopreservado 48
4.5.1 A avaliação computadorizada da motilidade espermática (CASA) 49
4.5.2 Avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial 50
4.5.2.1 Integridade da membrana plasmática 51
4.5.2.2 Integridade da membrana acrossomal 52
4.5.2.3 Avaliação da função mitocondrial 52
4.5.2.4 A associação de sondas fluorescentes e a citometria de fluxo 54
5 MATERIAL E MÉTODOS 54

5.1 Locais e período do experimento 54
5.2 Animais e manejo 55
5.3 Coleta e análise do sêmen pré-criopreservação 55
5.4 Criopreservação do sêmen 56
5.5 Avaliações do sêmen Pós-criopreservação 57
5.5.1 Avaliação da motilidade e vigor (Análise subjetiva da motilidade) 57
5.5.2 Avaliação computadorizada da motilidade espermática 57
5.5.3 Análise da morfologia espermática 57
5.5.4 Análises da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial 58
5.5.4.1 Testes para o ajuste do Citômetro de Fluxo 58
5.5.4.2 Análises do Experimento no Citômetro de Fluxo 58
5.5.5 O Teste de Termorresistência (TTR) 59
5.5.6 Delineamento experimental e análises estatísticas 60
6 RESULTADOS 62
6.1 Análise computadorizada da motilidade espermática 62
6.1.1 Motilidade Total (MT) 62
6.1.2 Motilidade Progressiva (MotProg) 63
6.1.3 Velocidade do trajeto (VAP) 64
6.1.4 Velocidade progressiva (VSL) 64
6.1.5 Velocidade Curvilinear (VCL) 65
6.1.6 Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH) 65
6.1.7 Freqüência de Batimentos Flagelares (BCF) 66
6.1.8 Retilinearidade (STR) 67
6.1.9 Linearidade (LIN) 68
6.2 Análises da integridade das membranas plasmática, acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial 69
6.2.1 Membranas Plasmática e Acrossomal Intactas (AIMPI) 70
6.2.2 Membrana Plasmática Lesada (MPL) 71
6.2.3 Membrana Acrossomal Lesada (AL) 72
6.2.4 Alto Potencial de Membrana Mitocondrial (APM) 74
6.3 Teste de Termorresistência Rápido (TTR-rápido) 74
6.4 Análise da Morfologia Espermática 76
6.4.1 Morfologia pré-criopreservação 76

6.4.2 Morfologia pós descongelamento 77
7 DISCUSSÃO 81
7.1 Análise computadorizada da motilidade espermática 81
7.2 Análises da Integridade das Membranas Plasmática, Acrossomal e do Potencial de membrana Mitocondrial 87
7.3 Teste de Termorresistência Rápido (TTR-rápido) 92
7.4 Análise da Morfologia Espermática 94
8 CONCLUSÕES 96
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 96
ANEXOS 111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias ± desvios padrão da velocidade do trajeto (VAP; μm/s), de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. 64

Tabela 2 - Médias ± desvios padrão da velocidade progressiva (VSL; μm/s), de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. 65

Tabela 3 - Médias ± desvios padrão da velocidade do trajeto (VCL; μm/s), de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. 65

Tabela 4 - Médias ± desvios padrão da Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH; μm), de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. 66

Tabela 5 - Médias ± desvios padrão da Freqüência de Batimentos Flagelares (BCF; Hz), de espermatozóide bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. 67

Tabela 6 - Médias ± desvios padrão da Retilinearidade (STR; %), do movimento de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. 68

Tabela 7 - Médias ± desvios padrão da Linearidade (LIN; %), do movimento de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. 69

Tabela 8 - Médias ± desvios padrão de espermatozóides com membrana plasmática e acrossomal intactas (AIMPI, %), em sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. 70

Tabela 9 - Médias ± desvios padrão de espermatozóides com membrana plasmática lesada (MPL, %), em sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. 72

Tabela 10 - Médias ± desvios padrão de espermatozóides com membrana acrossomal lesada (AL, %), em sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. 74

Tabela 11 - Médias ± desvios padrão de espermatozóides bovinos com alto potencial de membrana mitocondrial (APM, %) criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. 74

Tabela 12 - Médias ± desvios padrão de porcentagem de espermatozóides móveis (Motsubj, %) em sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio, avaliada por microscopia óptica logo após o descongelamento. 75

Tabela 13 - Médias ± desvios padrão de porcentagem de espermatozóides móveis (Mot30, %) em sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio, avaliada por microscopia óptica 30 minutos após o início do TTR-rápido. 76

Tabela 14 - Médias ± desvios padrão de porcentagem de espermatozóides móveis (Mot60, %) em sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio, avaliada por microscopia óptica 60 minutos após o início do TTR-rápido. 76

Tabela 15 - Média ± desvios padrão da porcentagem dos principais defeitos espermáticos do sêmen bovino fresco pré-criopreservação, avaliada por microscopia de contraste de fase. 76

Tabela 16 - Médias ± desvios padrão de porcentagem de Defeitos Totais (DT, %), de espermatozóides bovinos criopreservados com dois diluidores e três tempos de equilíbrio. 77

Tabela 17 - Médias ± desvios padrão de porcentagem de Defeitos Maiores (Def. Maiores, %), de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. 78

Tabela 18 - Médias ± desvios padrão de porcentagem de Defeitos de acrossoma (Def. Acrossoma, %), de espermatozóides bovinos criopreservados com dois diluidores e três tempos de equilíbrio. 78

Tabela 19 - Médias ± desvios padrão de porcentagem de Defeitos menores (Def. menores, %), de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. 79

Tabela 20 - Médias ± desvios padrão de porcentagem de caudas dobradas (CaudaDob, %), de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. 80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema experimental _____ 61

Figura 2 – Exemplos de gráfico de pontos e tabela de porcentagens originadas pelo citômetro de fluxo na análise da integridade das membranas plasmática e acrossomal dos espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. _____ 69

Figura 3 – Exemplos de gráfico de densidade e tabela de porcentagens originados pelo citômetro de fluxo na análise do potencial de membrana mitocondrial dos espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. _____ 70

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito do diluidor sobre a motilidade total (média ± desvio padrão) dentro de cada tempo de equilíbrio, estimada por sistema computadorizado (CASA) em sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. 62

Gráfico 2 – Efeito do tempo de equilíbrio sobre a motilidade total (média ± desvio padrão) dentro de diluidor, estimada por sistema computadorizado (CASA) em sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. 62

Gráfico 3 – Efeito do diluidor sobre a motilidade progressiva (média ± desvio padrão) dentro de cada tempo de equilíbrio, estimada por sistema computadorizado (CASA) em sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. 63

Gráfico 4 – Efeito do tempo de equilíbrio sobre a motilidade progressiva (média ± desvio padrão) dentro de diluidor, estimada por sistema computadorizado (CASA) em sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. 63

Gráfico 5 – Efeito do diluidor sobre Velocidade Progressiva (média ± desvio padrão) de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio, estimada por sistema computadorizado (CASA). 64

Gráfico 6 – Efeito do diluidor sobre a Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (média ± desvio padrão) de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio, estimada por sistema computadorizado (CASA). 66

Gráfico 7 – Efeito do diluidor sobre a Freqüência de Batimentos Flagelares (BCF; Hz) (média ± desvio padrão) de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio, avaliada por sistema computadorizado (CASA). 67

Gráfico 8 – Efeito do diluidor sobre a Linearidade (LIN; %) (média ± desvio padrão) de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio, avaliada por sistema computadorizado (CASA). 68

Gráfico 10 - Efeito do tempo de equilíbrio sobre a Integridade das membranas plasmática e acrossomal (AIMPI, %) (média ± desvio padrão) avaliada por citometria de fluxo, dentro de cada diluidor, em sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. 71

Gráfico 11 – Efeitos isolados de tempo de equilíbrio e de diluidor sobre a porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática lesada (MPL, %) (média ± desvio padrão), avaliada por citometria de fluxo, em sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. 72

Gráfico 13 - Efeito do tempo de equilíbrio sobre a porcentagem de espermatozóide com membrana acrossomal lesada (AL, %) (média ± desvio padrão) avaliada por citometria de fluxo, dentro de cada diluidor, em sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. 73

Gráfico 14 – Efeitos isolados de tempo de equilíbrio e de diluidor sobre a percentagem de Defeitos totais (DT, %) (média ± desvio padrão) de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. 77

Gráfico 15 – Efeitos isolados de tempo de equilíbrio e de diluidor sobre a percentagem de Defeitos menores (Def. menores, %) (média ± desvio padrão) de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. 79

Gráfico 16 – Efeitos isolados de tempo de equilíbrio e de diluidor sobre a percentagem de espermatozóide com cauda dobrada ou enrolada (Cauda Dobrada, %) (média ± desvio padrão) de sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. 80

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação das células de acordo com a integridade das membranas plasmática e acrossomal, detectadas pelas sondas PI e FITC-PSA, respectivamente – Pirassununga – 2007. 59

Quadro 2 – Classificação das células de acordo com o potencial de membrana mitocondrial, detectado pela sonda JC-1 – Pirassununga – 2007. _____ 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL microlitro

μM micromolar

μm micrômetro

ACP Agente Crioprotetor Penetrante

AI Acrossoma Intacto

AL Acrossoma Lesado

ALH Amplitude Lateral da Cabeça

AMPc Adenosinamonofosfato cíclico

ANOVA Análise de variância

APM Alto Potencial de Membrana Mitocondrial

ATP Adenosinatrifosfato

BCF Freqüência de Batimentos Flagelares

BP filtro *Band Pass*

BSA Albumina Sérica Bovina

Ca^{2+} íon cálcio

CASA *Computer-Assisted Semen Analisys* (Análise Computadorizada do Sêmen)

CFDA Diacetato de Carboxifluoresceína

DIC *Differential interference contrast microscopy* (Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial)

DMSO Dimetilsulfóxido

DNA Ácido Desoxirribonucléico

DPBS solução tamponada salina de Dulbecco

EthD-1 Homodímero de Etidio-1

EY-LDL *Egg Yolk – Low Density Lipoprotein* (lipoproteína de baixa densidade da gema de ovo)

FITC Isotiocianato de fluoresceína

g grama

GOT *Glutamic Oxalacetic Transaminase* (glutamato oxalacético transaminase)

h horas

HDL *High Density Lipoprotein* (Lipoproteína de Alta Densidade)

H258 Hoeschst 33258

H_2O molécula de água

Hz	Hertz
IA	Inseminação Artificial
JC-1	Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
K^+	íon potássio
L	litro
LDL	*Low Density Lipoprotein* (Lipoproteína de Baixa Densidade)
LDF	*Low Density Lipoprotein Fraction* (Fração de Lipoproteína de Baixa Densidade)
LIN	Linearidade
LP	Filtro *Long Pass*
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
MPI	Membrana Plasmática Intacta
MPL	Membrana Plasmática Lesada
MT	Motilidade Total
MotProg	Motilidade Progressiva
Na^+	íon sódio
nm	nanômetro
P	nível de significância
pH	potencial hidrogeniônico
PI	Iodeto de Propídio
PNA	Aglutinina de *Arachis hypogea*
PSA	Aglutinina de *Pisum sativum*
®	marca registrada
R123	Rodamina 123
s	segundos
sptzs	espermatozóides
STR	Retilinearidade
TALP	meio de Tyrode suplementado com albumina, lactato e piruvato
VAP	Velocidade do trajeto
VCL	Velocidade curvilinear
VSL	Velocidade progressiva

Tempo de equilíbrio na criopreservação do sêmen: efeitos sobre características de motilidade e de integridade das membranas espermáticas de touros Gir leiteiro

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da criopreservação com dois diluidores e três tempos de equilíbrio sobre as características de movimento espermático, integridade das membranas plasmática e acrossomal, função mitocondrial pós-descongelamento. Foram utilizadas amostras de sêmen de 12 touros Gir leiteiro andrologicamente normais, com idade de 2 a 4 anos, coletadas por eletroejaculação e avaliadas segundo as normas do CBRA (1998). As amostras foram divididas em duas alíquotas e diluídas com diluidor Bioxcell® ou TRIS a 34ºC, com concentração de 50 x 10^6 espermatozóides/mL. O sêmen diluído foi resfriado a temperatura ambiente (25ºC) e envasado em palhetas de 0.5 mL. Para a criopreservação utilizaram-se três aparelhos automatizados (TK-3000®), com as mesmas curvas de resfriamento (-0.25°C / min) e de congelamento (-20°C / min) para todos os tratamentos, variando apenas o tempo de equilíbrio a 5ºC: 0h (T0), 2h (T2), e 4h (T4) num total de seis tratamentos. Após atingir a temperatura de -120ºC as palhetas foram transferidas para o N_2 líquido (-196 ºC) e armazenadas. Após descongelamento (37ºC/30min) foram avaliadas a motilidade espermática por sistema computadorizado (CASA); a integridade de membrana plasmática acrossomal (PI/ FITC-PSA) e potencial de membrana mitocondrial (JC-1) por citometria de fluxo; além da longevidade no teste de termorresistência rápido (TTR, 45ºC/1h). Observou-se interações entre os diluidores e os tempos de equilíbrio para as características de Motilidade Total (MT,%), Motilidade Progressiva (MotProg, %), e para a porcentagem de espermatozóides com membranas plasmática e acrossomal intactas (AIMPI, %) e membrana acrosomal lesada (AL, %). Não se registrou diferença (P>0.05) entre os tempos de 2 e 4 horas quanto a MT e MotProg, dentro de cada diluidor. Os tratamentos sem tempo de equilíbrio (T0) apresentaram os menores valores (P<0,05), diferindo de 2 e 4h, tanto para parâmetros de motilidade (MT e MotProg), quanto para a integridade das membranas plasmática e acrossomal, para ambos diluidores. Ainda para o T0 não se observou diferença (P>0,05) entre os diluidores para a MT e MotProg, e para a AIMPI e AL. O diluidor TRIS apresentou os maiores valores de MT, MotProg, AIMPI; e os menores valores de AL, nos tempos de 2 e 4h, bem como a menor proporção (P<0,05) de espermatozóides com membrana plasmática lesada (MPL, %). O tempo de equilíbrio de 4h apresentou os maiores valores (P<0,05) em relação aos parâmetros de motilidade, de integridade das membranas espermáticas, e menor percentagem de defeitos totais. O tratamento utilizando TRIS e 4h de equilíbrio apresentou os maiores valores (P<0,05) em relação à MT, MotProg, AIMPI e longevidade e os menores valores (P<0,05) de MPL e AL. Quanto à função mitocondrial, não houve efeito do diluidor e nem do tempo de equilíbrio (P>0,05). O melhor método de criopreservação foi aquele que utilizou o diluidor TRIS com 4h de equilíbrio (TRIST4). Conclui-se que o tempo de equilíbrio é necessário para preservação da motilidade total, da motilidade progressiva, da integridade das membranas plasmática e acrossomal, e a longevidade espermática, além de atuar preservando a morfologia espermática. A utilização de no mínimo 4h de equilíbrio garantiu a mais alta taxa de sobrevivência espermática.

Palavras chave: CASA, citometria de fluxo, criopreservação, sêmen, sondas fluorescentes, tempo de equilíbrio.

Equilibration time on semen cryopreservation: effects on characteristics of motility and spermatic membranes integrity in dairy Gir bulls

ABSTRACT

Aiming to evaluate effects of cryopreservation with two extenders and three equilibration times on the characteristics of spermatic movement, integrity of plasmatic and acrossomal membranes, mitocondrial function pos-thawing, semen samples from 12 dairy Gir bulls, 2 to 4 years old, andrologically normal (CBRA, 1998), collected by eletroejaculation were used. The semen samples were divided in two aliquots and diluted with extender Bioxcell® or TRIS to 34ºC, (50 x 10^6 sperms/mL). Thereafter cooled to room temperature (25ºC) and packaged in 0.5 mL straws. For cryopreservation three automated machines were used (TK-3000®), with the same cooling (- 0.25ºC / min) and of freezing rates (- 20°C / min) for all treatments, varying only the equilibration time at 5ºC: 0h (T0), 2h (T2), and 4h (T4) in a total of six treatments. After reaching -120ºC the straws were transferred to liquid N2 (-196 ºC) and stored. After thawing (37ºC/30min) the semen was evaluated for sperm motility using CASA system; integrity of acrossomal plasmatic membrane (PI / FITC-PSA) and potential of mitocondrial membrane (JC-1) by flow cytometry, besides sperm longevity in thermoresistance test (TRT at 45ºC/1h). Interaction among extenders and the equilibration times for total motility characteristics (MT,%), progressive motility (MotProg,%), and for percentage of spermatozoa with plasmatic and acrossomal membranes intact (AIMPI,%) and acrosomal membrane harmed (AL,%) were observed. No difference (P>0.05) between the 2 and 4 hours for MT and MotProg, within each extender was registered. T0 presented the lowest results (P <0.05) differing from 2 and 4 hours, for MT and MotProg, as well as for the integrity of the plasmatic and acrossomal membranes, for both extenders. No difference (P>0.05) for T0 was observed between the extenders for MT and MotProg, and for AIMPI and AL. TRIS presented the highest results of MT, MotProg, AIMPI; and lowest for AL, in times of 2 and 4 hours, as well as to lowest proportion (P <0,05) of spermatozoa with damaged plasmatic membrane (MPL,%). Four hours presented the highest results (P<0.05) in relation to the motility, integrity of spermatic membranes, and the lowest percentage of total sperm defects. Treatment using TRIS and 4 hours of equilibration presented the highest results (P <0.05) in relation to MT, MotProg, AIMPI, and longevity and the lowest for MPL, AL. In relation to mitocondrial function, there was no effect neither for extender nor for the equilibration time (P>0.05). TRIST4 was the best cryopreservation method. It was concluded that the equilibration time is needed for preservation of MT, MotProg, percentage of AIMPI, and spermatic longevity, besides acting preserving the spermatic morphology. At least 4h of equilibration time presented the highest sperm survival.

Keywords: CASA, cryopreservation, flow citometry, fluorescent probes, equilibration time, semen.

1 INTRODUÇÃO

A pecuária no Brasil é uma atividade de extrema importância para a economia, visto que o país possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo e por se destacar pelo elevado potencial efetivo e perspectiva de crescimento (Dias, 2004; Celeghini, 2005). Neste contexto, as raças zebuínas e seus cruzamentos apresentam grande importância na formação dos rebanhos brasileiros, representando cerca de 80% do efetivo bovino nacional (Cartaxo et al., 2001).

O Brasil é o sexto maior produtor de leite do mundo e cresce a uma taxa anual de 4%, superior a de todos os países que ocupam os primeiros lugares, respondendo por 66% do volume total de leite produzido nos países que compõem o Mercosul. Além disso, o leite está entre os seis primeiros produtos mais importantes da agropecuária brasileira e desempenha um papel relevante no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população (Carvalho et al., 2003).

Nos últimos anos aumentou-se a participação das raças zebuínas na composição dos rebanhos leiteiros, hoje predominantemente mestiços Holandês x Zebu, devido a uma extraordinária evolução no melhoramento das raças zebuínas para leite, particularmente nas raças Gir e Guzerá. A raça Gir vem se destacando na bovinocultura de leite graças à rusticidade, produtividade e docilidade, sendo ainda eficiente na produção de leite a baixo custo (Carvalho et al., 2003).

É inegável a grande importância do setor agropecuário para o equilíbrio da balança comercial do Brasil. A alta produtividade dos solos e a capacidade tecnológica da agricultura levaram o país a quebrar recordes de produção (Gonzalez, 2004). Porém este fato criou uma grande competitividade entre a agricultura e pecuária pelo uso da terra, destacando-se a competitividade da soja, da cana-de-açúcar para a produção de álcool ou açúcar, e do eucalipto para a indústria de celulose. Essa competitividade exige do pecuarista maior profissionalismo e eficiência visando produtividade.

Por se tratarem de animais de produção, os bovinos movimentam uma indústria altamente eficiente movida por números. Dessa forma quaisquer avanços em seus índices refletem um grande retorno aos investimentos iniciais (Alberti et al., 2004). O aumento da produtividade na pecuária nacional pode ser obtido com o emprego de biotecnologias que otimizem o sistema de produção, buscando maior produção por hectare e assim diminuindo os custos de produção. A utilização de biotecnologias aplicadas à reprodução permite maximizar o uso de genética superior, permitindo o aumento da produtividade (Celeghini, 2005). Em vista disto, ocorreram grandes avanços nas biotecnologias da reprodução animal (Soto, 2005), inseridas dentro de processos de seleção e melhoramento genético.

Dentre estas tecnologias destacam-se a inseminação artificial (IA), a transferência de embriões (TE) e a fertilização *in vitro* (FIV). Todas estas tecnologias dependem da disponibilidade de gametas viáveis e, portanto, a criopreservação de gametas é um fator fundamental para a implantação das mesmas.

A inseminação artificial em bovinos é uma biotecnologia reprodutiva de custos mais acessíveis e que serve como uma ferramenta para o melhoramento genético dos rebanhos. Todavia, para sua aplicação é indispensável o uso do sêmen criopreservado (Celeghini, 2005). Entretanto, ainda existem dúvidas sobre a real função de algumas etapas no processo de criopreservação do sêmen bovino, dentre elas se destaca o tempo de equilíbrio.

As pesquisas realizadas por Dhami et al., (1992, 1993) concluíram que um resfriamento lento do sêmen de 30ºC a 5ºC dentro de um período de 2h é essencial para uma congelabilidade ótima, isto é, motilidade espermática pós-descongelamento e fertilidade. Concluiu-se também que 2h de tempo de equilíbrio a 5ºC, foi importante para a motilidade pós-descongelamento e fertilidade a campo.

Porém, Januskauskas et al. (1999) realizaram uma pesquisa para avaliar o efeito das taxas de resfriamento rápidas e lentas sobre a integridade de membranas utilizando técnicas mais avançadas como a fluorescência e utilizando a análise computadorizada para avaliação dos parâmetros de motilidade do sêmen criopreservado de bovinos. Concluiu-se que não houve diferenças entre elas, porém neste trabalho não foi estudado o tempo de equilíbrio.

Ainda existem dúvidas da real importância do tempo de equilíbrio na criopreservação do sêmen e sobre qual o real efeito do tempo de equilíbrio sobre a integridade das membranas espermáticas. O tempo de equilíbrio é uma etapa da criopreservação do sêmen bovino que demanda um longo tempo, não existindo um consenso na literatura sobre a sua necessidade e de qual o tempo ideal de sua duração. Também existe o interesse em reduzir ou eliminar esta etapa do processo de criopreservação, tornando-a mais rápida sem perder a eficácia.

O presente trabalho visa esclarecer o efeito do tempo de equilíbrio na criopreservação do sêmen bovino e na integridade das membranas espermáticas, devido às controvérsias verificadas na literatura sobre o assunto e também pelo fato de a maioria dos trabalhos avaliarem os efeitos do tempo de equilíbrio apenas por análises subjetivas dos parâmetros de motilidade e vigor espermáticos, realizadas por microscopia óptica, aliado à escassez de informações nesta área para as raças zebuínas.

2 HIPÓTESES

1 – O tempo de equilíbrio é importante no processo de criopreservação e eliminação dessa etapa da criopreservação afeta os espermatozóides tanto nos aspectos da motilidade espermática e na porcentagem de espermatozóides móveis, quanto em relação à integridade das membranas plasmática, acrossomal, e potencial de membrana mitocondrial.

2 – A duração do tempo de equilíbrio e o tipo de diluidor empregados no processo de criopreservação influenciam a integridade das membranas plasmática, acrossomal e sobre a função mitocondrial dos espermatozóides bovinos.

3 – Existem interações entre os diluidores e os tempos de equilíbrio no processo de criopreservação que influenciam na motilidade e na integridade das membranas plasmática e acrossomal e sobre a função mitocondrial.

4 – Existem diferenças de longevidade espermática entre espermatozóides bovinos criopreservados em diluidores e tempos de equilíbrio diferentes que podem ser identificadas pelo teste de termorresistência rápido (TTR).

3 OBJETIVOS

1 – Analisar a importância e a necessidade da utilização do tempo de equilíbrio para a manutenção da qualidade e da viabilidade espermática do sêmen bovino.

2 – Avaliar os efeitos do tempo de equilíbrio e do diluidor no processo de criopreservação sobre as características da motilidade espermática e sobre a integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial, utilizando métodos objetivos e

precisos, como a avaliação computadorizada da motilidade espermática (CASA), e a citometria de fluxo.

3 – Verificar a existência de interações entre os diluidores e os tempos de equilíbrio que podem influenciar na motilidade espermática e na integridade das membranas plasmática e acrossomal e sobre a função mitocondrial dos espermatozóides.

4 – Analisar os efeitos do diluidor e do tempo de equilíbrio sobre a longevidade espermática pós-criopreservação por meio do teste de termorresistência rápido (TTR).

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 O espermatozóide

A espermatogênese é a soma total dos eventos que ocorrem nos testículos que levam à produção de espermatozóides (Johnson et al., 2000). A espermatogênese em bovinos é um processo com duração média de 60 dias. Ela pode ser dividida em três fases: 1) Espermatocitogênese, caracterizada por rápidas e sucintas divisões mitóticas; envolve a divisão mitótica das células germinativas para a produção de células tronco germinativas e espermatócitos primários; 2) Meiose, que envolve a duplicação dos cromossomos, cuja função é a recombinação e segregação do material genético; 3) Espermiogênese, onde a célula espermática sofre alterações morfológicas diferenciando-se em espermatozóide, tornando-se apta ao processo de capacitação, reação acrossômica e futura fertilização do oócito (Russel et al., 1990; Johnson et al., 2000; Soto, 2005).

O espermatozóide, célula resultante deste processo, é uma célula haplóide, revestida inteiramente por uma membrana plasmática e parcialmente por uma membrana denominada acrossomal, sendo, além disso, possuidor de flagelo para movimentação (Russel, 1993, citado por Soto, 2005).

O espermatozóide apresenta-se subdividido em cabeça, colo, peça intermediária, peça principal e peça terminal (Santos, 2003). O espermatozóide é uma célula alongada com cabeça achatada e larga contendo o núcleo espermático, e uma cauda contendo os componentes necessários para a motilidade celular. O acrossoma é uma estrutura de membrana dupla situada entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo. O colo conecta a cabeça do espermatozóide com a cauda, a qual é subdividida em peça intermediária, principal e terminal (Garner e Hafez, 1995; Cottorello, 2002a).

Toda a característica estrutural do espermatozóide está voltada para a sua atividade funcional única: assegurar a liberação do material genético contido no núcleo do espermatozóide para o oócito, onde ocorre a fusão dos pronúcleos masculino e feminino produzindo o zigoto (Eddy e O'Brien, 1994).

A principal função da cabeça do espermatozóide é liberar um conjunto haplóide de cromossomos para o oócito. A função do flagelo é promover motilidade à célula para permitir a sua passagem pelo trato genital feminino e a penetração através da zona pelúcida do oócito. As características estruturais da cabeça e da cauda do espermatozóide refletem os seus papéis funcionais (Mortimer, 1997).

O núcleo do espermatozóide apresenta a sua cromatina altamente compactada, e é responsável por um terço do peso do espermatozóide. A cromatina nuclear apresenta como principais componentes o DNA e proteínas. As proteínas, que constituem a cromatina do espermatozóide, são conhecidas coletivamente como *histonas espermáticas*, e estabilizam o DNA nuclear conjugando-se com o mesmo através de ligações sulfídricas. O núcleo espermático

de algumas espécies contém principalmente pequenas histonas espermáticas de baixo peso molecular denominadas *protaminas*, como ocorre na espécie humana, enquanto em outras espécies os espermatozóides apresentam quantidades variáveis de histonas ricas, em sua maioria, em arginina (Garner e Hafez, 1995; Sakkas et al., 1999; Cottorello, 2002a).

O acrossoma é uma organela derivada do complexo de Golgi que se dispõe sobre o núcleo como uma capa sobre a porção anterior da cabeça do espermatozóide. Esta organela contém várias enzimas hidrolíticas necessárias para a penetração da matriz extracelular do oócito (zona pelúcida) para que ocorra a fertilização (Flesch e Gadella, 2000; Ashizawa et al., 2004; Celeghini, 2005). Nessa organela distinguem-se duas membranas: a membrana acrossomal externa e membrana acrossomal interna. A membrana acrossomal interna fica em contato com a membrana nuclear; enquanto a membrana acrossomal externa está em contato com a face interna da membrana plasmática. O acrossoma consiste de dois segmentos, a capa acrossomal e o segmento equatorial. Durante a reação acrossômica, a membrana acrossomal externa e a membrana plasmática se fundem e formam vesículas, ocorrendo a liberação das enzimas e outros componentes da matriz acrossomal. A membrana acrossomal interna e o segmento equatorial persistem até a fusão do espermatozóide com o oócito (Flesch e Gadella, 2000; Ashizawa et al., 2004; Celeghini, 2005). Esta fusão ocorre entre a membrana plasmática remanescente do segmento equatorial do espermatozóide e a membrana plasmática do oócito (Crozet,1993).

Em espermatozóides bovinos a membrana acrossomal externa possui um revestimento em sua superfície interna composta de glicoproteínas com diferentes pesos moleculares que possuem afinidades às lecitinas. Múltiplas enzimas estão presentes no acrossoma como, por exemplo, a pró-acrosina e a hialuronidase. A pró-acrosina é precursora da enzima acrosina, que atua digerindo a zona pelúcida para a penetração do espermatozóide no ovócito, enquanto que a hialuronidase tem a função de dissolver as células do *cumulus oophorus*, que circundam o oócito liberado (Eddy e O'brien, 1994; Cottorello, 2002b; Celeghini, 2005).

Durante a reação acrossômica o conteúdo acrossomal é liberado por um mecanismo de exocitose e, como outros mecanismos de exocitose, a reação acrossômica pode ser estimulada por uma variedade de vias de sinalização, incluindo processos Ca^{2+}-dependentes. Nos espermatozóides de mamíferos foi demonstrada a ocorrência de vários mecanismos dependentes de Ca^{2+}, incluindo a ativação de fosfolipases C e A2, proteína quinase C e via proteínas quinases AMPc –dependetes (Ashizawa et al., 2004).

O flagelo é constituído internamente pelo axonema, uma estrutura especializada do citoesqueleto, responsável pela motilidade espermática. O axonema é formado por um anel de nove microtúbulos duplos envolvendo um par central. As dineínas e nexinas realizam a ligação entre os pares de microtúbulos. As dineínas apresentam projeções chamadas braços de dineína, que são responsáveis pela geração da força motora do flagelo. A dineína é um complexo de multisubunidades de ATPase (Gibbons, 1965) que convertem a energia química (ATP) em energia cinética, permitindo que pares de microtúbulos adjacentes deslizem um sobre o outro, causando uma curvatura do axonema e então o movimento flagelar (Mortimer, 1997; Turner, 2006).

Externamente ao axonema, o flagelo possui nove fibras densas externas, cada uma associada a um microtúbulo duplo. Cada uma dessas fibras possui um córtex e uma medula e é constituída por uma proteína semelhante à queratina, o que confere

elasticidade ao flagelo (Eddy e O'Brien, 1994; Mortimer, 1997; Turner, 2006).

A peça intermediária se estende do colo até o anulus, onde se conecta com a peça principal. É caracterizada pela presença de nove fibras densas próximas a cada um dos pares de microtúbulos e por uma bainha de mitocôndrias em um arranjo helicoidal que envolve as fibras densas e o axonema (Mortimer, 1997; Turner, 2006).

A peça principal do flagelo se estende do anulus até a peça terminal e é caracterizada pela presença da bainha fibrosa, uma estrutura do citoesqueleto que rodeia o axonema e as fibras densas externas, fornecendo um suporte no controle e restrição do movimento flagelar. Já a peça terminal é formada apenas pelo axonema, que é coberto pela membrana plasmática (Eddy e O'Brien, 1994; Mortimer, 1997; Turner, 2006).

A função fisiológica das mitocôndrias nas células é realizar a fosforilação oxidativa e produzir o ATP como fonte de energia metabólica (Frey e Mannella, 2000). A membrana mitocondrial interna é o local de produção de energia, e a posição das mitocôndrias ao redor da porção proximal do axonema sugere que elas são necessárias para o suprimento de ATP usado para a motilidade flagelar (Mortimer, 1997).

Entretanto, em adição ao seu papel de sustentação estrutural, a bainha fibrosa possivelmente desempenha um papel mais direto na regulação da motilidade do flagelo devido ao crescente número de proteínas envolvidas nas vias de sinalização da motilidade e no metabolismo, que foram localizadas na bainha fibrosa (Westhoff and Kamp, 1997; Bunch et al. 1998; Travis et al. 1998; Turner et al. 1998, 1999; citados por Turner, 2006).

A solução que o espermatozóide desenvolveu para responder à necessidade de um suprimento de ATP para os segmentos mais distais do axonema aparentemente reside na bainha fibrosa da peça principal. Aparentemente, a glicólise ocorre ao longo de todo o comprimento da peça principal e esta, e não a fosforilação oxidativa na peça intermediária, possivelmente é a fonte mais importante de ATP para a cauda. Diversas enzimas glicolíticas, incluindo hexoquinases, lactato dehidrogenase e gliceraldeido-3-fosfato dehidrogenase (GAPD-S), foram identificadas na bainha fibrosa/ peça principal de um grande número de espécies de mamíferos (Westhoff and Kamp, 1997; Bunch et al. 1998; Travis et al. 1998; citados por Turner, 2006). Além disso, todas as enzimas glicolíticas que atuam após as GAPD-S na via metabólica, permanecem ligadas ao citoesqueleto, mesmo após a remoção da membrana, sugerindo assim que elas são componentes ou da bainha fibrosa, ou das fibras densas externas (Storey e Kayne, 1975, citado por Turner, 2006).

Também foi demonstrado que o espermatozóide de mamíferos produz lactato a partir da glicose em condições aeróbicas (Storey e Kayne, 1975). E que a produção de ATP através da glicólise é necessária para a hiperativação da motilidade espermática (Hoshi et al., 1991; Urner e Sakkas, 1996); e a inibição da fosforilação oxidativa não bloqueia a fertilização (Fraser e Quinn, 1981; citado por Turner, 2006).

Prova formal da importância da bainha fibrosa/ peça principal foi fornecida por estudos com camundongos "*knockout*". Uma deleção marcada da gliceraldeído-3-fosfato dehidrogenase espermatozóide-específica, uma enzima que se localiza na bainha fibrosa, resultou em esterilidade no macho em associação com severas aberrações na motilidade espermática (Miki et al., 2004; Turner, 2006).

Assim, parece que os mamíferos resolveram o problema da difusão do ATP no flagelo

providenciando uma fonte de ATP exatamente onde ele é mais necessário, através da glicólise ao longo de toda peça principal da cauda. Portanto, segundo Turner (2006), a glicólise na peça principal, e não necessariamente a fosforilação oxidativa na peça intermediária, é necessária para uma motilidade flagelar normal nos mamíferos.

4.1.1 As membranas do espermatozóide

As membranas da célula espermática (plasmática, nuclear, acrossomal e mitocondrial) são formadas por uma bicamada de lipídeos anfipáticos que contém proteínas integrais e periféricas incrustadas nesta bicamada ou associadas a ela, organizadas como um mosaico fluido, conforme o modelo proposto por Singer e Nicholson (1972) (Parks e Graham,1992; Parks, 1997).

O modelo do mosaico fluido tornou-se mais avançado e complexo incluindo conceitos mais recentes tais como a distribuição lipídica, a assimetria da bicamada, polimorfismo dos lipídios e interações lipídeo-lipídeo e lipídeo-proteína (Parks e Graham,1992; Parks, 1997). Essas interações complexas levam à formação de domínios dentro do plano da membrana, resultando em compartimentalização da membrana plasmática. Essa compartimentalização é observada na membrana plasmática do espermatozóide, por exemplo, nas diferenças de distribuição de lipídios e proteínas entre as regiões periacrossomal e pós-acrossomal da cabeça do espermatozóide, da peça intermediária e da peça principal do flagelo. O que é surpreendente é que estes domínios de membrana são mantidos na membrana fluida apesar de esta permitir a difusão lateral dos lipídios (Amann e Pickett, 1987; Parks e Graham,1992; Santos, 2003).

Dentro de um compartimento de membrana, os lipídios normalmente são miscíveis e apresentam liberdade de movimentação lateral, o que permite que a membrana seja fluida à temperatura corporal (Amann e Pickett, 1987; Parks e Graham,1992).

As proteínas integrais podem atuar como poros ou canais na membrana, ou podem atuar como receptores de outras moléculas. Muitas proteínas integrais e periféricas possuem, aderidas a sua superfície, cadeias de carboidratos carregados negativamente, que atraem proteínas e glicoproteínas do meio externo. Esses elementos formam um verdadeiro glicocálix na superfície espermática, exercendo função primordial na interação entre essa célula e o oócito (Amann e Pickett, 1987; Valle e Silva Filho, 2001).

A composição lipídica da membrana plasmática dos espermatozóides de várias espécies de mamíferos já foi elucidada. Embora exista uma considerável variação entre diferentes espécies de mamíferos, em geral a membrana plasmática contém aproximadamente 70% de fosfolipídios, 25% de lipídios neutros e 5% de glicolípidios (em base molar) (Flesch e Gadella, 2000).

Os fosfolipídios são caracterizados por possuir um grupo polar ou hidrofílico denominado de cabeça e uma ou duas cadeias de ácidos graxos (apolares ou hidrofóbicas) que se estendem para o interior da membrana. A maioria desses lipídeos tende a formar espontaneamente uma configuração de bicamada quando em meio aquoso (Parks, 1997). Esse arranjo lamelar faz com que as cadeias de ácidos graxos promovam uma barreira hidrofóbica na qual a água e moléculas dissolvidas nela passem apenas com dificuldade. Conseqüentemente, o transporte efetivo de moléculas é feito através de canais ou poros formados pelas proteínas, existindo pouco ou nenhum transporte de moléculas hidrofílicas em regiões da membrana sem poros ou canais. Mudanças na conformação

da membrana, que podem ser ocasionadas pelo resfriamento, e que resultam em arranjos anormais dos fosfolipídeos e proteínas, permitem rápida passagem de moléculas que normalmente passariam vagarosamente através da membrana (Amann e Pickett, 1987; Santos, 2003).

Existe também diferença de composição entre os dois folhetos da membrana, que é chamada assimetria de membrana. Esta assimetria deve-se ao fato de que lipídeos com carga neutra ou positiva como a fosfatidilcolina e a esfingomielina, e os glicoesfingolípides localizam-se no folheto externo, enquanto que os fosfolipídios aniônicos como a fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e o fosfatidilinositol situam-se na porção interna da bicamada (Hammersted et al., 1990; Parks e Graham,1992; Parks, 1997; Soto, 2005) Esta assimetria transversal, possivelmente seria devido a ação da enzima aminofosfolipide-translocase, que já foi identificada no espermatozóide do carneiro, sendo que a alteração da assimetria seria responsável pelo aumento da fluidez do folheto externo da membrana durante a capacitação (Muller et al., 1994; Gonzalez, 2004).

Nas membranas, existe uma categoria de fosfolipídios que apresentam cadeias de ácidos graxos poliinsaturadas, fazendo com que eles assumam uma forma cônica, onde a base é a extremidade hidrofóbica da molécula. Devido a esta forma cônica esses fosfolipídios tendem a formar uma micela invertida, ou forma "hexagonal II", onde as extremidades hidrofóbicas são externas (base dos cones) e as hidrofílicas internas, ao contrário de uma micela clássica na qual as extremidades hidrofóbicas privam-se do contato com a água (Parks e Graham, 1992; Valle e Silva Filho, 2001).

O arranjo hexagonal não promove uma barreira de permeabilidade e provavelmente apenas ocorre transitoriamente em membranas biológicas durantes os eventos de fusão de membranas (Hammersted et al., 1990; Parks e Graham, 1992). Em condições fisiológicas estes fosfolipídios localizam-se ao redor das proteínas integrais da membrana e esta interação evita a ocorrência da forma "hexagonal II", devido às interações proteína-lipídio e ao impedimento físico exercido por essas proteínas (Parks e Graham, 1992; Valle e Silva Filho, 2001).

Segundo Quinn (1985, 1989), esses fosfolipídios formadores de micela invertida (*nonbilayer lipids*) possuem maior ponto de fusão e, por isso, quando a membrana é submetida a resfriamento, estes lipídeos são os primeiros a sofrerem uma transição de fase termotrópica (citado por Parks e Graham, 1992; Parks, 1997). Esses fosfolipídos sofrem mudança da fase líqüida-cristalina para a fase gel e então se agregam em microdomínios, enquanto os outros lipídeos e as proteínas permanecem fluidos em regiões onde ainda não ocorreu a mudança de fase. Embora este rearranjo provavelmente não afete a membrana em temperaturas baixas, quando ocorre o reaquecimento, os fosfolipídeos poliinsaturados formadores de micela invertida agregados podem desestabilizar a membrana e permitir a ocorrência da forma hexagonal II, resultando em perturbação localizada da membrana e perda da integridade da membrana. Isto leva a formação de canais hidrofílicos na membrana que permitem a passagem de íons e pequenas moléculas, o que leva a perda do controle osmótico (Parks e Graham, 1992; Parks, 1997; Valle e Silva Filho, 2001). Além disso, podem ocorrer alterações nas interações lipídeo-proteína dentro da membrana se os lipídios formadores de micela invertida não puderem restabelecer suas associações originais com as proteínas, possivelmente levando a alteração da função das proteínas (Parks e Graham, 1992).

Trabalhos realizados com resfriamento de sêmen ovino, constataram uma queda na atividade da cálcio-ATPase da membrana

plasmática, que se acentuava em temperaturas inferiores a 22ºC, devido à transição de fase sofrida pelos lipídios situados ao redor dos sítios dessa enzima (Holt e North, 1985; 1986)

As bombas de Na^+/K^+ da membrana plasmática dependem de ATP para o seu funcionamento. Assim, com o resfriamento, a queda de temperatura leva a uma produção ineficiente de ATP pela célula, o que causa despolarização da membrana com abertura dos canais de Ca^{2+}. Devido a isto, grande quantidade desse elemento entra no citoplasma, ativando as fosfolipases citoplasmáticas, com conseqüente dano à membrana e aumentando sua permeabilidade. Conclui-se, portanto, que possivelmente as células mais resistentes ao resfriamento são aquelas que possuem menor quantidade de lipídios capazes de assumir a forma hexagonal II e, dessa forma, são menos dependentes da bomba de Na^+/K^+ para controle dos canais de cálcio (Amann e Pickett, 1987; Valle e Silva Filho, 2001).

As membranas plasmáticas apresentam-se em estado de fluidez, na temperatura corpórea, sendo esta característica um pré-requisito para o desempenho de suas funções. Os principais fatores que afetam esta fluidez são sua composição relativa entre fosfolipídios e colesterol e a temperatura à qual a membrana é exposta (Amann e Pickett, 1987; Hammersted et al., 1990; Gonzalez, 2004).

O colesterol é o principal esterol presente nos espermatozóides e nas membranas celulares dos mamíferos, e possui o papel de modular a fluidez e a estabilidade da bicamada lipídica através da sua interação estérica com os fosfolipídios de membrana (Parks e Graham, 1992; Parks, 1997). Em geral, quanto maior a quantidade de colesterol presente, menos flexível, ou menos fluida é aquela porção da membrana (Amann e Pickett, 1987). Observou-se que a resistência ao choque pelo frio (cold shock) é maior nas espécies em que a proporção colesterol / fosfolipídios e o grau de saturação dos ácidos graxos ligados aos fosfolipídios da membrana plasmática são altos (Amann e Pickett, 1987; Parks e Graham, 1992; Parks, 1997; Valle e Silva Filho, 2001). A proporção colesterol/ fosfolipídios varia de aproximadamente 0,2 para espermatozóide suíno a 1,0 para o humano, o que é consistente com os efeitos de condensação e transição de fase do esterol (Parks e Graham, 1992; Parks, 1997).

Comparativamente, a membrana plasmática do espermatozóide suíno apresenta a maior quantidade de proteínas, e o menor teor de colesterol do que outras espécies; apresenta grande quantidade de glicolípidios de alto ponto de fusão; e alta proporção de fosfatidiletanolamina, um fosfolipídio formador de micela invertida. Estas características o tornam mais sensível ao choque frio. Já a membrana do espermatozóide do galo apresenta baixo teor de proteínas, baixa quantidade de fosfatidiletanolamina, teor intermediário de colesterol e a fração de glicolípidios parece não apresentar lipídios de alto ponto de fusão, que estão presentes nos espermatozóide de mamíferos. Assim, essas características moleculares das membranas do espermatozóide do galo podem lhe proporcionar grande resistência às mudanças físicas que ocorrem a baixas temperaturas (Parks e Graham, 1992; Valle e Silva Filho, 2001; Snoeck, 2003).

4.2 A criopreservação do sêmen

A disponibilidade de gametas viáveis e funcionalmente normais é um pré-requisito para uma fertilização bem-sucedida em mamíferos, tanto *in vivo* quanto *in vitro* e, por isso, é um ponto crítico para a implementação de uma grande variedade de tecnologias reprodutivas, tais como a inseminação artificial, fertilização *in vitro*, transferência de embriões e engenharia genética. Devido a isto, a criopreservação de

gametas e embriões se tornou um procedimento complementar essencial para a aplicação destas tecnologias, pois eliminam as limitações de tempo e localização (Parks, 1997).

Desde a descoberta do glicerol como agente crioprotetor efetivo para o espermatozóide do galo por Polge et al. (1949), o sêmen de uma grande variedade de espécies, incluindo o da espécie humana, vem sendo congelado e usado com sucesso para a inseminação artificial (Parks e Graham, 1992). Medido em termos do número de espécies, que tiveram seus espermatozóides criopreservados com sucesso e do grande número de animais nascidos resultantes da IA com espermatozóides criopreservados, o processo de criopreservação parece eminentemente bem-sucedido (Leibo e Bradley, 1999).

Entretanto, isto está parcialmente correto. Em média, cerca da metade de todos os espermatozóides humanos e bovinos, são danificados ou destruídos pelo congelamento, limitando a total eficiência e eficácia da preservação de sêmen. Com outras espécies, os resultados podem ser até mesmo piores e mais variáveis (Leibo e Bradley, 1999; Watson, 2000). Além disso, como demonstrado por Critser et al. (1987), mesmo aquelas células que sobreviveram ao congelamento, e que são móveis, com membranas intactas, não mantêm sua viabilidade e capacidade de fertilização por tanto tempo quanto espermatozóides não-congelados (Leibo e Bradley, 1999).

Apesar deste relativo sucesso da criopreservação do sêmen, com exceção do gado leiteiro, o sêmen criopreservado não é amplamente utilizado para a inseminação artificial de animais domésticos, em parte porque os protocolos de criopreservação não proporcionam um nível aceitável de fertilidade. A reduzida fertilidade do sêmen congelado é amplamente atribuída a alterações da estrutura e função da membrana durante o resfriamento, congelamento e descongelamento (Parks e Graham, 1992; Watson, 2000).

A sobrevivência do espermatozóide no processo de criopreservação requer uma solução simultânea de uma equação multifatorial. Dentre os fatores que influenciam neste processo incluem-se a manutenção da integridade estrutural e funcional de cada compartimento celular incluindo a membrana plasmática do espermatozóide, o acrossoma, a mitocôndria, o citoesqueleto, o núcleo e o glicocálix (Hammersted et al., 1990; Graham, 1996a; Melo, 1999).

4.3 Princípios da criopreservação do espermatozóide bovino

A criopreservação do sêmen busca a suspensão do metabolismo espermático e a manutenção de suas características por um período de tempo prolongado. O sucesso da criopreservação do sêmen depende da manutenção do potencial fertilizante dos espermatozóides, que devem apresentar integridade e funcionalidade de diferentes estruturas celulares (Amann e Pickett, 1987; Hammersted et al., 1990; Celeghini, 2005).

Segundo Amann e Pickett (1987), para que o espermatozóide seja capaz de fertilizar o oócito, ele precisa reter pelo menos quatro atributos básicos pós congelamento e descongelamento:

a) Metabolismo para a produção de energia;
b) Motilidade progressiva;
c) Enzimas acrossomais, que são essenciais para a penetração do espermatozóide através das estruturas que circundam o oócito;
d) Proteínas da membrana plasmática, que são importantes para a sobrevivência do espermatozóide dentro do trato reprodutivo feminino e para a ligação do mesmo com a membrana do oócito durante a fertilização.

O processo de criopreservação do sêmen é dividido em passos distintos: diluição, resfriamento, congelamento, armazenamento, e descongelamento. Cada um desses passos tem sua relação com a estrutura funcional das membranas e metabolismo celular (Hammersted et al., 1990; Celeghini, 2005). A preservação das estruturas espermáticas após o congelamento é obtida por uma interação entre diluidor, crioprotetor, curvas de resfriamento e congelamento, e descongelamento, buscando minimizar os danos causados pelo choque frio, formação de cristais de gelo e desidratação celular (Amann e Pickett, 1987; Celeghini, 2005).

Durante os processos de congelamento e descongelamento, os espermatozóides estão sujeitos a uma variedade de estresses. Dentre esses se incluem a adição de crioprotetores antes do congelamento, mudanças de volume, distensão e encolhimento da membrana em conseqüência da exposição a condições hiperosmóticas causadas pelos crioprotetores e pela desidratação induzida pelo congelamento, a mudança de fase termotrópica e liotrópica dos fosfolipídios de membrana, e os efeitos da elevada concentração de solutos e a formação de cristais intracelulares que são dependentes da taxa de resfriamento (Parks e Graham, 1992; Holt, 2000).

4.3.1 Efeitos da variação de temperatura

A célula espermática não está adaptada para passar pelas variações de temperatura envolvidas no processo de criopreservação (Holt, 2000). Alterações na motilidade e na estrutura dos espermatozóides ocorrem simultaneamente nas diferentes etapas de congelamento e descongelamento. Quando o resfriamento do sêmen dos ungulados é realizado muito rápido entre 30ºC e 0ºC induz a um estresse letal para algumas células que é proporcional à taxa de resfriamento, intervalo de temperatura e ao limite de temperatura, sendo geralmente mais severo na faixa de 2 a 12ºC. Este fenômeno é conhecido como choque frio (cold shock), o qual afeta variavelmente as espécies (Watson, 1995; Watson, 2000; Gonzalez, 2004).

O choque frio é evidenciado pela presença de muitos espermatozóides em movimento circular ou apresentando motilidade espermática alterada (movimento retrogrado, presença de peças intermediárias dobradas), perda prematura da motilidade, diminuição da produção de energia, aumento da permeabilidade da membrana e perda de moléculas e íons intracelulares. Essas alterações são devidas a danos nas membranas espermáticas, as quais são bioquimicamente diferentes, mas apresentam estruturas semelhantes (Amann e Pickett, 1987; Gonzalez, 2004; Celeghini, 2005).

Mesmo no resfriamento lento a mudança da temperatura determina estresse sobre a membrana, sendo provável que este processo seja devido à mudança de fase dos lipídios da bicamada e alteração do estado funcional da membrana. O choque frio pode ser visto então como um estado extremo de um "continuum" (uma seqüência) de estresses. Esses estresses sobre a membrana podem ocorrer abaixo de 0ºC, uma vez que as mudanças de fase não estão completas a 0ºC, porém estudos preliminares foram incapazes de demonstrar tais injúrias abaixo de 0ºC, no espermatozóide bovino. Sabe-se que no sêmen bovino, a maior mudança de fase ocorre entre 5 e 15ºC, intervalo de temperatura no qual o espermatozóide está mais susceptível a injúrias (Watson, 1995; Watson, 2000; Gonzalez, 2004).

A sugestão que as lesões da membrana resultam de eventos de mudança de fase na bicamada lipídica é bem comprovada. Estudos das membranas utilizando a técnica de "freeze fracture" antes, durante, e após o resfriamento mostraram clara evidência de

eventos de separação de fase, os quais são apenas parcialmente revertidos após o reaquecimento (Holt and North, 1984; De Leeuw et al., 1990; citados por Watson, 2000).

A temperatura é um fator importante na alteração da fluidez da membrana. A fluidez da membrana é devido à capacidade das moléculas de fosfolipídios de se movimentarem lateralmente. As mudanças inerentes ao resfriamento de qualquer célula são exarcebadas pelo choque frio. Pode-se presumir que com uma redução rápida da temperatura, a reorganização das membranas é mais difícil e mais áreas podem apresentar a fase hexagonal II, com um aumento da permeabilidade da membrana. De qualquer forma, a manutenção do metabolismo e do gradiente iônico está prejudicada (Amann e Pickett, 1987).

A sensibilidade ao choque frio (cold shock) varia de acordo com o grau de maturação do espermatozóide, espécie, variação individual e quantidade de plasma seminal, e pode ser determinada pelo conteúdo de colesterol da membrana e o grau de saturação dos ácidos graxos, os quais influenciam na fluidez da membrana plasmática (Watson, 1981; Cottorello, 2002a).

Parks e Lynch (1992) detectaram em seu estudo que o tipo de fosfolipídio predominante na membrana também influenciava na sensibilidade ao choque frio, e espécies com maior proporção de fosfatidilcolina/ fosfatidiletanolamina eram mais resistentes. Esses autores também observaram que quanto maior o conteúdo de proteína da membrana, mais baixa a resistência ao choque frio.

4.3.2 Efeitos da Osmolaridade

Quando células são congeladas e descongeladas, elas sofrem vários ciclos de desidratação e reidratação osmóticas, resultando em mudanças de volume extremas. A primeira ocorre quando as células são colocadas dentro de um aditivo crioprotetor, como o glicerol, e novamente quando a solução congela, e depois no descongelamento, e finalmente quando o agente crioprotetor é removido da célula. Essas mudanças de volume dos espermatozóides resultam do efluxo de água quando uma célula é exposta inicialmente a uma solução hipertônica, e da reentrada da água quando essa célula, que foi exposta a um agente crioprotetor (ACP), é recolocada em uma solução isotônica (Leibo e Bradley, 1999).

A adição e remoção do crioprotetor causam um considerável, porém transiente, estresse osmótico à membrana plasmática do espermatozóide, dependendo da permeabilidade relativa do crioprotetor (Gao et al., 1993). Geralmente, o crioprotetor de escolha para o espermatozóide é o glicerol (ou ocasionalmente o dimetilsulfóxido), que induz estresse osmótico. Gao et al. (1995), demonstraram que quando espermatozóides humanos foram exposto à concentração de 1 M de glicerol em uma única etapa, a mudança de volume excedia os limites toleráveis tanto para a adição quanto para a remoção. Eles demonstraram que o estresse pode ser reduzido a limites toleráveis pela realização da adição e remoção do crioprotetor em etapas, e isso melhorou substancialmente a proporção de espermatozóides vivos (Watson, 2000).

4.3.3 Efeitos da formação de cristais de gelo

O estresse induzido pela formação de cristais de gelo está associado principalmente com as mudanças na pressão osmótica da porção não congelada que a acompanha (Watson e Duncan, 1988; Watson, 2000).

Quando uma suspensão de espermatozóides é resfriada abaixo de 0ºC, começam a se formar cristais de gelo extracelulares. A

membrana plasmática atua como uma barreira impedindo o crescimento dos cristais dentro da célula. Os sais são excluídos dos cristais de gelo e isto causa um aumento na concentração de sais no fluido extracelular não congelado, o que aumenta a pressão osmótica extracelular. Inicialmente a água do meio intracelular não sofre congelamento, mas é resfriada abaixo do ponto de congelamento. Ocorre então uma passagem da água do meio intracelular para o extracelular e, assim, os espermatozóides sofrem uma desidratação progressiva. Se não ocorrer essa desidratação da célula, ocorre formação de cristais de gelo intracelulares. Se a taxa de congelamento é muito lenta, a alta concentração de sais intracelulares, devido à desidratação excessiva da célula, pode lesar o espermatozóide. Se a taxa de congelamento é muito rápida, pode ocorrer a formação de cristais de gelo intracelulares. A taxa de congelamento ótima é uma conciliação entre esses dois fatores (Amann e Pickett, 1987; Parks e Graham, 1992; Watson, 2000).

A duração da exposição a tais condições deve ser minimizada para uma taxa de sobrevivência ótima; isto implica que a taxa de congelamento deve ser relativamente rápida. Entretanto a taxa de congelamento deve ser lenta o suficiente para permitir a perda de água da célula por osmose, evitando a formação intracelular de cristais de gelo, que é letal à célula. Devido a isso, os espermatozóides são congelados em taxas rápidas na faixa entre 15 a 60ºC/min, que foram determinadas empiricamente apresentando as melhores taxas de sobrevivência (Watson, 2000; Gonzalez, 2004).

Os danos primários à membrana ocorrem durante o congelamento e descongelamento na faixa de temperatura entre – 15 a – 60ºC, e não durante a estocagem das células em nitrogênio líqüido a –196ºC (Parks e Graham, 1992). Os espermatozóides resfriados abaixo da zona intermediária crítica, entre – 15ºC e – 60ºC, suportam a temperatura do nitrogênio líquido sem maiores problemas. Nessa temperatura, os espermatozóides são menos sensíveis aos danos causados pelas altas concentrações de soluto, podendo ser estocados por tempo indeterminado (Amann e Pickett, 1987; Graham, 1996 b, citado por Snoeck, 2003).

Essas condições resultam em danos celulares por várias razões. Primeiramente, quando mais de 90% da água osmoticamente ativa é retirada, a membrana plasmática pode sofrer separações laterais de fases ou transições de fase liotrópicas de fase lamelar para a hexagonal. Essas mudanças ultra-estruturais são resultados da desidratação osmótica, e não pela formação de gelo intracelular, e resultam em permeabilidade não-seletiva da membrana (Parks e Graham, 1992).

A formação de cristais de gelo intracelular ocorre com taxas rápidas de congelamento, e isso pode induzir lesões celulares e morte celular. O mecanismo pelo qual os cristais de gelo intracelulares exercem seu efeito não é completamente entendido. Grandes cristais de gelo intracelulares são deletérios para as células enquanto os microcristais intracelulares não o são necessariamente (Parks e Graham, 1992).

4.3.4 Efeitos das taxas de resfriamento

Embora as etapas no processamento de sêmen antes do equilíbrio sejam fáceis de controlar, o resfriamento das palhetas que se segue, em suportes até 4 ou 5ºC deve ser realizado sob ótimas condições já que a maioria dos espermatozóides de mamíferos é sensível a um resfriamento rápido (Januskauskas, 1999).

A taxa de resfriamento e o tempo de equilíbrio têm sido testados no espermatozóide bovino tentando determinar empiricamente a curva ideal de resfriamento

(Gonzalez, 2004). Pesquisas realizadas por Dhami et al. (1992,1993), avaliaram o efeito do congelamento com diferentes taxas de resfriamento, períodos de equilíbrio e efeito de diluidores sobre parâmetros de motilidade e sobrevivência espermática.

Dhami et al. (1992) realizaram o congelamento do sêmen de touros Holstein-Friesian e de búfalos Murrah, com o diluidor Tris (contendo ácido cítrico, frutose, gema de ovo e glicerol), utilizando apenas 1 h de tempo de equilíbrio, e várias taxas de resfriamento (15, 30, 60 e 120 min. de resfriamento de 10º a 5ºC vs. uma amostra controle por 120 min. de 28º até 5ºC) e diferentes temperaturas e taxas de descongelamento: 40ºC/60seg; 60ºC/15seg; e 80ºC/5seg. As amostras de sêmen foram avaliadas quanto à motilidade pré-congelamento e pós-descongelamento e quanto à porcentagem de sobrevivência após 1 h de incubação a 38ºC. Os resultados encontrados indicavam que uma taxa de resfriamento lenta de 2 horas iniciando a 10ºC ou a 28ºC é essencial para a criopreservação do sêmen bovino. Entretanto, o sêmen de búfalo pode ser congelado com sucesso após 30 minutos de resfriamento iniciando a 10ºC. Além disso, observou-se que a temperatura de descongelamento de 60ºC proporcionou motilidade pós-descongelamento mais alta que a 40ºC. Neste experimento observou-se que uma taxa de resfriamento rápida foi prejudicial para a motilidade e sobrevivência dos espermatozóides bovinos. Posteriormente, Dhami e Sahni (1993) encontraram que o resfriamento lento foi favorável, considerando a baixa perda de enzimas (transaminase – GOT) como uma medida indireta da integridade da membrana plasmática.

Porém, Januskauskas et al. (1999) comparam o efeito de duas taxas de resfriamento (0,1ºC/min vs. 4,2ºC/min), partindo da temperatura ambiente (19 a 21ºC) até 4ºC, sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento *in vitro* e fertilidade após a inseminação artificial. Os pesquisadores não observaram diferenças estatísticas para a motilidade pós-congelamento avaliada subjetivamente por microscopia óptica; a integridade da membrana plasmática (avaliada pelos corantes fluorescentes Calcein AM/EthD-1; SYBR-14/PI); a integridade acrossomal (avaliada pelo FITC-PSA); e o status de capacitação (método de coloração por clortetraciclina CTC) avaliados por microscopia de epifluorescência. Também não se observou diferença ($P>0,05$) para fertilidade avaliada pela taxa de não-retorno aos 56 dias. No entanto, a porcentagem de espermatozóides móveis e os parâmetros de cinética dos espermatozóides − velocidade do trajeto (VAP); velocidade progressiva (VSL); e velocidade curvilinear (VCL) − avaliados por sistema computadorizado (CASA), diferiram significativamente entre os tratamentos. O tratamento com resfriamento lento apresentou menor porcentagem de espermatozóides móveis e os espermatozóides tornaram-se mais ágeis independente do parâmetro avaliado, e apresentaram um grande aumento na velocidade curvilinear (VCL). Especulou-se que isto poderia afetar negativamente a longevidade do espermatozóide devido a sua relação com a hiperativação. Os resultados indicaram que a maioria dos parâmetros de viabilidade pós-descongelamento e os resultados de fertilidade não diferiram significativamente entre as duas taxas de resfriamento e que o resfriamento lento não é mais benéfico que o resfriamento rápido.

Segundo Januskauskas et al. (1999), a diferença das respostas desse estudo e dos trabalhos Dhami et al. (1992,1993) pode ter sido devido às diferenças nas taxas de resfriamento assim como nos métodos utilizados para avaliar as lesões dos espermatozóides pós-descongelamento. Além disso, os trabalhos de Dhami et al. (1992, 1993) não utilizaram curvas de resfriamento precisamente controlada, e sim

curvas empíricas colocando as palhetas em recipientes com água refrigerada enquanto que Januskauskas et al. (1999) realizaram curvas bem controladas utilizando maquinas de congelamento automatizadas.

4.3.5 O tempo de equilíbrio

Os métodos de processamento do sêmen imediatamente após a coleta variam consideravelmente (Vishwanath e Shannon, 2000). Os protocolos para congelamento de sêmen bovino incluem o resfriamento lento do sêmen diluído até 4-5ºC seguido por um tempo de equilíbrio de várias horas (de 30 min até 24h) nessa temperatura antes do congelamento. Normalmente é nessa temperatura que o glicerol é adicionado, principalmente quando se utiliza diluidor Citrato-Gema, e por isso esse período era erroneamente denominado "tempo de equilíbrio do glicerol", devido ao fato de acreditar-se que esse tempo era necessário para que o glicerol penetrasse na célula (Coulter, 1992; Vishwanath e Shannon, 2000; Muiño et al., 2007).

Entretanto, os trabalhos de Berndtson e Foote, (1972 a, b) mostraram que o glicerol era capaz de atravessar rapidamente a membrana do espermatozóide bovino tanto a 25 quanto a 5ºC dentro de 5 a 7 minutos, equilibrando-se rapidamente através da membrana e, portanto, pode ser adicionado a qualquer tempo durante o período de resfriamento. Além disso, utilizando o método de peletização do sêmen e os diluidores Citrato-gema e Tris-gema, demonstrou-se que uma exposição dos espermatozóides por um período muito curto (10 segundos) antes do congelamento garantia o máximo de motilidade pós-descongelamento quando comparado com exposições mais prolongadas (Berndtson e Foote, 1969; Berndtson e Foote 1972 a,b; Coulter, 1992; Gao, Mazur e Critser, 1997). Entretanto, nenhuma redução significativa ($P>0,05$) da motilidade foi observada entre 6 minutos e 6 horas de exposição ao glicerol (Berndtson e Foote, 1969; Berndtson e Foote 1972 a). Esses dados sugerem que os espermatozóides bovinos ou são altamente permeáveis ao glicerol ou, diferente de outras células, a penetração do glicerol não é necessária para a proteção (Coulter, 1992; Gao, Mazur e Critser, 1997).

Permanece então uma dúvida: qual é então o papel do "tempo de equilíbrio"? Vários trabalhos das décadas de 50 e 60 (Polge e Rowson, 1952a; Cragle et al., 1955; Saroff e Mixner, 1955; Martin, 1963) quando o congelamento ainda era realizado através das técnicas de peletização e congelamento no gelo seco (−79ºC), indicaram que o armazenamento dos espermatozóides com diluidor glicerolado a 5ºC por várias horas melhoravam a motilidade espermática pós-congelamento em relação a curtos períodos de exposição ao glicerol. A fertilidade também foi aumentada pela utilização de tempos de equilíbrio de 12 a 18 horas (Graham et al., 1957; Martin e Emmens, 1961; Martig e Almquist, 1966), o que era interpretado como um indicativo de que era necessário um longo período para o glicerol exercer a sua proteção máxima (citado por Berndtson e Foote, 1969).

Entretanto, vários trabalhos (Miller e VanDemark, 1954; O'Dell e Hurst, 1956; O'Dell e Almquist, 1957; Polge e Jakobsen, 1959) mostraram que um longo período de "equilíbrio do glicerol" não é necessário para proteção efetiva do espermatozóide durante o congelamento, embora um período de equilíbrio ou de "envelhecimento" a 5ºC por si só é benéfico. Esses trabalhos sugerem que alterações importantes, que não envolvem o glicerol, ocorrem durante o armazenamento a 5ºC as quais aumentam a resistência do espermatozóide ao congelamento (Berndtson e Foote, 1969).

Porém, muitos estudos são contraditórios. Alguns estudos sobre sobrevivência espermática em bovinos chegaram à conclusão que a estabilização do sêmen em

diluidor glicerinado, durante 30 min a 4-5ºC, é suficiente se o diluidor utilizado é Citrato-gema (O'Dell e Hurst, 1956) ou leite desnatado (O'Dell e Almquist, 1957). Polge e Rowson (1952b), utilizando citrato-gema, relataram que ótimas taxas de recuperação e fertilidade podem ser obtidas com períodos de equilíbrio de 15 a 20 horas. Saroff e Mixner (1955), utilizando o método de ampolas e o diluidor citrato gema, afirmaram que quando o tempo de equilíbrio do glicerol é aumentado de 2 para 18 horas, ocorre um aumento progressivo na sobrevivência espermática no pós-descongelamento, após o congelamento a −75ºC. Cragle e Myers (1954), utilizando o método de ampolas e o diluidor citrato gema, encontraram maiores valores de motilidade após um tempo de equilíbrio entre 6,5 a 16 horas. Eles também encontraram que reduzindo o tempo de equilíbrio para 4 horas, ou o aumento até 28 horas, resultou em uma menor porcentagem de recuperação dos espermatozóides (citado por Salisbury e Vandermark, 1964; Graham et al., 1957).

Graham et al. (1957), utilizando diluidores a base de leite integral aquecido e citrato-gema, obtiveram 67,8% de fertilidade (avaliada pela taxa de não retorno aos 75 dias) com um período de estabilização de 12 horas, 65,2 % com 8 horas, e 63,4% com 4 horas de tempo de equilíbrio, e foram inseminadas 1000 vacas por tratamento. Porém, houve diferença significativa ($P<0,05$) apenas entre os valores de 12 e 4 horas de tempo de equilíbrio.

Jondet (1967) relatou que a fertilidade dos espermatozóides bovinos congelados em palhetas não foi reduzida pela redução do tempo de exposição a 5ºC do sêmen diluído, com e sem o glicerol, de 20h para 6h. Além disso, Jondet (1972) encontrou apenas pequenas diferenças tanto para a motilidade pós-descongelamento quanto para a fertilidade do sêmen congelado em palhetas após a exposição ao glicerol por 1 min, 8 min, ou 6 h. Para essas comparações, todo o sêmen foi mantido a 5ºC por 8 h, sendo que o glicerol era acrescentado ao longo desse período de 8 h. O sêmen foi congelado após 8 min ou 6 h de exposição ao glicerol. A motilidade pós-descongelamento foi maior (64 vs 59%) quando se utilizou 6 h de exposição ao glicerol. A taxa de não-retorno (60 a 90 dias) foi de 58,7% para 8 min e de 60,1% com sêmen equilibrado por 6h, utilizando cerca de 1530 inseminações para cada tratamento (citado por Pickett e Berndtson, 1974).

Wiggin e Almquist (1975) estudaram os efeitos diferentes concentrações de glicerol, tempos de equilíbrio (1, 2, 4, 8, ou 16 h) e taxas de descongelamento na criopreservação do sêmen bovino em palhetas, utilizando diluidor a base de leite desnatado aquecido. Os experimentos indicaram que taxas de descongelamento mais rápidas e tempos de equilíbrio mais curtos, do que os que eram utilizados para a criopreservação em ampolas, resultavam em maior motilidade pós-descongelamento quando eram utilizadas palhetas. Eles concluíram que a melhor combinação foi de 10,7% de glicerol, 2 horas de tempo de equilíbrio e descongelamento a 76ºC. Embora 2h de tempo de equilíbrio tenha sido o melhor, 1 h não foi prejudicial à motilidade pós-descongelamento.

Ennen et al. (1976), utilizando o diluidor citrato-gema e trabalhando com palhetas, encontraram que 1, 2, e 4 h de tempo de equilíbrio foram superiores a 16 h. Além disso, nesse experimento observaram que o período de equilíbrio ótimo para espermatozóides congelados em palhetas variou de 2 a 10 h, e foi dependente do tempo de resfriamento. Segundo esses pesquisadores, espermatozóides resfriados lentamente parecem necessitar de um menor tempo de equilíbrio para uma motilidade ótima. Porém, em outro experimento, no mesmo trabalho, estes pesquisadores não encontraram diferenças significativas entre

1, 2 e 4 h de equilíbrio em relação à motilidade após incubação a 38ºC por 2 horas, pós-descongelamento. Entretanto estes tempos foram superiores ao tempo de 16 h de equilibro, em relação à motilidade no TTR.

Gilbert e Almquist (1978) estudaram os efeitos do tempo de resfriamento de 25 até 5ºC, tempo de equilíbrio (0, 3 ou 9 h) e método de descongelamento, na criopreservação do sêmen bovino. O sêmen foi diluído em diluidor Tris-gema (a 37ºC) com glicerol, e envasado em palhetas na temperatura ambiente e então congelado. A retenção do acrossoma (avaliada por microscopia DIC) e a motilidade espermática foram superiores ($P<0,01$) para 3,5 h comparado a 30 min de tempo de resfriamento, quando não houve tempo de equilíbrio. Além disso, 3 ou 9 h de equilíbrio foi superior ($P<0,01$) ao tratamento de 0h de equilíbrio. A interação entre o tempo de equilíbrio, tempo de resfriamento e método de descongelamento foi significativa ($P<0,01$). A retenção do acrossoma e a motilidade espermática foram máximas ($P<0,01$) após 9 h de equilíbrio quando as palhetas foram descongeladas a 35ºC/10seg; ou após 3 ou 9h quando descongeladas a 65 ou 95ºC.

Na espécie suína, Fiser et al. (1996) estudaram o efeito da concentração de glicerol (testando as concentrações de 0, 2, 4, 6% v/v) e do tempo de equilíbrio (comparou 6 mim, 30 min, 1, 2, 4 e 24h de equilíbrio) sobre o sêmen suíno congelado em palhetas de 0,5 mL. Em relação ao tempo de equilíbrio observaram que a porcentagem de espermatozóides móveis pós-descongelamento aumentava gradualmente com o aumento do tempo de equilíbrio, chegando ao seu valor máximo após 2 a 4 horas de exposição a 5ºC. Observou-se também que mesmo o sêmen que foi diluído em diluidor sem glicerol também se beneficiou da longa exposição à temperatura de 5ºC, sendo que sua motilidade aumentou de 8% após 6 min. para 15% após 2 horas de equilíbrio. Não houve interação entre a concentração de glicerol e o tempo de equilíbrio para os parâmetros de motilidade e integridade acrossomal. Entretanto, o sêmen diluído sem glicerol exibiu uma motilidade significativamente menor do que qualquer amostra de sêmen glicerolada após cada um dos tempos de equilíbrio testado, além de apresentar menores velocidades quando comparadas com aquelas diluídas com diluidores glicerolados. A porcentagem de espermatozóides com acrossoma normal aumentou com o aumento do tempo de equilíbrio atingindo valores máximos após 4 horas (63%) de equilíbrio e então apresentaram uma redução pequena (54%) após 24 horas de equilíbrio.

Como o sêmen sem glicerol se beneficiou da exposição a 5ºC de forma semelhante ao glicerolado, Fiser et al. (1996) concluíram, a partir desse experimento, que a exposição a 5ºC talvez seja importante para que ocorram modificações na membrana do espermatozóide que os tornam menos susceptíveis às lesões causadas pela criopreservação.

Dhami e Sahni (1993) estudaram os efeitos de curvas de congelamento rápidas e lentas, efeito de 0 e 2 horas de tempo de equilíbrio, e o efeito do diluidor (utilizando os diluidores TRIS-gema e leite integral-gema) sob a motilidade pós-descongelamento, e a fertilidade de touros. Observou-se que um resfriamento lento por duas horas e pelo menos 2h de tempo de equilíbrio a 5ºC, resultaram em melhor motilidade pós-descongelamento (44,03% vs 35,49%) e melhores taxas de fertilidade (57,86% vs 47,24%) do que sem tempo de equilíbrio. Além disso, sugerem que esses resultados poderiam ser melhorados se fossem utilizados tempos de equilíbrio maiores.

Em um estudo mais recente (Foote e Kaproth, 2002), utilizando diluidor a base de

leite integral com ou sem frutose para sêmen bovino, foram obtidos resultados semelhantes de motilidade pós-descongelamento e taxas de não-retorno aos 56 d quando se utilizou 4 ou 28h de equilíbrio a 5ºC.

Com base nos resultados obtidos após uma série de testes de fertilidade em bovinos, Pickett e Berndtson (1978) recomendaram o tempo de equilíbrio a 5ºC de 4-18 h, antes do congelamento, e o glicerol pode ser adicionado a qualquer momento durante esse período sem afetar a fertilidade. Sob algumas circunstâncias, a adição do glicerol em etapas pode aumentar a motilidade pós-descongelamento, embora as vantagens sejam geralmente pequenas e podem não ter reflexo sobre a fertilidade (citado por Muiño et al., 2007).

A maioria dos protocolos de criopreservação para sêmen bovino estabelece um tempo de equilíbrio de 3-4h; assim, o sêmen tem que ser congelado no mesmo dia da coleta. Entretanto, vários estudos indicaram que tempo de equilíbrio de 18 h antes do congelamento resultaram em aumento de fertilidade (Pickett e Berndtson, 1978, citado por Muiño et al., 2007).

Em um recente trabalho Muiño et al. (2007) realizaram a comparação entre diluidores comerciais sem gema de ovo, Andromed® e Biociphos Plus®, e um diluidor a base de Tris-gema (Biladyl®) com um tempo de equilíbrio a 5ºC de 18 h. Realizaram-se avaliações de viabilidade e integridade acrossomal logo após o descongelamento, e após 3, 6 e 9 h de incubação a 37ºC, utilizando os corantes fluorescentes SYBR-14, PI e PE-PNA e analisado por um citômetro de fluxo. Os resultados indicaram que quando se utiliza um tempo de equilíbrio de 18 h (congelamento no dia seguinte ao dia da coleta), o uso de diluidores a base de Tris-gema, Biladyl® resulta em maior sobrevivência e longevidade espermática do que diluidores a base de lecitina de soja, Andromed® e Biociphos Plus®.

4.3.6 Efeitos das taxas de congelamento

A maioria das teorias sobre crioinjúria relaciona-se às conseqüências da formação e dissolução de cristais de gelo, que variam de acordo com as taxas de congelamento. O processo de desidratação que acompanha o congelamento lento está potencialmente associado com a sobrevivência celular, enquanto que no congelamento a taxas rápidas a probabilidade de morte celular é maior. Para o espermatozóide a taxa ótima de resfriamento entre −5ºC e −45ºC está entre 10ºC/min e 80ºC/min (Watson, 1995).

Os protocolos de criopreservação de sêmen normalmente têm utilizado taxas de congelamento que variam desde 10 a 100ºC/min, obtendo-se boas taxas de sobrevivência pós-criopreservação (Agca e Critser, 2002, citado por Gonzalez 2004).

O resfriamento dos espermatozóides abaixo de 0ºC (congelamento), em uma taxa lenta promove maior egresso da água da célula do que quando o resfriamento é realizado numa taxa rápida. Dessa forma um resfriamento muito lento pode levar a uma desidratação celular muito intensa, enquanto, um resfriamento muito rápido é insuficiente para permitir o egresso da água, o que acarreta a formação de cristais de gelo intracelular. A taxa de resfriamento ideal deve ser relativamente rápida resultando em suficiente e não excessiva retirada de água intracelular, o que pode levar a formação de cristais de gelo intracelulares, pequenos e não letais, proporcionando boas condições de sobrevivência da célula após o reaquecimento (Amann e Pickett, 1987; Celeghini, 2005).

Quando o sêmen diluído é resfriado abaixo da temperatura de 5ºC, inicialmente o meio diluidor ao redor do espermatozóide, e as

próprias células, encontram-se não congeladas, porque os pontos de congelamento dos diluidores (devido aos crioprotetores) e do líqüido intracelular estão abaixo de 0ºC. Ocorre então um fenômeno chamado de super-resfriamento. Entre as temperaturas de −5ºC e −15ºC, dependendo da curva de congelamento e do diluidor, começam a se formar cristais de gelo no diluidor, enquanto os espermatozóides permanecem super-resfriados. Ocorre então o aumento da concentração de solutos ao redor do espermatozóide e do gradiente osmótico culminando com a desidratação da célula (Amann e Pickett, 1987; Snoeck, 2003).

Em pesquisa realizada por Chen et al. (1993), foi testado o efeito do super-resfriamento (−13 ou −14ºC antes do congelamento até −196ºC) e da indução da formação de cristais de gelo ("seeding") no sêmen de touros sobre a motilidade pós-descongelamento de sêmen em diluidores a base de Tris-gema e leite integral. Este experimento demonstrou que os espermatozóides são mais sensíveis a mudanças de temperatura quando congelados com leite integral do que em Tris-gema, na faixa entre −50 a −75ºC (temperatura de transferência para o nitrogênio). Esse estudo revelou que os espermatozóides passam por uma fase de super-resfriamento semelhante ao que ocorre aos embriões durante o congelamento. Os efeitos sobre a motilidade foram menores quando o sêmen diluído foi submetido ao "seeding", mas esses efeitos foram avaliados apenas imediatamente após o descongelamento. As taxas de congelamento de −15, −25 e −35ºC/min foram semelhantes em relação à sobrevivência espermática e foram superiores ao congelamento a −5ºC/min.

Em geral é aceito que a resposta ao congelamento é influenciada principalmente pela permeabilidade da célula à água e aos solutos. Devido a isso, para entender a criobiologia do sêmen, nas décadas anteriores um considerável esforço foi realizado na tentativa de determinar as características de permeabilidade dos espermatozóides de várias espécies (Leibo e Bradley, 1999).

Agca e Critser (2002) e Leibo e Bradley (1999) relataram que as pesquisas têm sido direcionadas no sentido de otimizar os protocolos de criopreservação quantificando alguns parâmetros biofísicos como o coeficiente de permeabilidade da membrana celular para a água (Lp), para o crioprotetor (Pcpa) assim como a sua energia de ativação (Ea). Estes parâmetros têm sido determinados em espermatozóides de várias espécies de mamíferos e utilizados na tentativa de predizer o tipo e a concentração ótima do crioprotetor, a velocidade de adição e de retirada do crioprotetor, além da taxa de congelamento e descongelamento. Porém, os resultados obtidos têm deixado dúvidas a respeito da importância da velocidade de passagem da água pela membrana na determinação da taxa de resfriamento ideal, já que as técnicas utilizadas superestimam os valores (Leibo e Bradley, 1999; Gonzalez, 2004).

Entretanto outros trabalhos como os realizados por Devireddy et al. (1999, citado por Leibo e Bradley, 1999), e por Chaveiro et al. (2006), utilizando técnicas diferentes de medição dos valores de Lp e de Ps (coeficiente de permeabilidade para o glicerol), obtiveram valores próximos aos valores obtidos empiricamente.

No trabalho realizado por Chaveiro et al. (2006), concluiu-se que existem diferenças significativas entre touros na Lp e Ps da membrana plasmática do espermatozóide. Isto indica que machos diferentes podem requerer ajustes nos protocolos de congelamento. A aplicação desses dados em um modelo teórico para simular os eventos osmóticos durante o congelamento resultou na predição de taxas de congelamento que se

situam na mesma faixa dos valores obtidos empiricamente.

4.3.7 Efeitos do descongelamento

O sucesso final de um procedimento de congelamento também é limitado pelo processo de descongelamento do sêmen. E em termos gerais, se a taxa de resfriamento (no processo de congelamento) é rápida, a taxa de reaquecimento (processo de descongelamento) também deve ser rápida. Se a taxa de resfriamento é lenta, a taxa de reaquecimento deve ser lenta (Amann e Pickett, 1987; Celeghini, 2005). Quando a taxa de resfriamento é mais lenta ou mais rápida que a ideal, os danos celulares podem ser abrandados por taxas de reaquecimento apropriadas (Celeghini, 2005).

Um aspecto das diferentes teorias da crioinjúria é a questão se a lesão ocorre durante o congelamento ou no descongelamento. Existem algumas evidências que sugerem que as células criopreservadas podem ser lesadas pelo descongelamento, o que se acredita ser devido à recristalização (Watson, 1995).

A recristalização é um fenômeno que ocorre durante o descongelamento, devido à reorganização de microcristais de gelo intracelulares em cristais maiores que são considerados lesivos à célula espermática. Evidências que suportam este mecanismo foram observadas devido à redução da sobrevivência de células causada pelo descongelamento lento de células que sofreram congelamento rápido. O descongelamento rápido dessas células que foram congeladas rapidamente permite o descongelamento desses cristais antes que ocorra a recristalização, enquanto que o reaquecimento lento permite reorganização dos cristais, resultando em lesão e morte celular (Mazur, 1984; Watson, 1995; Leibo e Bradley, 1999; Celeghini, 2005).

Um possível problema do descongelamento lento é a mudança osmótica devido à entrada de água na célula, que é considerada mais lesiva do que a saída durante o congelamento (Curry e Watson, 1994). Holt (1992) avaliou a permeabilidade da membrana como resultado do congelamento e descongelamento e observou que os efeitos só podiam ser observados durante o reaquecimento na faixa de 2 a 30ºC (ou seja, bem depois do descongelamento dos cristais e da rediluição do soluto que se concentrou durante o congelamento). Isto sugere novamente que as lesões na membrana se manifestam durante a fase de descongelamento, mas que outros eventos, além da simples diluição dos solutos, podem ser importantes. Esses autores sugeriram que mudanças de fase dos lipídios podem estar envolvidas nessas alterações (Watson, 1995).

O descongelamento envolve um processo inverso, forçando a célula a retroceder seu curso pela passagem de várias mudanças de fase, e tem com o resultado o fluxo de água para dentro da célula. A taxa de mudança de temperatura deve permitir o movimento de água e de crioprotetor sem a formação de cristais de gelo intracelular ou mudanças irreversíveis na membrana (Amann e Pickett, 1987; Watson, 1995; Holt, 2000; Gonzalez, 2004).

Embora os efeitos prejudiciais do resfriamento rápido sejam reconhecidos há muitos anos, o aquecimento rápido tem sido reconhecido até recentemente como benigno. Porém já foi descrita a ocorrência de lesão do acrossoma resultante do reaquecimento rápido nos espermatozóides bovinos (Senger et al., 1976). Bamba e Cran (1985, 1988) relataram que o reaquecimento rápido do espermatozóide suíno de 5ºC a 37ºC foi extremamente prejudicial às estruturas do acrossoma. Efeitos semelhantes foram observados para o espermatozóide de coelho, mas no espermatozóide bovino os danos

representaram um aumento do defeito "Knobbed" do acrossoma. Esses estudos podem indicar que deve-se ter cuidado quando se realiza o descongelamento rápido do sêmen criopreservado (Watson, 1995).

4.4 Composição dos meios diluidores

Segundo Vishwanath e Shannon (2000) os componentes básicos dos diluentes para criopreservação são essencialmente os mesmos usados para estocagem à temperatura ambiente Os requerimentos gerais são:

- Substâncias iônicas e não iônicas para manter a osmolaridade do meio e para o tamponamento do meio;
- Uma fonte de lipoproteínas ou material de alto peso molecular que evita o choque frio, como a gema de ovo ou leite;
- Glicerol, propanodiol, ou dimetilsulfoxido (DMSO) para crioproteção;
- Glicose ou frutose como fontes de energia;
- Outros aditivos tais como enzimas e antibióticos.

O plasma seminal, sozinho, não é capaz de proteger adequadamente os espermatozóides contra mudanças de temperatura. Para o sêmen ser estocado em baixa temperatura é necessário que os espermatozóide sejam diluídos em diluidores especiais e apropriados (Salamon e Maxwell, 1995a, citado por Snoeck, 2003).

Phillips (1939) realizou uma importante descoberta quando observou que a adição da gema de ovo ao diluidor do sêmen teve um efeito benéfico sobre a fertilidade do sêmen resfriado. Inicialmente utilizava-se o fosfato como tampão desses diluidores. Posteriormente, descobriu-se que o citrato apresentava adequada capacidade tamponante além de aumentar o período de sobrevivência dos espermatozóides armazenados a 5ºC (Willett e Salisbury, 1942). O citrato se tornou então o sal de escolha, e suas propriedades quelantes melhoraram a solubilidade da fração protéica da gema de ovo. A razão da substituição do fosfato pelo citrato deve-se ao fato de que o fosfato inibe a oxidação do ácido lático causando a sua acumulação (White, 1956, citado por Vishwanath e Shannon 2000).

Na década de 1970, vários estudos se concentraram no uso de tampões orgânicos (Tris, TES, MES, HEPES, PIPES, MOPS e BES) baseado no fato que eles possuem melhor capacidade tamponante do que o fosfato ou o citrato, e são relativamente não-tóxicos para as células. Além disso, podem penetrar no espermatozóide desse modo atuando como tampões intracelulares contra mudanças de pH, ou podem aumentar a tolerância da célula ao aumento intracelular de cátions monovalentes. Os tampões aumentam a tonicidade total do diluidor, o que é importante quando o sêmen é armazenado (Salamon e Maxwell, 2000; Vishwanath e Shannon, 2000).

Muitos dos tampões orgânicos zwitteriônicos (compostos químicos eletricamente neutros, mas que apresentam cargas positivas e negativas formais em átomos diferentes) provaram apresentar boa capacidade tamponante sobre uma ampla faixa de pH, e foram testados na preparação de diluidores. Entretanto, os diluidores a base de tris(hidroximetil)aminometano (Tris) tornaram-se universais, e este meio tamponante combinado com gema de ovo e glicerol foram testados extensivamente para sêmen bovino (Vishwanath e Shannon, 2000). Por alguma razão, ainda não completamente entendida, quando se utiliza o Tris como tampão existe a vantagem de não ser necessário esperar até o final do resfriamento para se adicionar o glicerol (Ball e Peters, 2004).

4.4.1 Agentes crioprotetores

A criopreservação das células, mantendo sua viabilidade, é um processo muito complexo. Durante o congelamento e descongelamento as células podem ser danificadas facilmente (Dumoulin et al., 1994). Para as células sobreviverem ao processo de criopreservação é necessário a presença de agentes crioprotetores durante o resfriamento, congelamento e descongelamento. Os agentes crioprotetores são definidos como a classe de componentes que atuam especificamente na manutenção da viabilidade das células animais nos processos de congelamento e descongelamento (Gilmore et al., 1997, citado por Snoeck, 2003).

Os crioprotetores podem ser classificados conforme o seu modo de ação em penetrantes e não penetrantes. Os crioprotetores penetrantes são moléculas pequenas como o glicerol, etilenoglicol, propilenoglicol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, que atravessam a membrana e atuam nos meios intra e extracelulares (Sztein, 2001; Celeghini 2005).

Os crioprotetores não penetrantes não conseguem atravessar a membrana plasmática, pois são moléculas grandes, como proteínas (da gema de ovo, e do leite desnatado), açúcares (frutose, glicose, manose, rafinose e trealose), polímeros sintéticos (polivinilpirrolidona e metilcelulose) e amidas, que atuam no meio extracelular, ou seja, atuam como solutos ou colóides (De Leeuw et al., 1993; Gao et al., 1997; Cottorello e Henry, 2002; Celeghini, 2005). Os agentes crioprotetores não penetrantes aumentam a osmolaridade do meio extracelular, induz a saída de água das células levando a desidratação, reduzindo assim a possibilidade de formação de cristais de gelo intracelulares durante o congelamento (Amann e Pickett, 1987).

A maioria dos crioprotetores intracelulares servem de solvente e soluto, enquanto os extracelulares, incluindo proteínas, lipídios e açúcares são solutos ou colóides e não servem como solvente (McKinnon, 1996; citado por Snoeck, 2003).

Os crioprotetores intracelulares têm ação tanto por meio de propriedades coligativas ou por meio de sua ligação com a água. Uma das propriedades coligativas dos crioagentes é sua capacidade de reduzir o ponto de congelamento das soluções. A água pura congela a temperatura de 0ºC, enquanto uma solução contendo crioprotetores congela em temperatura mais baixa (Mazur, 1980 citado por Snoeck, 2003).

Os crioprotetores intracelulares possuem uma estrutura bioquímica que promove a ocorrência de pontes de hidrogênio com moléculas de água. As pontes de hidrogênio modificam a orientação das moléculas de água nos cristais de gelo, proporcionando um ambiente menos nocivo para as células (Dalimata e Graham, 1997).

4.4.2 A função da gema de ovo

O plasma seminal, que se mistura com os espermatozóides na ejaculação, e serve como meio de transporte para o trato genital feminino, já foi descrito como benéfico e ao mesmo tempo prejudicial para o espermatozóide. Mais precisamente, foram descritos fatores do plasma seminal que ajudam as funções espermáticas tais como a motilidade, a viabilidade e fertilidade e que facilitam a capacitação (Baas et al., 1983; Killian et al., 1993; Bellin et al., 1998; Miller et al., 1990; citados por Bergeron et al., 2004).

Entretanto, sabe-se que o plasma seminal também contém fatores prejudiciais à capacidade fertilizante, tais como fator decapacitantes (Chang, 1957; Robertson, 1971) e fator inibidor da motilidade (Iwamoto e Gagnon, 1988). Além disso, o

plasma seminal é prejudicial ao armazenamento do sêmen porque contém fatores que afetam negativamente a viabilidade espermática (Way et al., 2000; citado por Bergeron et al., 2004).

A maior fração protéica do plasma seminal bovino é composta por um grupo de proteínas denominadas de BSP's (Bovine Seminal Plasma proteins). Essas proteínas representam 65% das proteínas do plasma seminal, dentre elas destacam-se a BSP-A1/A2, BSP-A3 e BSP-30kDa. As proteínas BSP's se ligam aos fosfolipídios de colina da membrana do espermatozóide na ejaculação e potencializam a capacitação espermática, induzida pelo HDL e pela heparina, estimulando o efluxo de colesterol e fosfolipídios da membrana do espermatozóide. Por isso, as BSP's são benéficas ao espermatozóide. Entretanto, as mesmas proteínas podem ser prejudiciais para a membrana do espermatozóide *in vitro*. O efluxo dos lipídios estimulado pelas BSP's é concentração e tempo dependente e, por isso, uma exposição contínua dos espermatozóides ao plasma seminal, que contém essas proteínas, pode ser lesivo à membrana do espermatozóide (Thérien et al., 1999; Manjunath e Thérien, 2002; Manjunath et al., 2002; Bergeron et al., 2004).

A gema de ovo de galinha (Egg Yolk- EY) é o agente mais efetivo para proteção do espermatozóide contra o choque frio e demonstrou-se que ela melhora as funções espermáticas e preserva a fertilidade após o armazenamento na forma liquida ou congelada. Apesar do uso de diluidores contendo gema de ovo por mais de 60 anos, o mecanismo envolvido na proteção pela gema de ovo contra os danos causados pelo armazenamento, resfriamento e congelamento ainda não é totalmente compreendido (Bergeron et al., 2004).

A fração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) da gema parece ser o constituinte responsável pela proteção do espermatozóide contra os danos causados pelo choque frio e pelo congelamento (Pace e Graham, 1974). Acredita-se que a fosfatidilcolina (lecitina) do LDL seja uma das responsáveis por essa proteção, uma vez que ela sozinha fornece alguma proteção ao espermatozóide contra o choque frio e o congelamento (Vishwanath e Shannon 2000; Watson, 1995).

Evidências sugerem que é necessária a molécula inteira de LDL para proteger o espermatozóide contra o choque frio. A digestão seletiva tanto da fração protéica ou lipídica não oferece a mesma proteção contra o choque frio (Watson, 1981; Vishwanath e Shannon 2000).

A estrutura do LDL é baseada em um núcleo de triglicerídios envolvidos por um filme de proteínas e fosfolipídios, que apresentam sua porção polar em contato com a fase aquosa (Cook e Martin, 1969). Sabe-se que a gema de ovo sofre gelificação quando é submetida a um processo de congelamento e descongelamento e que as moléculas de LDL são responsáveis por essa gelificação, enquanto que as outras substâncias da gema não participam diretamente (Wakamatu, 1982). A gelificação do LDL ocorre em temperaturas abaixo de -6ºC. O primeiro estágio desta gelificação é o rompimento da estrutura do LDL. Este rompimento é favorecido pela desidratação causada pelo congelamento e descongelamento. As interações lipídio proteína são interrompidas durante o congelamento, e as interações entre as proteínas são aumentadas. O produto da agregação das moléculas de LDL contém lipídios incluídos na sua estrutura (Tsutsui, 1988). Conseqüentemente, sob um processo de congelamento e descongelamento a molécula de LDL é rompida. Os triglicerídios e os fosfolipídios são liberados no meio, e as apoproteínas formam um gel (Moussa et al., 2002).

Vários mecanismos de proteção espermática pelo LDL da gema foram propostos. Sugeriu-se que o LDL da gema de ovo fornece proteção pela associação com a membrana do espermatozóide (Foulkes, 1977; Watson, 1981). Por esta hipótese a proteína do LDL atua na solubilização do lipídio e na ligação deste com a membrana (Watson, 1981; Vishwanath e Shannon 2000). Moussa et al. (2002) sugerem que a adsorção e gelificação das apoproteínas do LDL ao redor da membrana dos espermatozóides poderia formar um filme protetor contra os cristais de gelo durante o congelamento.

Quinn et al. (1980) sugeriram que os fosfolipídios da molécula de LDL podem formar um filme ou camada protetora na superfície da membrana dos espermatozóides após a ruptura do LDL. Além disso, Graham e Foote (1987) e Trimeche et al. (1996) propuseram que os fosfolipídios do LDL poderiam substituir alguns fosfolipídios da membrana do espermatozóide, e desse modo reduzindo a temperatura de transição de fase desta. Graham e Foote (1987) observaram que a fosfatidilserina sozinha ou combinada com a fosfatidilcolina é o fosfolipídio mais efetivo para a proteção do espermatozóide (Moussa et al., 2002).

Outra hipótese é que o EY-LDL previne a perda de fosfolipídios de membrana, assim aumentando a tolerância ao choque frio (Parks e Graham, 1992) e estudos anteriores que indicam os fosfolipídios da gema protegem os espermatozóides do choque frio sustentam essa especulação (Quinn et al., 1980, citado por Bergeron et al., 2004).

Estudos realizados por Manjunath et al. (2002) indicam que o EY-LDL, interage especificamente com as proteínas BSP's. A ligação das proteínas BSP's ao LDL é rápida, específica e saturável. Além disso, a capacidade de ligação do LDL às BSP's é muito alta, e esta interação é estável mesmo após o congelamento/ descongelamento. Tendo em vista tal fato, os pesquisadores sugeriram que o sistema de retirada ou "limpeza" das BSP's pelas lipoproteínas da gema de ovo, durante a diluição do sêmen com diluidores contendo gema, protege os espermatozóides dos efeitos deletérios das BSP's do plasma seminal.

Parks et al. (1981) mostraram que na ausência da gema de ovo no diluidor, ocorre uma diminuição no conteúdo de colesterol e de fosfolipídios do espermatozóide durante a incubação.

O trabalho de Bergeron et al. (2004) revelou que o contato com o plasma seminal resulta em perda gradual dos fosfolipídios de colina e do colesterol da membrana plasmática do espermatozóide. Mas, quando o sêmen foi diluído com gema de ovo, foi observado o efeito oposto (ganho de colesterol e fosfolipídios, e redução da associação das BSP's à superfície do espermatozóide). Uma vez que o mesmo efeito foi mimetizado quando se utilizou a LDF (fração de lipoproteína de baixa densidade da gema), os pesquisadores concluíram que a LDF é a responsável por este efeito. Além disso, a prevenção da ligação das BSP's ao espermatozóide e do efluxo de lipídios da membrana resultou em um aumento na qualidade do sêmen (motilidade).

Bergeron et al. (2004) observaram também que quando o sêmen foi incubado a 4ºC, na presença de gema de ovo no diluidor, o ganho de colesterol e fosfolipídios de colina foi 2 vezes menor do que no sêmen incubado a 37ºC. Isto pode ser explicado pela transição de fases que ocorre nas membranas durante o resfriamento. Durante o resfriamento as membranas se tornam menos fluidas e são menos susceptíveis à troca de lipídios. É possível que a mudança na fase lipídica da membrana espermática e no filme de fosfolipídios da molécula de LDL durante o resfriamento evita parcialmente a passagem de lipídios da LDL

para a membrana espermatozóide ou a ligação do LDL ao espermatozóide. De modo semelhante, em sêmen diluído com diluidor sem gema, a perda de lipídios da membrana do espermatozóide foi 2 a 3 vezes menor em sêmen incubado a 4ºC do que no sêmen incubado a 37ºC.

Bergeron et al. (2004), a partir deste estudo, sugerem que a gema de ovo nos diluidores protege os espermatozóides de duas formas. Primeiro, a associação do LDL com as BSP's protege o espermatozóide evitando que essas proteínas do plasma seminal se liguem ao espermatozóide e causem danos à membrana pela remoção de lipídios. Segundo, os lipídios da fração de lipoproteína de baixa densidade ou a molécula inteira de LDL se associariam à membrana, preservando a integridade da membrana plasmática durante a preservação do sêmen.

4.4.3 A substituição da gema de ovo

Nos últimos anos, vêm surgindo uma demanda crescente para a substituição da gema de ovo nos diluidores de sêmen devido a descobertas de substâncias presentes na gema que inibem a respiração dos espermatozóides ou diminuem a motilidade (Pace e Graham, 1974). Portanto, seria de grande benefício a retirada dessas substâncias prejudiciais e a adição apenas do agente crioprotetor da gema de ovo (Moussa et al., 2002).

Entretanto, os métodos atuais de purificação do LDL não permitem o uso do LDL em diluidores comerciais porque apresentam baixas taxas de recuperação. Porém, Moussa et al. (2002) desenvolveram um método simples para extrair LDL da gema de ovo, com pureza de 97% e rendimento de 67%, e que pode ser reproduzido em escala industrial.

Naquele trabalho foram testadas várias porcentagens de LDL na composição de um diluidor e comparado com um diluidor comercial original a base de gema (Triladyl®) e outro a base de lecitina de soja (Biociphos®). As análises de motilidade espermática pelo CASA mostraram que a motilidade e características do movimento dos espermatozóides foram melhores com a utilização de LDL no diluidor, quando comparadas com o diluidor comercial contendo gema de ovo. A concentração ótima de LDL foi de 8%. Concluiu-se que um diluidor contendo LDL extraído da gema de ovo pode ser utilizado como meio crioprotetor com melhores resultados do que os atuais diluidores comerciais (Moussa et al., 2002).

Também têm sido freqüentes os argumentos contra o uso de gema de ovo ou leite na composição dos diluidores, em função do risco de contaminação bacteriana ou por micoplasmas, além da possível fonte de endotoxinas capazes de afetar a capacidade fertilizante do espermatozóide. Como conseqüência direta, a maioria dos países teme o risco de introdução de doenças exóticas pelo transporte de produtos a base de leite ou ovo. Em função disso, meios de composição definida, livre de patógenos, e sem proteínas de origem animal para substituir a gema de ovo vêm sendo estudados e testados nos últimos anos (Bousseau et al., 1998; Aires, 2003; Alberti, 2004). Um exemplo são os diluidores a base de lecitina de soja (fosfatidilcolina) que têm apresentado bons resultados, e já são utilizados comercialmente.

Aires et al. (2003) testaram o efeito de dois diluidores sobre a função espermática *in vitro* e a fertilidade *in vivo* para o sêmen bovino. Foram testados um diluidor a base de lecitina de soja (Andromed®) e outro a base de gema de ovo (TRIS-gema). Foram comparados os parâmetros de motilidade espermática, integridade acrossomal, inductibilidade da reação acrossômica, capacidade de ligação a zona pelúcida e fertilidade pela taxa de não retorno aos 56

dias, após a criopreservação. Concluíram que o diluidor a base de lecitina foi superior e que é uma alternativa viável aos diluidores tradicionais a base de gema de ovo (Aires et al., 2003; Alberti, 2004).

Segundo Gil et al. (2000), o espermatozóide criopreservado com Biociphos-plus® (a base de lecitina de soja) apresentou uma maior integridade de membrana, quando comparado ao Triladyl® (a base de gema de ovo). Porém Thun et al. (2002) obtiveram melhores resultados utilizando o meio Tris-gema que mostrou efeitos crioprotetores superiores se comparado ao Biociphos-plus®. Van Wagtendonk-de Leeuw et al. (2000) também realizaram esta comparação entre diluidores a base de gema e de lecitina de soja, e observaram que o Biociphos-plus® reduziu significativamente a fertilidade de quatro touros testados (citado por Alberti, 2004).

Amirat et al. (2004), comparando a fertilidade do sêmen criopreservado de bovino utilizando um diluidor contendo LDL e outro diluidor comercial Optidyl® (com 20% de gema de ovo), observaram que a motilidade espermática pós-descongelamento e a taxa de clivagem foram significativamente maiores no diluidor contendo LDL do que utilizando o Optidyl®. Concluindo que a o LDL pode ser uma ótima alternativa para meios quimicamente definidos.

4.4.4 Crioprotetores intracelulares (Penetrantes)

Os agentes crioprotetores penetrantes (ACP) são substâncias que diminuem as lesões de origem química ou mecânica que o congelamento causa sobre a célula (Karow, 2001, citado por Gonzalez, 2004). As características físico-químicas ideais que um agente crioprotetor penetrante deve possuir são: baixo peso molecular; alta solubilidade em meio aquoso e principalmente uma baixa toxicidade celular (Nash, 1966 citado por Gonzalez, 2004).

Muitas substâncias são classificadas como agentes crioprotetores intracelulares e têm sido utilizadas nos diluidores de congelamento de várias espécies. Existem os crioprotetores do grupo dos álcoois: etanol, etilenoglicol, glicerol, metanol, polietilenoglicol e propilenoglicol. As amidas, incluindo a acetamida, formamida, lactamida e dimetil-sulfóxido, além de outras substâncias que podem possuir efeito crioprotetor (Snoeck, 2003).

O glicerol ou Propano-1,2,3-triol (IUPAC, 1993) é um composto orgânico pertencente a função álcool que apresenta três grupos hidroxilas. Esta substância é considerada um agente crioprotetor penetrante (ACP), pois consegue penetrar no citoplasma da célula (Gonzalez, 2004; Holt, 2000) O glicerol foi o primeiro crioprotetor a ser utilizado em espermatozóides (Polge et al., 1949) e tem sido amplamente utilizado para o sêmen bovino (Gonzalez, 2004).

A ação protetora do glicerol parece estar ligada as suas propriedades coligativas que permitem realizar pontes de hidrogênio com a água; a redução do ponto de congelamento e a conseqüente redução da concentração de eletrólitos (sais ou solutos) na fração não congelada ajudariam a conter o prejudicial "efeito solução" que ocorre durante o processo de congelamento (Holt, 2000). As pontes de hidrogênio realizadas com a água diminui a formação de cristais de gelo e reduz o aumento de tamanho desses cristais além de diminuir a concentração de solutos nos meios extra e intracelulares (Dalimata e Graham, 1997). Essas ligações de hidrogênio também promovem uma estabilização da estrutura quartenária das proteínas de membrana preservando-as da desidratação (Karow, 2001 citado por Gonzalez, 2004).

Segundo Kundu et al. (2000) outro mecanismo de proteção desta molécula se deve à capacidade de ligação dos átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila (OH) com os átomos de oxigênio dos grupos fosfato dos fosfolipídios da membrana do espermatozóide, promovendo assim a estabilização da membrana durante o processo de criopreservação.

A concentração de glicerol utilizada como crioprotetor é limitada pela sua toxicidade, a qual depende da taxa de resfriamento, velocidade de congelação, composição do meio diluidor e método de adição do glicerol (Fahy, 1986, citado por Gonzalez, 2004). Métodos convencionais de congelação em palhetas de 0,25 mL e 0,5 mL têm utilizado quantidades de 7% de glicerol como concentração ótima para diluidores à base de citrato-gema ou Tris-gema (De Leew et al, 1993). As concentrações de glicerol para congelação do sêmen bovino têm estado entre 0,25 M (2,25%) e 1M (9%), sendo que esta última concentração tem mostrado toxicidade (Fahy, 1976, citado por Gonzalez, 2004).

Segundo Parks e Graham (1992) os crioprotetores são essenciais para a sobrevivência das células, mas o glicerol pode também ter efeitos negativos sobre a célula. Além de seu efeito osmótico sobre as células, existem evidências de que o glicerol se liga diretamente aos fosfolipídios reduzindo a fluidez da membrana, e interage com proteínas e glicoproteínas da membrana causando agrupamento dessas partículas. O glicerol causa redução da capacitância elétrica da membrana provavelmente devido a reorganizações em larga escala da estrutura da membrana, possivelmente devido à formação de junções semelhante às junções tipo GAP. Além disso, ele induz a interdigitação dos folhetos da bicamada, alterando a fluidez da membrana e também altera a polimerização e despolimerização dos microtúbulos, o que pode afetar a membrana indiretamente.

Apesar de sua importância, há evidências de que o glicerol é tóxico ao espermatozóide e parte de sua toxicidade é devida a injúrias bioquímicas resultantes da ação direta do crioprotetor sobre os componentes subcelulares, mas danos osmóticos também podem ocorrer (Graham, 1995 citado por Celeghini, 2005). Seu efeito prejudicial é menor quando sua adição é feita a temperaturas próximas a 0ºC. Sabe-se que os espermatozóides do homem e de touros são mais resistentes à adição em uma única fase, de concentrações de 5 a 8% de glicerol, que outras espécies (Gao, Mazur e Critser, 1997; Agca e Critser, 2002; Gonzalez, 2004).

Sabe-se que o glicerol é metabolizado pelos espermatozóides do carneiro, do boi e do varrão, porém a via metabólica é diferente daquela que ocorre no fígado onde o glicerol é fosforilado por uma quinase, sendo ao invés disso, recrutado por uma desidrogenase NADP-dependente (Holt, 2000). O'Dell, Flipse e Almquist (1956) demonstraram que o glicerol marcado com C^{14} é rapidamente assimilado e utilizado pelo espermatozóide bovino, com produção de $^{14}CO_2$, e a taxa de assimilação é maior na ausência do plasma seminal. Mann e White (1956) demonstraram que os espermatozóides de carneiro lavados por centrifugação metabolizam o glicerol aerobicamente produzindo ácido lático e que esta produção é maior na presença de fosfato devido à ação inibitória deste sobre a oxidação do ácido lático, causando o seu acúmulo.

Garner et al. (1999) testaram os efeitos do glicerol sobre espermatozóides bovinos resfriados a 5ºC por 24 horas por meio da associação de sondas (JC-1; SYBR-14 e PI, e FITC-PNA e SYTO-17) e observaram que o glicerol parece não apresentar nenhum efeito total sobre a membrana plasmática, mas parece apresentar um efeito protetor sobre o acrossoma, porém diminuiu a

proporção de espermatozóides na amostra que exibiram alto potencial mitocondrial.

Apesar de tudo, demonstrou-se claramente que o glicerol protege os espermatozóides contra os danos da criopreservação em muitas espécies e vários estudos foram realizados para testar a eficácia dessa crioproteção utilizando vários níveis de glicerol (Hammerstedt et al. 1990; Watson, 1995). Portanto parece que o efeito protetor supera os efeitos negativos (Garner et al., 1999).

Gonzalez (2004) comparou os efeitos dos crioprotetores dimetilformamida, etilenoglicol e o glicerol na criopreservação do sêmen bovino sobre a motilidade (avaliada subjetivamente) e integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial (por meio da associação das sondas fluorescentes PI, MITO e FITC-PSA, na microscopia de epifluorescência). O autor concluiu que o glicerol preserva melhor a motilidade, o vigor e a integridade das membranas dos espermatozóides, quando comparado aos outros crioprotetores utilizados. Além disso, observou-se que o etilenoglicol é superior a dimetilformamida na conservação da motilidade e das membranas dos espermatozóides bovinos.

4.5 Métodos de avaliação do sêmen criopreservado

O objetivo primário de todas as análises de sêmen é determinar o potencial fertilizante de uma amostra de sêmen, utilizando métodos rápidos e que não sejam dispendiosos. Por muitos anos, os cientistas procuraram desenvolver métodos laboratoriais que pudessem predizer com precisão a capacidade fertilizante de uma amostra de sêmen. Este objetivo, entretanto, provou-se ser muito difícil de se conseguir, devido à natureza complexa do problema (Graham, 2001).

Graham et al. (1980) observaram que nenhum método laboratorial era confiavelmente correlacionado com a fertilidade. As correlações entre a fertilidade da amostra de sêmen e os resultados dos testes laboratoriais variaram muito entre vários estudos revisados (correlações entre fertilidade e motilidade variaram de 0,15 a 0,84; entre fertilidade e avaliações morfológicas variaram de 0,06 a 0,86; e entre fertilidade e viabilidade da célula variaram de 0,33 a 0,66) (Graham, 2001).

Nenhum teste laboratorial isolado, medindo apenas um atributo, pode estimar o potencial de fertilidade do sêmen, uma vez que, para ser capaz de fertilizar o oócito e permitir o desenvolvimento embrionário, os espermatozóides precisam apresentar diversos atributos (motilidade, acrossoma intacto, habilidade de se ligar a zona pelúcida, habilidade de se ligar ao oolema, etc) (Graham, 2001; Celeghini, 2005; Celeghini et al., 2007).

Para garantir a fertilidade, o sêmen deve apresentar características mínimas de concentração, motilidade e características morfológicas dos espermatozóides, as quais são parâmetros clássicos na avaliação de amostras de sêmen. Entretanto, estudos (Verstegen et al., 2002; Celeghini, 2005; Arruda, 2007) reportam que este tipo de análise manual é impreciso, mesmo quando executado por investigadores experientes. As análises são influenciadas por uma alta variação entre observações e observadores. Esta imprecisão deriva, em parte, da natureza subjetiva dos testes usados, da variabilidade entre técnicos e das diferenças na implementação de padrões para a avaliação (Verstegen et al., 2002; Celeghini, 2005).

A alta variabilidade na eficiência nos processos de congelamento de sêmen e de fecundação *in vitro* tem levado as avaliações andrológicas a técnicas mais apuradas, no que diz respeito à identificação do potencial

fecundante do espermatozóide do touro no trato genital feminino (Vale Filho et al., 2003). O espermatozóide é uma célula complexa que se torna infértil quando um dos vários aspectos bioquímicos ou morfológicos se encontra afetado. Normalmente a avaliação de somente um desses aspectos não garante a condição de normalidade dos outros, sendo que a combinação de vários fatores em uma análise multifatorial, seria mais apropriada para o diagnóstico da funcionalidade do espermatozóide (Melo, 1999).

Uma grande diversidade de biotécnicas vem sendo desenvolvida para a avaliação seminal, das quais pode-se citar sistemas de avaliação computadorizada das características seminais, uso de sondas fluorescentes para a avaliação das estruturas espermáticas por microscopia de epifluorescência ou sistema de citometria de fluxo, testes hiposmóticos, avaliação de proteínas do plasma seminal, produção de espécies reativas de oxigênio, entre outras (Arruda et al., 2004, citado por Celeghini, 2005)

4.5.1 A avaliação computadorizada da motilidade espermática (CASA)

A motilidade espermática é provavelmente a avaliação mais comumente realizada em sêmen criopreservado. Os resultados são subjetivos e é necessária uma boa experiência do examinador para uma avaliação confiável. Entretanto, segundo Graham (1996) a porcentagem de espermatozóides móveis avaliada visualmente, não é altamente correlacionada com fertilidade (citado por Melo, 1999; Juhász et al., 2000). Segundo Picket (1992), a motilidade espermática é um dos principais métodos de avaliação da preservação de espermatozóides e constitui um elemento importante na estimativa da viabilidade espermática.

Entretanto, na pesquisa de Kjaestad et al. (1993) relacionaram características seminais pós-descongelamento como motilidade, vigor e integridade de acrossoma, avaliados por microscopia de contrate de fase, com taxas de não retorno e comprovaram que a motilidade e o vigor proporcionam um dado confiável para a predição da fertilidade de touros.

Na tentativa de tornar as avaliações da qualidade espermática mais objetivas e detalhadas, foram desenvolvidas equipamentos para a análise computadorizada do sêmen. A análise computadorizada de parâmetros espermáticos (do inglês: Computer Assisted Semen Analysis – CASA) foi introduzida a mais de 20 anos atrás (Jasko et al., 1988), e desde então, é usado regularmente no processo de avaliação de sêmen em vários laboratórios. Pelo uso do CASA podem ser obtidos vários parâmetros específicos de motilidade descrevendo os movimentos do espermatozóide de maneira mais detalhada. Além disso, a classificação em espermatozóides móveis e imóveis pode ser baseada em limites de velocidade bem definidos. Paralelamente às tentativas de melhorar a performance dos sistemas de análise computadorizada CASA, é importante investigar a relevância biológica dos parâmetros do CASA no contexto da predição do potencial de fertilidade do macho, um conhecimento que é de crucial importância para a compreensão da biologia da fertilização (Larsen et al., 2000).

Os parâmetros mais importantes medidos no CASA são: velocidade, linearidade, porcentagem de espermatozóides móveis acima de certa velocidade, movimento oscilatório lateral. As relações entre fertilidade e os diferentes parâmetros de motilidade do espermatozóide analisados pelo CASA ainda precisam ser determinadas (Magistri et al., 1996 citado por Juhász et al., 2000).

Farrell et al. (1998) tentaram correlacionar os parâmetros avaliados pelo CASA com a fertilidade. Entre um a cinco parâmetros avaliados pelo CASA foram correlacionados individualmente com a fertilidade do touro, definida como as taxas de não retorno aos 59 dias corrigidas para efeitos de vaca e do rebanho. A porcentagem de espermatozóides móveis explicou apenas uma fração pequena da variação total da fertilidade (r^2 = 0.34). Entretanto altos valores de r^2 (0,68 a 0,98) foram obtidos quando 2 a 5 variáveis foram utilizadas em equações de regressão múltipla. Segundo estes autores os resultados são promissores, e futuros testes vão determinar mais precisamente qual dessas variáveis do CASA são mais úteis na estimativa do potencial de fertilidade do touro.

A avaliação automatizada da motilidade espermática é de grande interesse devido ao fato da cinética espermática ter relevância na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozóides. Dentre esses parâmetros, a velocidade progressiva e os padrões de movimentação celular têm sido correlacionados com penetração no muco cervical, penetração em oócitos de hamster e resultados de fertilização *in vitro* (Januskauskas et al., 1999; Arruda et al., 2007).

Um exemplo da importância do padrão de motilidade espermática é a hiperativação espermática. A hiperativação da motilidade espermática foi descrita como um movimento menos linear, menos progressivo e mais vigoroso do espermatozóide. Acredita-se que a hipermotilidade sinaliza a aquisição do estado de capacitação espermática, e essas mudanças envolvem um aumento na velocidade curvilinear (VCL), a qual é considerada um parâmetro mais informativo do que a velocidade progressiva (VSL) ou o deslocamento lateral da cabeça (LHD) (Januskauskas et al., 1999).

No experimento realizado por Januskauskas et al. (1999), observou-se que em amostras de sêmen bovino submetidas a resfriamento lento, os espermatozóides ficaram mais ativos independente do parâmetro de motilidade estudado (VSL, velocidade do trajeto [VAP] ou VCL). Porém, a grande diferença entre o procedimento de resfriamento rápido e lento foi nos valores de VCL, mas não nos valores de LHD. Isto mostra que os espermatozóides tornaram-se mais ágeis e também mudaram a suas trajetórias do movimento. Devido a isso, esses pesquisadores levantaram a suposição de que o resfriamento lento pode ser menos favorável do que o rápido para a sobrevivência espermática uma vez que se observou que o resfriamento lento causou uma redução do número de espermatozóides móveis e promoveu agilidade aos espermatozóides, o que pode afetar negativamente a longevidade.

4.5.2 Avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial.

A manutenção da capacidade fertilizante do sêmen depende da integridade e funcionalidade de diferentes estruturas celulares e isto dificulta o desenvolvimento de uma única técnica para a avaliação do potencial fertilizante que consiga avaliar todos esses atributos simultaneamente (Graham, 2001; Celeghini et al., 2007). Porém quando dados de vários métodos de avaliação espermática são utilizados em conjunto, consegue-se obter altas correlações com o potencial fertilizante da amostra de sêmen (Graham, 2001).

A fluorescência é um indicador sensível e específico do estado de certas moléculas (oxidadas x reduzidas, ionizadas x não ionizada, livres x ligadas), podendo ser aplicada como um meio para medir mudanças metabólicas em células vivas (Haugland, 2001). O emprego de sondas fluorescentes na andrologia tem o objetivo

de avaliar a integridade e função dos compartimentos da célula espermática (Celeghini, 2005; Celeghini et al., 2007).

Os corantes fluorescentes proporcionam avaliações mais objetivas das células espermáticas em relação aos métodos clássicos de coloração com microscopia óptica (Graham et al., 1990). As células espermáticas coradas com fluorescência podem ser avaliadas quanto aos aspectos morfológicos como quanto aos funcionais, sem a interferência do meio extracelular (Ericsson et al., 1989; Gonzalez, 2004).

4.5.2.1 Integridade da membrana plasmática

As membranas exercem um papel fundamental na manutenção da capacidade fertilizante do espermatozóide. A membrana plasmática é responsável pela manutenção do equilíbrio osmótico, atuando como uma barreira entre o meio intra e extracelular. Lesões nessa estrutura podem levar a perda da homeostase celular, levando à morte celular (Flesh e Gadella, 2000). Conseqüentemente, a integridade da membrana plasmática é crucial para a sobrevivência do espermatozóide no trato genital feminino, e para manter a capacidade fertilizante (Parks e Graham, 1992; Celeghini et al., 2007).

A determinação da integridade da membrana pode ser feita com a utilização de corantes fluorescentes (sondas) impermeáveis à membrana, com afinidade ao DNA. Assim, as células não coradas são consideradas com membrana plasmática intacta. O Hoeschst 33258 (H258), YoPro-1, iodeto de propídio (PI), homodímero de etidio (EthD-1), ToPro-3 e TOTO são exemplos desse tipo de sonda que já foram testadas em células espermáticas. Uma outra alternativa para o estudo da integridade de membrana é o uso de sondas acetiladas. Devido aos seus radicais acetil, essas sondas são anfipáticas e assim conseguem passar pela membrana intacta da célula viva, sendo imediatamente deacetiladas por esterases intracelulares, tornando a sonda impermeável. Assim, as células intactas apresentam coloração, enquanto as células mortas não são coradas, pois a sonda consegue sair facilmente da célula. Porém é possível haver ligação dessas sondas a células deterioradas com lesões da membrana. Exemplo dessas sondas são o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e o SYBR-14 (Silva e Gadella, 2006; Raphael, 2007).

Devido à alta toxicidade do brometo de etídio, principalmente para quem o manipula, sua aplicação tem sido restringida. Porém, o iodeto de propídio (PI), um corante fluorescente com propriedades similares passou a ser utilizado. O iodeto de propídio vem se destacando em pesquisas pela sua facilidade de preparação e aplicação da técnica, estabilidade e eficiência na avaliação da integridade de membrana, seja isoladamente ou associada a outro corante fluorescente para avaliar a membrana plasmática. Esta sonda possui afinidade ao DNA e cora em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada (Graham et al., 1990; Celeghini, 2005; Arruda et al., 2007).

É possível utilizar simultaneamente essas sondas, como SYBR-14 ou CFDA com PI ou EthD-1, para detectar células com membrana plasmática intacta e lesada, respectivamente (Silva e Gadella, 2006) Esta técnica de coloração dupla classifica a população de espermatozóides em 3 categorias: 1) Espermatozóides vivos, emitindo fluorescência verde, CFDA ou SYBR-14 (+); 2) espermatozóides mortos com núcleo emitindo fluorescência vermelha, PI (+) e CFDA ou SYBR-14 (-); 3) espermatozóides lesados, emitindo fluorescência verde e vermelha, PI (+) e CFDA ou SYBR-14 (+) (Juhász et al., 2000; Silva e Gadella, 2006).

4.5.2.2 Integridade da membrana acrossomal

Para fertilizar um oócito, o espermatozóide deve possuir um acrossoma intacto. A reação acrossômica caracteriza-se pela liberação das enzimas acrossômicas, que é um evento essencial para a penetração do espermatozóide na matriz extracelular da zona pelúcida e para a fusão com a membrana plasmática do oócito (Juhász et al., 2000; Flesh e Gadella, 2000; Celeghini et al., 2007).

A integridade do acrossoma pode ser verificada por diferentes técnicas de fluorescência. O caráter glicoprotéico dos componentes acrossomais fornece um outro meio de mensurar a integridade acrossomal, por preenchimento fluorescente da matriz acrossomal de espermatozóides com acrossoma lesado com lecitinas marcadas (Graham et al., 1990).

A integridade acrossomal pode ser medida utilizando-se lecitinas de plantas conjugadas a fluoróforos. As lecitinas cojungadas se ligam especificamente a cadeias de carboidratos de glicoproteínas presentes no acrossoma. As mais utilizadas são a aglutinina do *Pisum sativum* (PSA), da *Arachis hypogea* (PNA) e da *Concanavalia ensiformis* (ConA). A PSA se liga aos resíduos de α-manose e α-galactose de glicoproteínas da matriz acrossomal enquanto o PNA se liga a residos de β-galactose associados à membrana externa do acrossoma. Os espermatozóides que possuem membranas intactas não permitem a entrada e ligação dessas lecitinas, portanto, quando essas lecitinas são utilizadas sem permeabilização das células, elas se ligam à membrana de acrossomas lesados (Juhász et al., 2000; Graham, 2001; Silva e Gadella, 2006; Raphael, 2007; Celeghini et al., 2007).

A aglutinina PSA, quando conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) marca com sucesso o acrossoma espermático na cor verde amarelado, facilitando sua visualização e a identificação dos acrossomas lesados, sendo utilizado em espermatozóides de várias espécies, incluindo a espécie bovina (Graham et al., 1990; Celeghini, 2005; Arruda et al., 2007; Raphael, 2007).

Comprovando a eficiência e especificidade do FITC-PSA na avaliação da integridade de membrana acrossomal, Souza (2001) comparou quatro diferentes técnicas para exame de integridade do acrossoma: câmara úmida por microscopia de contrate de fase e de interferência diferencial, coloração por Trypan Blue/Giemsa e microscopia de epifluorescência utilizando o FITC-PSA, para sêmen eqüino criopreservado. Verificou que a técnica de epifluorescência com FITC-PSA foi a mais eficiente para detectar lesões de acrossoma (citado por Celeghini, 2005; Arruda et al., 2007).

4.5.2.3 Avaliação da função mitocondrial

Durante muito tempo acreditou-se que a principal fonte de energia para o movimento do espermatozóide provinha da fosforilação oxidativa que ocorre na bainha mitocondrial da peça intermediária. Entretanto, a importância da mitocôndria para a motilidade espermática (um processo que gasta ATP), foi reconsiderada recentemente. Vários trabalhos sugerem que os espermatozóides produzem a maior parte do ATP necessário para o batimento do flagelo por glicólise (produção anaeróbia de ATP), e que esta produção ocorre mesmo em condições aeróbicas. Além disso, provou-se a existência de enzimas envolvidas na glicólise que estão ligadas à bainha fibrosa, e também a importância da glicólise para a hiperativação. Espermatozóides submetidos a drogas que interferem na fosforilação oxidativa na mitocôndria continuaram vivos e móveis (Turner, 2006; Silva e Gadella, 2006).

Apesar de tudo, as mitocôndrias provavelmente fornecem energia para a peça intermediária e para a cabeça do espermatozóide, necessária para a manutenção de importantes processos na membrana. Dentre esses, uma das atividades mais importantes é a manutenção do gradiente de Na^+/K^+ ao longo da membrana. A bomba de Na^+/K^+ também está envolvida indiretamente no transporte de outras substâncias e assim regula os gradientes químico e elétrico da membrana plasmática, que influenciam na sobrevivência espermática. Dessa forma, a integridade funcional da mitocôndria pode ser importante para a sobrevivência espermática no trato genital feminino e nas técnicas de reprodução assistida (Silva e Gadella, 2006; Raphael, 2007).

A capacidade de monitorar mudanças no potencial de membrana mitocondrial das células *in situ* pode ser crucial para elucidar mudanças da fisiologia celular em várias situações experimentais (Celeghini et al., 2007). Os reagentes mais comuns que são sensíveis ao potencial de membrana mitocondrial são as rodaminas e as carbocianinas. O sucesso do uso dessas sondas em células vivas deve-se ao fato de não serem destrutivas nem causarem toxicidade (Reers et al., 1991; citado por Celeghini, 2005, Celeghini et al., 2007).

A Rodamina 123 é uma molécula fluorescente catiônica que é transportada para dentro de mitocôndrias ativas de células vivas. O princípio dessa sonda é que ela só é transportada e acumulada em mitocôndrias funcionalmente ativas, em função do potencial de transmembrana. No entanto, segundo Salvioli et al. (1997) a R123 identifica somente uma população de células com função mitocondrial, não possuindo a capacidade de diferenciar mitocôndrias com potencial de membrana alto ou baixo (citado por Celeghini, 2005). A sonda mitocondrial JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimi-dazolil carbocianina), existe como um monômero com excitação e emissão no comprimento de onda verde (510-520 nm). Entretanto, ele também exibe um segundo pico na faixa do vermelho-laranja (590 nm). O fenômeno que produz a fluorescência vermelha-laranja deve-se à formação de J-agregados. O JC-1 consegue identificar populações mitocondriais com diferentes potenciais de membrana. Mitocôndrias com alto potencial fluorescem em vermelho-laranja devido a formação de J-agregados (quando a concentração de JC-1 na mitocôndria aumenta, este corante forma agregados que fluorescem laranja), enquanto que aquelas mitocôndrias com baixo para médio potencial de membrana florescem em verde, devido ao fato do JC-1 no estado de monomérico fluorescem em verde (Garner et al., 1997; Graham,2001; Celeghini, 2005; Silva e Gadella, 2006).

Thomas et al. (1998), trabalhando com sêmen criopreservado, verificaram que a motilidade antes da criopreservação foi negativamente correlacionada com a proporção de mitocôndrias que apresentaram fluorescência verde ($r = -0,81$), ou seja, com baixo potencial de membrana e foi correlacionada positivamente com a proporção de mitocôndrias que apresentaram fluorescência vermelha-alaranjada ($r = 0,60$) com alto potencial de membrana. Entretanto, essas correlações não foram encontradas após a criopreservação, porém registraram correlações entre a motilidade e o total de espermatozóides corados com JC-1 (verdes + vermelhos). Eles observaram que menos de 1% dos espermatozóides corados por JC-1 apresentou J-agregados após a criopreservação e descongelamento. No entanto, estes autores não observaram diferenças ($P>0,11$) no potencial de membrana de mitocôndrias de espermatozóides criopreservados de bovinos.

Garner et al. (1997) compararam as sondas MITO, rodamina 123, e o JC-1 em sêmen bovino criopreservado, correlacionando-as

com motilidade e viabilidade espermáticas. Observaram que os espermatozóides corados com JC-1 tiveram as mais altas proporções de mitocôndrias coradas (59,0%; p<0,01). As três sondas fluorescentes identificaram populações espermáticas que foram significativamente correlacionadas com a motilidade espermática (r = 0,97; p<0,01) e com a viabilidade avaliada pela sonda SYBR-14 (r = 0,97; p<0,01).

4.5.2.4 A associação de sondas fluorescentes e a citometria de fluxo

Segundo Tartagliole e Ritta (2004) quanto mais parâmetros espermáticos são avaliados em uma amostra de sêmen bovino criopreservado, maior será o valor no prognóstico de fertilidade *in vitro*. As associações de sondas fluorescentes permitem avaliar simultaneamente vários compartimentos da célula espermática (Nagy et al., 2003; Celeghini et al., 2007; Raphael, 2007; Arruda et al., 2007).

Várias associações foram desenvolvidas e testadas por pesquisadores diferentes nos últimos anos. Entre essas destacam-se a associação de PI com SYBR-14, desenvolvida por Garner et al. (1986), que permite a visualização de células com membrana plasmática lesada (coradas em vermelho) e as células com membrana plasmática intacta (núcleo verde); outra associação é a do PI com o diacetado de carboxifluoresceína (CFDA), desenvolvida por Harrison e Vickers (1990) e associação tripla SYBR-14, PI e PE-PNA, que permite a avaliação das membranas na presença de partículas de gema de ovo, por citometria de fluxo (Nagy et al., 2003).

Celeghini et al. (2004; 2005), com o objetivo de desenvolver uma técnica rápida e precisa para a avaliação simultânea da integridade das membranas plasmáticas, acrossomal e função mitocondrial, testaram e validaram quatro técnicas de associação de sondas para bovinos, analisadas por microscopia de epifluorescência. Dentre as técnicas utilizaram as associações: PI, FITC-PSA e MitoTracker Green FM; PI, FITC-PSA e CMXRos ou PI, FITC-PSA, e JC-1. Dentre essas técnicas, a associação PI, FITC-PSA e JC-1 foi considerada a melhor, pois permite separar as populações de células com alto e baixo potencial de membrana mitocondrial de maneira mais clara (Celeghini, 2005; Celeghini et al., 2007; Arruda et al., 2007; Raphael, 2007).

Os problemas de se avaliar múltiplas características do espermatozóide são o tempo e o custo dessas técnicas. Utilizando métodos de citometria de fluxo, associados às sondas fluorescentes, múltiplas características, incluindo viabilidade celular, integridade acrossomal, e função mitocondrial, podem ser avaliadas simultaneamente nas células espermáticas. Além disso, essas avaliações quando feitas por microscopia de epifluorescência, apenas avaliam de 100 a 200 células. Entretanto há um ganho considerável quando o uso de sondas fluorescentes para análise de organelas é combinado com a citometria de fluxo, já que a citometria permite a avaliação de dezenas de milhares de células em menos de 1 minuto com precisão, a um custo razoável. Embora a citometria de fluxo seja uma ferramenta poderosa para avaliação de várias características, esta técnica não permite avaliar todos os atributos que o espermatozóide precisa para fertilizar o oócito (Graham et al., 1990; Graham, 2001; Celeghini et al., 2007; Arruda et al., 2007).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Locais e período do experimento

As atividades de coleta, avaliação pré-criopreservação, diluição e crioproservação das amostras de sêmen foram realizados na Fazenda Experimental Getúlio Vargas de propriedade da EPAMIG, localizada no município de Uberaba -MG, no período de 15 a 22 de Abril de 2007.

Os testes laboratoriais de integridade de membranas por citometria de fluxo e de análise computadorizada dos parâmetros de motilidade espermática (CASA) foram realizados no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, Campus de Pirassununga -SP.

Os demais testes foram realizados no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG, localizada em Belo Horizonte–MG. O Período experimental estendeu-se de Fevereiro a Novembro de 2007. Sendo que a coleta e criopreservação foram realizadas no mês de Março, e as análises do sêmen realizadas no período de Setembro à Novembro de 2007.

5.2 Animais e manejo

Foram utilizados 12 touros da raça Gir Leiteiro, clinicamente e andrologicamente normais, pertencentes à fazenda experimental Getúlio Vargas de propriedade da EPAMIG, com idades entre 2 a 4 anos, selecionados pela motilidade espermática (motilidade > 65% e vigor >4) e morfologia espermática de um grupo de 25 animais. Todos os animais foram mantidos sob as mesmas condições ambientais e de manejo, em pastagem de capim Braquiária, com disponibilidade de água e sal mineral *ad libidum*.

5.3 Coleta e análise do sêmen pré-criopreservação

As coletas de sêmen dos touros foram realizadas por eletroejaculação, sendo realizada higienização do prepúcio antes de cada coleta, externamente com água e internamente com solução fisiológica, para evitar possíveis contaminações.

Logo após a coleta, foram realizadas as análises físicas e morfológicas de rotina. Cada ejaculado foi avaliado quanto ao volume, concentração, motilidade, vigor, e quanto à morfologia espermática. Todo material utilizado na coleta e avaliação do sêmen foi mantido aquecido a 37ºC, para evitar choque térmico e alterações das características do sêmen. No momento da coleta o tubo de coletor era revestido por recipiente de isopor envolvido com papel alumínio, evitando assim o choque térmico. O volume foi avaliado pela leitura direta no tubo de coleta graduado. A concentração foi avaliada coletando-se uma amostra do sêmen e diluindo-se na proporção 1:100, em uma solução de formol-salina tamponada e a contagem foi realizada por meio da câmara de Neubauer utilizando-se microscopia óptica (Microscópio modelo XSZ-107, Coleman) com aumento de 400 vezes.

A motilidade e vigor foram avaliados subjetivamente, logo após a coleta, em preparação de uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula (pré-aquecidas, a 37ºC), por meio de microscopia óptica (Microscópio modelo XSZ-107, Coleman), em aumento de 100x; a motilidade foi expressa em porcentagem de espermatozóides móveis; enquanto que o vigor, que se refere à velocidade progressiva das células em movimento, foi classificado em escores de 1 a 5, sendo o escore 1 o mais lento e o escore 5 correspondendo ao mais rápido movimento progressivo uniforme.

Para a avaliação da morfologia espermática uma alíquota do ejaculado foi diluída em formol-salina tamponada, previamente aquecido (37ºC), para fixação e avaliado posteriormente, em laboratório, por meio de preparações úmidas, sob microscopia de contraste de fase (Microscópio Nikon Eclipse 50i), com aumento de 1000x, contando-se 200 células.

Estas avaliações foram feitas segundo os procedimentos do Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998).

5.4 Criopreservação do sêmen

Após a avaliação da motilidade e vigor das amostras de sêmen, o ejaculado de cada touro foi dividido em duas alíquotas (tratamentos) de mesmo volume, em tubos cônicos de 15 mL, e foram diluídas, utilizando-se para cada uma delas um diluidor diferente. Para uma alíquota utilizou-se o diluidor TRIS (a base de gema de ovo) e para a outra o diluidor Bioxcell® (a base de lecitina de soja), ambos utilizando o mesmo crioprotetor, o glicerol, porém o diluidor TRIS a 7% v/v (Anexo 5), e o diluidor Bioxcell® a 3,19% v/v de glicerol (Anexo 4). A diluição foi realizada em banho-maria à temperatura de 34ºC, atingindo uma concentração de 50 x 10^6 sptzs/mL, e os tubos foram identificados quanto ao tipo de diluidor e o touro. O diluidor TRIS (fração única, Anexo 5) foi previamente preparado no laboratório do setor de Reprodução animal da EV-UFMG, utilizando equipamento esterilizado e água destilada deionizada (Anexo 5), depois foi mantido em freezer a –15ºC, até o momento da utilização e descongelado. O diluidor Bioxcell® (IMV, L'Aigle, France) foi preparado de acordo com as instruções do manual do fabricante (Anexo 4).

Em seguida, os tubos contendo as duas alíquotas de sêmen diluído foram resfriados em um recipiente plásticos com água a 34ºC até atingir a temperatura ambiente (25ºC) e então as alíquotas foram envasadas em palhetas de 0,5 mL (25x10^6 sptzs/palheta) que foram vedadas com álcool polivinílico. As palhetas foram previamente identificadas quanto ao tratamento (diluidor e tempo de equilíbrio) e o número do touro.

Para o resfriamento e congelamento do sêmen foi utilizado um sistema programável de criopreservação do sêmen portátil (modelo TK-3000®) composto por um aparelho programável, equipado com um porta-palhetas de aço-inox, uma unidade ou tubo de resfriamento e uma caixa térmica para nitrogênio líquido, e com uma bateria em casos de queda de energia.

As palhetas foram transferidas e divididas em três máquinas de congelamento do mesmo modelo, uma vez que em cada máquina realizou-se um tempo de equilíbrio diferente (tempos de 0, 2 e 4 horas). Foram utilizadas as mesmas curvas de resfriamento e congelamento para ambos os diluidores e para todos os tratamentos, variando-se apenas o tempo de equilíbrio a 5ºC.

Para o resfriamento as palhetas foram colocadas no porta-palhetas, o qual foi adicionado ao tubo de resfriamento, permanecendo até alcançar 5ºC. O aparelho foi programado para realizar o resfriamento a partir da temperatura ambiente e seguindo uma curva de resfriamento de 0,25ºC/min até 5ºC, com duração em torno de 1h e 30 min. Cada máquina realizou um tempo de equilíbrio diferente (sem tempo de equilíbrio, 2 e 4h). Ao final de cada tempo de equilíbrio, o porta-palhetas foi removido para a caixa térmica contendo nitrogênio líquido (nível de 7 cm), na qual realizou-se a curva (P1S1) de congelamento com uma taxa de -20ºC/min de 5ºC até -120ºC.

Após atingir esta temperatura (-120ºC) as palhetas foram removidas do porta-palhetas e imersas no nitrogênio líquido. Por fim as palhetas colocadas em racks identificadas pelo nome do touro e tratamento e então armazenadas em nitrogênio líquido (-196º C), em botijões criogênicos até o momento de realização das análises pós-descongelamento. Assim, ficaram estabelecido seis tratamentos, sendo 2 diluidores e 3 tempos de equilíbrio.

Neste experimento foi criopreservado apenas um ejaculado por touro, e apenas ejaculados que apresentaram motilidade igual ou superior a 65 % de motilidade total e vigor 4 (escala de 1-5), desta forma minimizando-se a influência do ejaculado, e blocando-se o efeito touro.

5.5 Avaliações do sêmen Pós-criopreservação

Para cada análise realizada pós-descongelamento foram utilizadas duas palhetas de cada tratamento de um mesmo touro, procurou-se assim, retirar o efeito de palheta. O descongelamento foi realizado da mesma forma para todos os tratamentos. As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37ºC por 30 segundos. Após o descongelamento o sêmen foi colocado em um microtubo de 1,5 mL (tipo Eppendorf), homogeneizado e avaliados quanto aos parâmetros de motilidade e vigor visual (avaliados por microscopia óptica), motilidade avaliada por sistema computadorizado (CASA), alterações das características morfológicas, integridade das membranas plasmática e acrossomal, função mitocondrial, e a resposta ao Teste de Termorresistência (TTR) avaliado por microscopia óptica.

5.5.1 Avaliação da motilidade e vigor (Análise subjetiva da motilidade)

A motilidade e o vigor de cada amostra foram realizados imediatamente após o descongelamento, como descrito anteriormente para o sêmen fresco, juntamente com o TTR.

5.5.2 Avaliação computadorizada da motilidade espermática

Esta análise foi realizada no sêmen criopreservado com a diluição de $50x10^6$ sptz/mL logo após o descongelamento do sêmen. Foram utilizadas duas palhetas, do mesmo touro, por tratamento, que foram misturadas em microtubos de 1,5 mL. Deste pool, 5µL foram colocados na câmara de leitura (Leja® standard count, SC20.01.FA, 20 micron), previamente aquecida, e esta amostra foi inserida no aparelho IVOS (Versão 12.3, Hamilton-Thorne Bioscience). Este equipamento realiza a análise do sêmen por sistema computadorizado (*Computer Assisted Semen Analysis* – CASA), capturando a imagem da amostra por um microscópio acoplado a um computador e envia os dados para análise do movimento espermático através do programa *Animal Motility*, sendo previamente ajustado (*setup*) para análise de sêmen bovino (Anexo 3). Realizou-se a escolha manual dos campos de leitura e análise, sendo selecionados no mínimo os 10 melhores campos por amostra (campos sem alterações na lâmina).

As características de movimento espermático analisadas foram: Motilidade Total (MT, %), Motilidade progressiva (MotProg, %), velocidade do trajeto (VAP, µm/s), velocidade progressiva (VSL, µm/s), velocidade curvilinear (VCL, µm/s), deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm), freqüência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

Esta análise foi realizada com o apoio técnico e com o equipamento do Laboratório de Biotecnologias do Sêmen e Andrologia, no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, Campus de Pirassununga, São Paulo.

5.5.3 Análise da morfologia espermática

Para a análise de morfologia espermática, alíquotas do sêmen pós-descongelamento, de cada tratamento, foram retiradas para análise posterior, e adicionadas a 0,5 mL de solução formol-salina tamponada, previamente aquecida, e em seguida refrigeradas até o momento da análise.

Foi utilizada a técnica de preparações úmidas, com contagem de 200 células, em aumento de 1.000x, sob microscopia de contraste de fase (Microscópio Eclipse E-200i, Nikon®). As porcentagens das diversas anormalidades morfológicas foram agrupadas e classificadas em defeitos maiores e defeitos menores.

5.5.4 Análises da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial

Antes da realização do experimento foram realizados testes para o ajuste (compensação) do citômetro de fluxo (FACSaria, Becktson-Dickeson®), como descritos a seguir.

5.5.4.1 Testes para o ajuste do Citômetro de Fluxo

Realizaram-se alguns testes para o ajuste do citômetro de fluxo. Para esses testes utilizaram-se amostras de sêmen fresco (de bovino e também de suíno) com alta motilidade (>80%), diluído 1:1 com diluidor. Foram separadas duas amostras de 1 mL cada, sendo que uma foi submetida ao *flash frozen*, que são três ciclos de congelamento rápido seguido de descongelamento lento, no intuito de lesar os espermatozóides (Arruda, 2000, citado por Raphael, 2007; Celeghini, 2005). Dessa forma, uma amostra continha a maioria dos espermatozóides lesados pelo *flash frozen* enquanto a outra apresentava a maioria dos espermatozóides íntegros. Em seguida, ambos foram subdivididos e corados com o iodeto de propídio (PI-0,5 mg/mL, Sigma-Aldrich), FITC-PSA (100 μg/mL), PI + FITC-PSA, e JC-1 (153 μM, Molecular Probes), cujos protocolos estão descritos adiante (Anexos 1 e 2). As amostras coradas foram encaminhadas para o citômetro de fluxo. Primeiramente foram analisadas as amostras com PI, para que assim fosse determinado o local específico (*gate*) onde a maioria dos espermatozóides se encontrava no gráfico gerado pela análise da amostra, sendo que este *gate* foi estipulado como padrão para todas as análises seguintes. Então foram analisadas as amostras com FITC-PSA, PI + FITC-PSA, e JC-1. Todas as sondas foram ajustadas no aparelho de forma a identificar com precisão os espermatozóides com alterações das membranas devido à criopreservação.

Os testes foram repetidos até a obtenção de resultados coerentes. Assim, o melhor ajuste obtido para cada sonda foi estipulado como padrão, para que fosse possível a realização das análises do experimento.

5.5.4.2 Análises do Experimento no Citômetro de Fluxo

Foram descongeladas 2 palhetas de cada tratamento em banho-maria a 37ºC por 30 segundos. O conteúdo das palhetas foi então transferido para microtubos (tipo Eppendorf), e homogeneizado. Essas amostras foram então diluídas com meio TALP *sperm*, previamente aquecido a 37ºC (Bavister et al., 1983) (Anexo 1) na concentração de 25 $x10^6$ sptz/mL. Após esta diluição, foram retiradas duas alíquotas de 150μL desta amostra e cada uma foi acondicionada em um microtubo de 1,5 mL, sendo que em um foi adicionado 3μL de PI e 80μL de FITC-PSA, para analisar, respectivamente, a integridade das membranas plasmática e acrossomal, e no outro tubo 6μL de JC-1, para analisar o potencial de membrana mitocondrial (Anexo 2). As amostras foram incubadas por 8 minutos, em temperatura ambiente e protegidos da luz.

Após esta etapa de incubação, as amostras foram adicionadas com 600μL de TALP, a fim de diminuir a concentração espermática por mL; em seguida, foram transferidas para tubos cônicos de 15 mL, devido ao suporte da plataforma do citômetro de fluxo. Para realizar as análises foi utilizado o *laser* de

argônio (Modelo Sapphire 488-20, Coherent®) e os filtros C (*Long Pass* 595nm / *Band Pass* 610/20nm), D (*LP* 556nm / *BP* 575/26nm) e E (*LP* 520 nm / *BP* 530/30nm). Em cada amostra foram analisadas 10.000 células, classificadas em diferentes categorias como mostram os quadros a seguir (Quadro 1 e 2).

Quadro 1 – Classificação das células de acordo com a integridade das membranas plasmática e acrossomal, detectadas pelas sondas PI e FITC-PSA, respectivamente – Pirassununga – 2007.

Categorias Quanto a Integridade das Membranas Plasmática e Acrossomal	Siglas
Membranas Acrossomal e Plasmática Intactas	AIMPI
Membranas Acrossomal Lesada e Plasmática Intacta	ALMPI
Membranas Acrossomal Intacta e Plasmática Lesada	AIMPL
Membranas Acrossomal e Plasmática Lesadas	ALMPL

Quadro 2 – Classificação das células de acordo com o potencial de membrana mitocondrial, detectado pela sonda JC-1 – Pirassununga – 2007.

Categorias Quanto ao Potencial de Membrana Mitocondrial	Siglas
Alto Potencial de Membrana Mitocondrial	APM
Médio Potencial de Membrana Mitocondrial	MPM
Baixo Potencial de Membrana Mitocondrial	BPM

A metodologia desta análise é uma adaptação das metodologias utilizadas por Celeghini et al. (2004), Celeghini et al. (2007, 2008), uma vez que neste experimento a análise foi feita por citometria de fluxo e a dos referidos trabalhos foi realizada por microscopia de epifluorescência.

No citômetro de fluxo utilizado, o filtro de leitura da fluorescência do PI e do FITC-PSA é o mesmo do alto e do baixo potencial mitocondrial (JC-1), respectivamente. Isto impossibilitou o uso simultâneo, uma vez que os comprimentos de onda destas sondas se sobrepõem, podendo comprometer a análise. Assim, neste experimento optou-se por utilizar o JC-1 separadamente. Este protocolo é o mesmo utilizado por Raphael (2007), porém adaptado para bovinos.

5.5.5 O Teste de Termorresistência (TTR)

O Teste de Termorresistência utilizado foi o TTR rápido. Duas palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos, e após o descongelamento o conteúdo das palhetas foi transferido para um microtubo de 1,5 mL sendo este colocado em banho-maria a 45°C, durante 1 hora (Arruda, 1988). Em intervalos de 15 minutos, o sêmen era avaliado visualmente entre lâmina e lamínula, em aumento de 100x, sobre platina aquecedora a 37ºC, utilizando um microscópio óptico adaptado a uma câmera de vídeo e a um monitor de vídeo, para se detectar quedas sucessivas da motilidade e vigor espermáticos.

5.5.6 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental foi em blocos generalizados, tendo o reprodutor como bloco, em arranjo fatorial 2x3 (2 diluidores x 3 tempos de equilíbrio), totalizando 6 tratamentos. As variáveis estudadas foram: parâmetros de motilidade espermática, integridade da membrana plasmática, integridade do acrossoma, função mitocondrial, longevidade avaliada pelo TTR rápido, e morfologia pós-descongelamento. Os resultados das médias e seus respectivos desvios padrão foram apresentados em gráficos e tabelas.

Os dados foram analisados empregando-se o programa SAEG 9.1 (Sistema de Análises Estatísticas e genéticas – UFV). Primeiramente foi verificada a normalidade dos dados, pelo teste de Lilliefors, e a homogeneidade das variâncias pelos testes de Cochran e Bartlett. Os valores que não respeitaram as premissas sofreram transformação logarítmica. As características que respeitaram as premissas (com ou sem as transformações propostas) foram submetidas à análise de variância para verificar os efeitos do diluidor, tempo e do bloco. As principais interações foram testadas pelo teste F de Fisher. Para a comparação de médias foi utilizado o teste de Duncan, ao nível de significância de 5%.

Os dados que não apresentaram distribuição normal e homogeneidade das variâncias, mesmo após as tentativas de transformação foram avaliados por intermédio de testes não-paramétricos. Nesse caso, o estudo do efeito das combinações de diluidor e tempo sobre as observações foi realizado por intermédio do teste de Friedman, considerando o touro como bloco. Caso os resultados obtidos neste teste indicassem a existência de efeito significativo dos tratamentos sobre a característica, os contrastes de níveis de um fator dentro de um determinado nível do outro fator foram estudados utilizando o teste de Wilcoxon, para isto utilizou-se o software estatístico Stat-View® 5.0 (SAS institute, Inc.1998). Todo procedimento experimental pode ser visualizado na figura a seguir (Figura 01). As fotos dos equipamentos e das etapas do experimento podem ser visualizadas no Anexo 7.

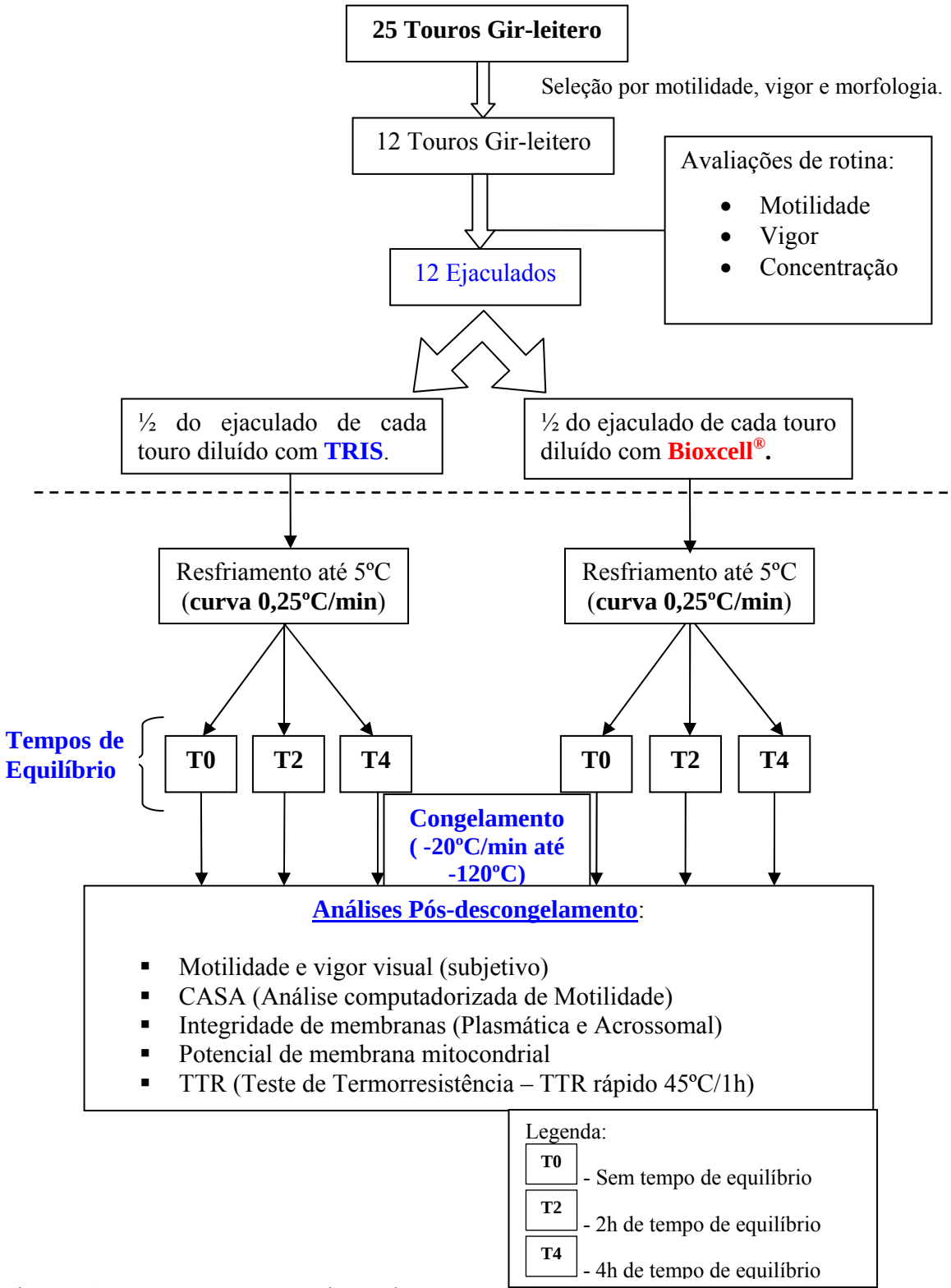


Figura 1 – Esquema experimental

6 RESULTADOS:

6.1 Análise computadorizada da motilidade espermática

6.1.1 Motilidade Total (MT)

Houve interação entre tempo de equilíbrio e diluidor (P<0,05). Os tratamentos sem tempo de equilíbrio (T0) apresentaram os menores valores (BioT0 = 16,75 ± 15,53 %; TrisT0 = 14.50 ± 12.73 %) diferindo-se de 2h (T2) e 4h (T4) para motilidade total, para ambos diluidores (BioT2 = 24,17 ± 15,43%; BioT4 = 28,58 ± 8,22%; TrisT2: 36,67 ± 13,88 %; TrisT4 = 41,0 ± 11,82 %). Não houve diferença estatística entre T2 e T4 (P>0,05), quando se observa dentro de cada diluidor separadamente. O diluidor TRIS foi melhor (P<0,05) que o Bioxcell®, nos tempos de 2 e 4h para motilidade total, porém não houve diferença entre os diluidores no tempo 0h (P>0,05), ou seja, sem tempo de equilíbrio (Gráficos 1 e 2).

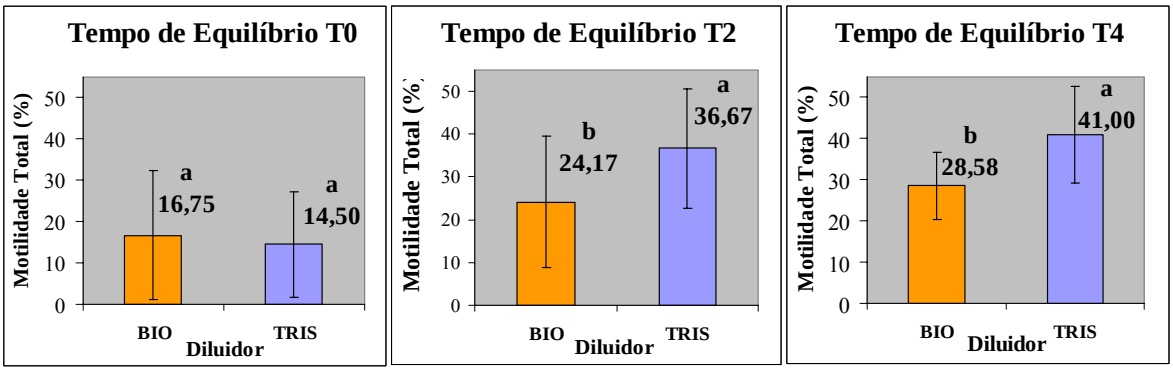


Gráfico 1 – Efeito do diluidor sobre a motilidade total (média ± desvio padrão) dentro de cada tempo de equilíbrio, estimada por sistema computadorizado (CASA) em sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. [a]Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (P<0,05).

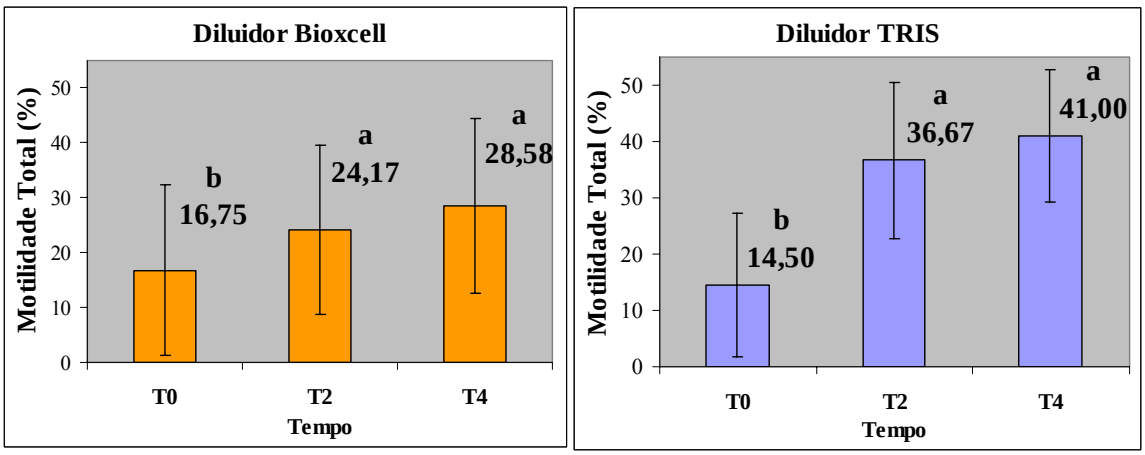


Gráfico 2 – Efeito do tempo de equilíbrio sobre a motilidade total (média ± desvio padrão) dentro de diluidor, estimada por sistema computadorizado (CASA) em sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. [a] Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (P<0,05).

6.1.2 Motilidade Progressiva (MotProg)

Houve interação entre tempo de equilíbrio e diluidor (P<0,05) para motilidade progressiva. Os tratamentos sem tempo de equilíbrio (T0) apresentaram os menores valores (BioT0 = 13,83 ± 11,95 %; TrisT0 = 10,75 ± 9,29%) diferindo-se (P<0,05) de 2h (T2) e 4h (T4) para motilidade progressiva, para ambos diluidores. Não houve diferença estatística entre T2 e T4 (P>0,05), quando se observa dentro de cada diluidor separadamente. O diluidor TRIS foi melhor (P<0,05) que o Bioxcell®, nos tempos de 2 e 4h (BioT2 = 19,83 ± 12,59%; BioT4 = 22,92 ± 6,13%; TrisT2 = 26,58±11,11%; TrisT4 = 30,75±10,37%), porém não houve diferença entre os diluidores quando não se utilizou o tempo de equilíbrio (P>0,05) (Gráficos 3 e 4).

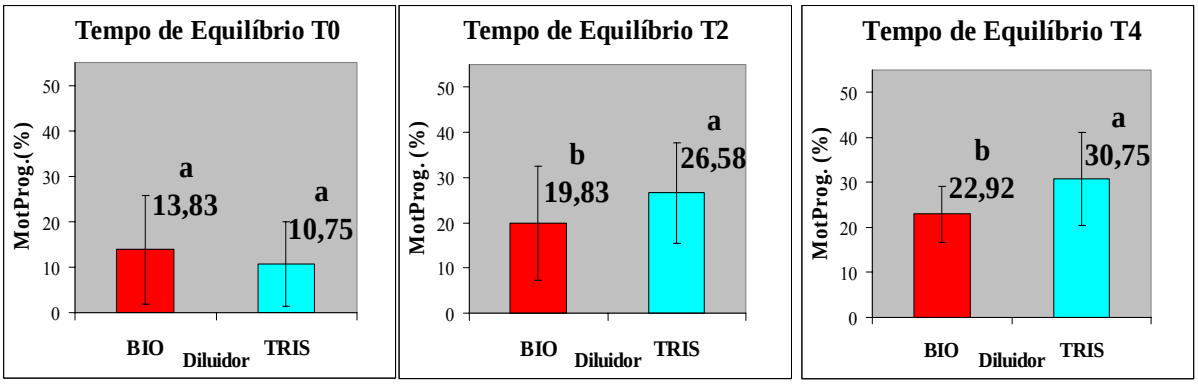


Gráfico 3 – Efeito do diluidor sobre a motilidade progressiva (média ± desvio padrão) dentro de cada tempo de equilíbrio, estimada por sistema computadorizado (CASA) em sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. [a]Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (P<0,05).

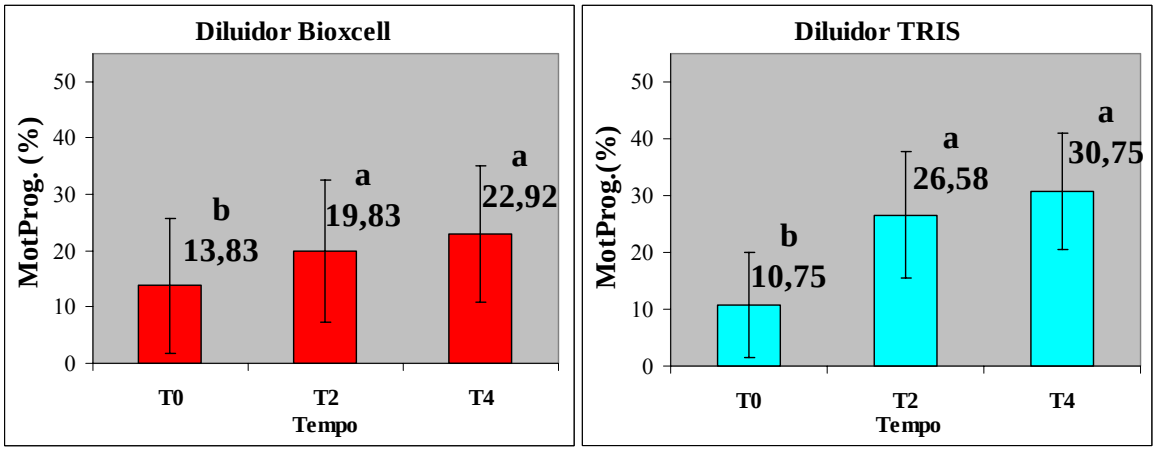


Gráfico 4 – Efeito do tempo de equilíbrio sobre a motilidade progressiva (média ± desvio padrão) dentro de diluidor, estimada por sistema computadorizado (CASA) em sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. [a] Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (P<0,05).

6.1.3 Velocidade do trajeto (VAP)

Não houve interação entre tempo de equilíbrio e diluidor (P>0,05), e o efeito do diluidor (P>0,05) e do tempo de equilíbrio não foram significativos (P>0,05) para a velocidade do trajeto (VAP). Os valores de médias e desvios padrão estão apresentados abaixo (Tabela 1).

Tabela 1 - Médias ± desvios padrão da velocidade do trajeto (VAP; µm/s), de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio.

	Tempos de Equilíbrio			Média geral
Diluidor	**T0**	**T2**	**T4**	**Diluidor**
TRIS	70,84 ± 8,59	72,3 ± 11,16	71,78 ± 10,82	71,64 ± 9,98
BIO	80,68 ± 12,96	73,24 ± 7,14	71,81 ± 7,94	75,24 ± 10,21
Média geral Tempo	75,76 ± 11,87	72,77 ± 9,17	71,79 ± 9,28	

[a] Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Duncan (P<0,05);
* os efeito de tempo de equilíbrio e diluidor não foram significativos (P>0,05).

6.1.4 Velocidade progressiva (VSL)

Em relação à velocidade progressiva (VSL, *µm/s*), não houve interação entre tempo de equilíbrio e diluidor (P>0,05), e o efeito do tempo de equilíbrio não foi significativo (P>0,05), porém o efeito de diluidor foi significativo (P<0,05), sendo que os valores de velocidade progressiva foram maiores para o diluidor Bioxcell®, em comparação com os valores encontrados para o diluidor TRIS (Gráfico 5; Tabela 2).

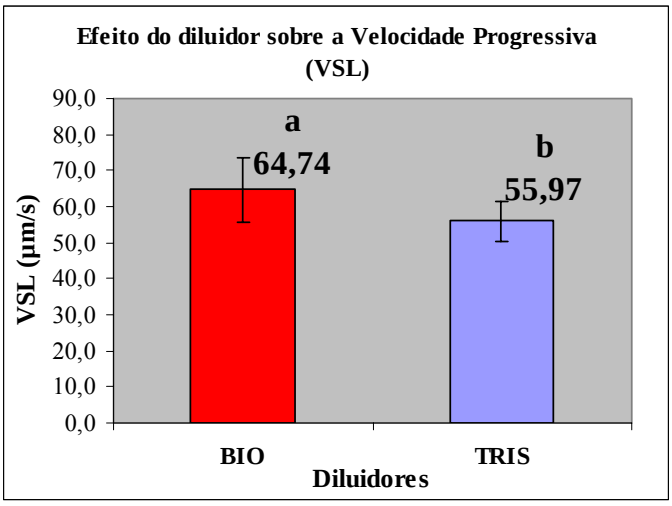


Gráfico 5 – Efeito do diluidor sobre Velocidade Progressiva (média ± desvio padrão) de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio, estimada por sistema computadorizado (CASA). [a]Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (P<0,05).

Tabela 2 - Médias ± desvios padrão da velocidade progressiva (VSL; *µm/s)*, de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio.

	Tempos de Equilíbrio			Média geral
Diluidor	**T0**	**T2**	**T4**	**diluidor**
TRIS	56,89 ± 4,36	55,19 ± 6,43	55,83 ± 6,12	**55,97 ± 5,59** [b]
BIO	69,08 ± 11,71	63,02 ± 6,26	62,14 ± 7,03	**64,74 ± 8,98** [a]
Média geral Tempo	62,98 ± 10,65	59,10 ± 7,38	58,99 ± 7,20	

[a] Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (P<0,05);
***** o efeito do tempo de equilíbrio não foi significativo (P>0,05).

6.1.5 Velocidade Curvilinear (VCL)

Não houve interação entre tempo de equilíbrio e diluidor (P>0,05), e o efeito do diluidor e do tempo de equilíbrio, tomados isoladamente, não foram significativos (P>0,05) para a velocidade curvilinear (VCL), os valores de médias e desvios padrão de cada tratamento estão apresentados abaixo (Tabela 3).

Tabela 3 - Médias ± desvios padrão da velocidade do trajeto (VCL; *µm/s*), de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio.

	Tempos de Equilíbrio			Média geral
Diluidor	**T0**	**T2**	**T4**	**Diluidor**
TRIS	120,82 ± 13,74	124,75 ± 20,48	121,63 ± 17,42	122,40 ± 17,01
BIO	136,88 ± 26,37	123,39 ± 13,22	119,57 ± 16,47	126,61 ± 20,38
Média geral Tempo	128,85 ± 22,14	124,07 ± 16,88	120,60 ± 16,61	

[a] Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Duncan (P<0,05);
***** os efeito do tempo de equilíbrio e diluidor não foram significativos (P>0,05).

6.1.6 Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH)

Em relação à amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, *µm*), não houve interação entre tempo de equilíbrio e diluidor (P>0,05), e o tempo de equilíbrio não apresentou efeito significativo (P>0,05). Entretanto, o diluidor apresentou efeito significativo (P<0,05), sendo que os valores foram significativamente (P<0,05) maiores para o diluidor TRIS (ALH = 6,11 ± 1,01), em comparação com os valores encontrados para o diluidor Bioxcell® (ALH = 5,61± 1,01) (Gráfico 6; Tabela 4).

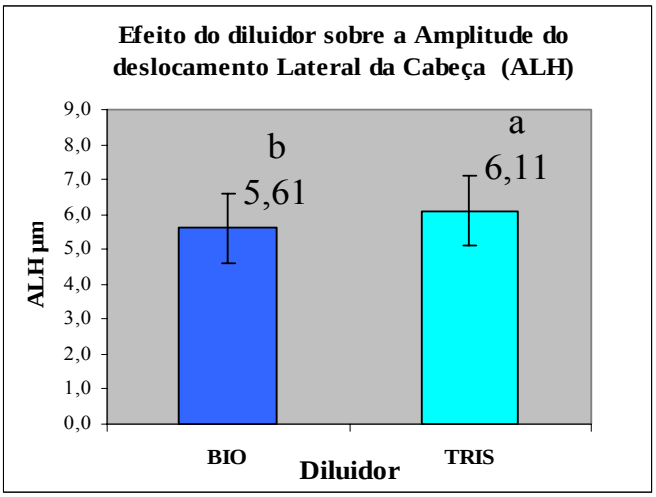


Gráfico 6 – Efeito do diluidor sobre a Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (média ± desvio padrão) de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio, estimada por sistema computadorizado (CASA). [a]Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (P<0,05).

Tabela 4 - Médias ± desvios padrão da Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH; µm), de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio.

	Tempos de Equilíbrio			Média geral
Diluidor	**T0**	**T2**	**T4**	**Diluidor**
TRIS	6,15 ± 1,15	6,18 ± 1,04	5,99 ± 0,92	**6,11 ± 1,01** [a]
BIO	5,79 ± 1,30	5,62 ± 0,83	5,43 ± 0,89	**5,61 ± 1,01** [b]
Média geral Tempo	5,97 ± 1,21	5,90 ± 0,96	5,71 ± 0,93	

[a] Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística pelo teste de Duncan (P<0,05);
* o efeito do tempo de equilíbrio não foi significativo (P>0,05).

6.1.7 Freqüência de Batimentos Flagelares (BCF)

Em relação à freqüência de batimentos flagelares (BCF, Hz), não houve interação entre tempo de equilíbrio e diluidor (P>0,05), e o efeito do tempo de equilíbrio não foi significativo (P>0,05). Entretanto, o efeito isolado de diluidor foi significativo (P<0,05), sendo que os valores da freqüência de batimentos flagelares foram significativamente (P<0,05) maiores para o diluidor Bioxcell® (BCF = 29,68 ± 4,97), em comparação com os valores encontrados para o diluidor TRIS (BCF = 22,26 ± 4,80) (Gráfico 7; Tabela 5).

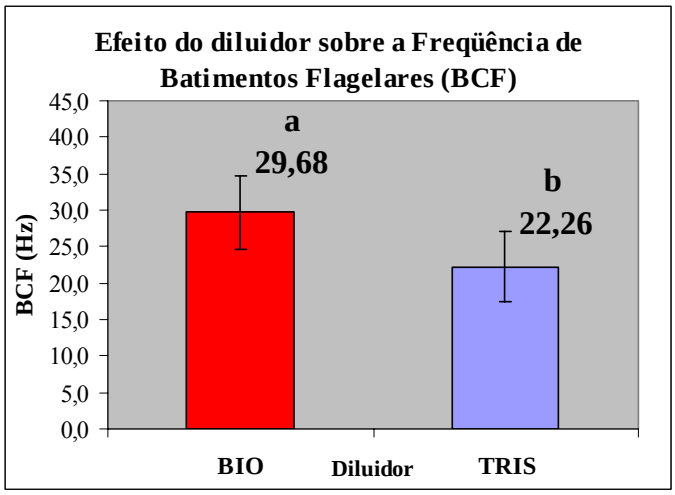


Gráfico 7 – Efeito do diluidor sobre a Freqüência de Batimentos Flagelares (BCF; Hz) (média ± desvio padrão) de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio, avaliada por sistema computadorizado (CASA). [a]Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (P<0,05).

Tabela 5 - Médias ± desvios padrão da Freqüência de Batimentos Flagelares (BCF; Hz), de espermatozóide bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio.

	Tempos de Equilíbrio			Média geral
Diluidor	**T0**	**T2**	**T4**	**Diluidor**
TRIS	22,26 ±5,22	22,53 ± 4,73	22,0 ± 4,87	**22,26 ± 4,80** [b]
BIO	29,43 ± 5,87	30,44 ± 4,25	29,15 ± 5,00	**29,68 ± 4,97** [a]
Média geral Tempo	25,85 ± 6,55	26,48 ± 5,97	25,58 ± 6,05	

[a] Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (P<0,05).
* o efeito de tempo de equilíbrio não foi significativo (P>0,05).

6.1.8 Retilinearidade (STR)

A característica de retilinearidade é calculada pela razão entre a velocidade progressiva e a velocidade de trajeto (STR = VSL/VAP), portanto é expresso em porcentagem. Esta variável não apresentou um comportamento que permitisse a utilização de testes paramétricos. Portanto, foi necessária a utilização de testes não paramétricos. Para o diluidor Tris, houve diferença significativa entre os tratamentos com 0 e 2 horas de tempo de equilíbrio, quanto à retilinearidade, sendo que T0 apresentou maiores valores do que tempo T2, porém o tempo T4 não diferiu significativamente de T2 e de T0. Em todos os tempos de equilíbrio o diluidor Bioxcell apresentou valores mais altos para STR do que o diluidor TRIS (Tabela 6).

Tabela 6 - Médias ± desvios padrão da Retilinearidade (STR; %), do movimento de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio.

	Tempos de Equilíbrio			Média geral
Diluidor	**T0**	**T2**	**T4**	**Diluidor**
TRIS	81,58 ± 4,81^{aB}	78,33 ± 6,34 ^{bB}	79,58 ± 5,70 ^{abB}	**79,83 ± 5,65**
BIO	85,42 ± 4,58 ^{aA}	86,08 ± 3,48 ^{aA}	86,58 ± 3,03 ^{aA}	**86,03 ± 3,68**
Média geral Tempo	83,5 ± 5,00	82,21 ± 6,38	83,08 ± 5,72	

^{aA} Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença significativa das medianas (P<0,05), pelo teste de Wilcoxon.

6.1.9 Linearidade (LIN)

Em relação à linearidade do movimento espermático (LIN, %), não houve interação entre tempo de equilíbrio e diluidor (P>0,05), e o efeito do tempo de equilíbrio não foi significativo (P>0,05). Entretanto, o efeito isolado de diluidor foi significativo (P<0,05), sendo que os valores de linearidade foram significativamente (P<0,05) maiores para o diluidor Bioxcell® (Bio = 53,69 ± 5,02), em comparação com os valores encontrados para o diluidor TRIS (Tris = 48,72 ± 4,46) (Gráfico 8; Tabela 7).

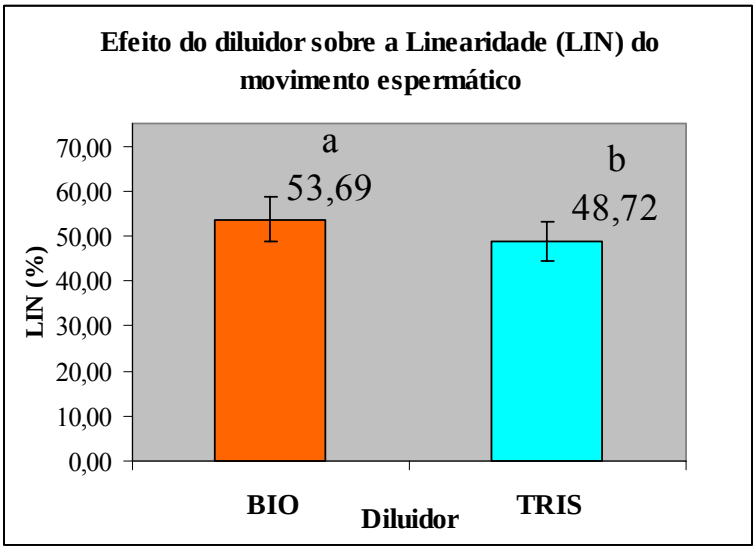


Gráfico 8 – Efeito do diluidor sobre a Linearidade (LIN; %) (média ± desvio padrão) de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio, avaliada por sistema computadorizado (CASA). [a]Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (P<0,05).

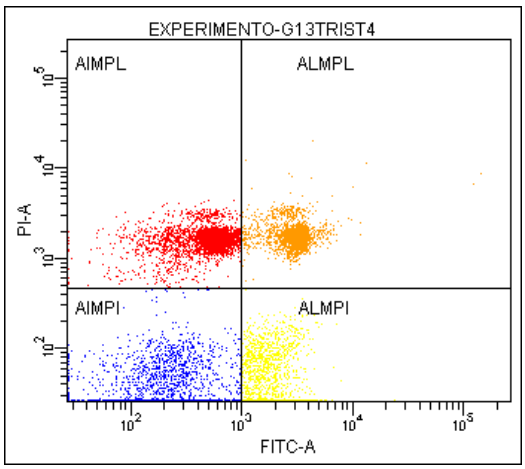
Tabela 7 - Médias ± desvios padrão da Linearidade (LIN; %), do movimento de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio.

	Tempos de Equilíbrio			Média geral
Diluidor	**T0**	**T2**	**T4**	**Diluidor**
TRIS	50,25 ± 3,33	47,33 ± 4,98	48,58 ± 4,78	**48,72 ± 4,46** [b]
BIO	53,25 ± 6,30	53,42 ± 4,34	54,42 ± 4,58	**53,69 ± 5,02** [a]
Média geral Tempo	51,75 ± 5,16	50,38 ± 5,52	51,50 ± 5,46	

[a] Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (P<0,05).
* o efeito de tempo de equilíbrio não foi significativo (P>0,05).

6.2 Análises da integridade das membranas plasmática, acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial

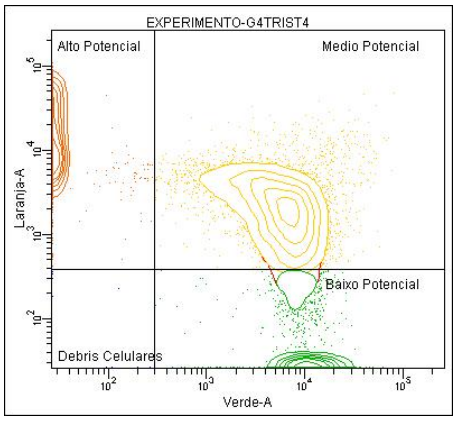
Na análise no citômetro de fluxo, foram emitidos gráficos e uma tabela de porcentagens para cada análise, de onde foram extraídos os resultados. Para a análise da integridade de membranas foram selecionadas as porcentagens das células com membrana plasmática intacta e acrossoma intacto (AIMPI - quadrante inferior esquerdo), a somatória de membrana plasmática lesada (MPL - quadrantes superiores), e a somatória de membrana acrossomal lesada (AL – quadrantes da direita) (Figura 2). Para a análise estatística do potencial de membrana mitocondrial, foi selecionado somente o alto potencial (APM – quadrante superior esquerdo) (Figura 3).



Experiment Name: PI/FITC-TICIANO
Tube Name: G13TRIST4

Population	#Events	%Total
AIMPL	3,107	31.1
ALMPL	2,236	22.4
AIMPI	2,415	24.2
ALMPI	2,242	22.4

Figura 2 – Exemplos de gráfico de pontos e tabela de porcentagens originadas pelo citômetro de fluxo na análise da integridade das membranas plasmática e acrossomal dos espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio.



Experiment Name: JC-1-TICIANO
Tube Name: G4TRIST4

Population	%Parent
Alto Potencial	27.8
Medio Potencial	51.7
Debris Celulares	0.1
Baixo Potencial	20.3

Figura 3 – Exemplos de gráfico de densidade e tabela de porcentagens originados pelo citômetro de fluxo na análise do potencial de membrana mitocondrial dos espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio.

6.2.1 Membranas Plasmática e Acrossomal Intactas (AIMPI)

Houve interação entre tempo de equilíbrio e diluidor (P<0,05), para a porcentagem de espermatozóides com Acrossoma Intacto e Membrana Plasmática Intacta (AIMPI). Os tratamentos sem tempo de equilíbrio (T0, controle) apresentaram os menores valores diferindo-se (P<0,05) de 2h (T2) e 4h (T4) em relação à porcentagem de AIMPI, para ambos diluidores. Para o diluidor Bioxcell®, não houve diferença significativa (P>0,05) entre os tempos de equilíbrio de 2 (T2) e 4 (T4) horas, mas observou-se diferença significativa entre estes (T2 e T4) e o tratamento sem tempo de equilíbrio (P<0,05). Para o diluidor TRIS observou-se diferença significativa entre os três tempos de equilíbrio (P<0,05), sendo que no tempo de 4 horas de equilíbrio este diluidor apresentou os maiores valores de AIMPI, portanto para o diluidor TRIS, 4 horas foi melhor que 2 horas, e ambos os tempos foram melhores que o controle (T0). Quando observado dentro de cada tempo, o diluidor TRIS apresentou maiores valores em relação à integridade de membrana plasmática e acrossomal do que o Bioxcell® (P<0,05), nos tempos de 2 e 4 horas de equilíbrio. Porém, não houve diferença significativa para AIMPI entre esses dois diluidores quando não se utilizou o tempo de equilíbrio (T0) (Tabela 8; Gráficos 9 e 10).

Tabela 8 - Médias ± desvios padrão de espermatozóides com membrana plasmática e acrossomal intactas (AIMPI, %), em sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio.

	Tempo de Equilíbrio			Média geral
Diluidor	**T0**	**T2**	**T4**	**Diluidor**
TRIS	8,75 ± 3,80 $^{c\,A}$	20,89 ± 6,06 $^{b\,A}$	26,81 ± 7,58 $^{a\,A}$	18,82 ± 9,61
BIO	6,91 ± 4,57 $^{b\,A}$	15,20 ± 8,15 $^{a\,B}$	18,27 ± 5,94 $^{a\,B}$	13,46 ± 7,89
Média geral Tempo	7,83 ± 4,22	18,05 ± 7,60	22,54 ± 7,96	

^{aA} Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença pelo teste de Duncan (P<0,05).

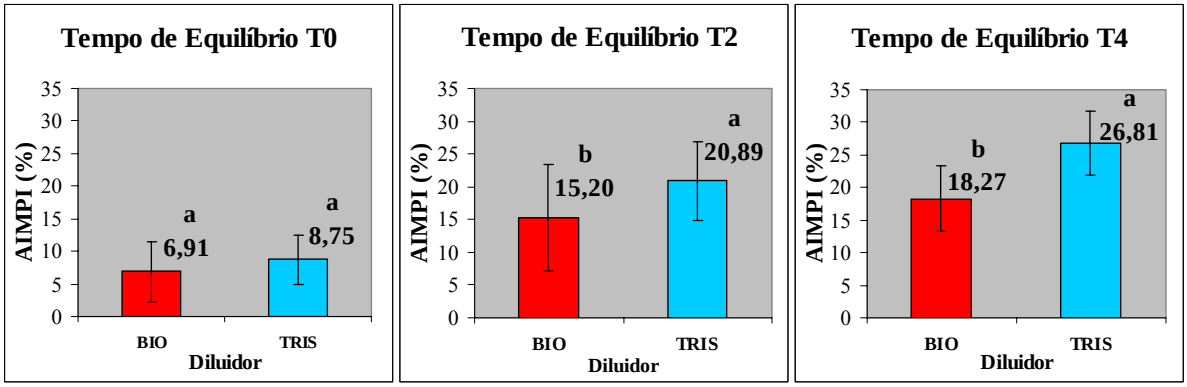


Gráfico 9 - Efeito do diluidor sobre a Integridade das membranas plasmática e acrossomal (AIMPI, %) (média ± desvio padrão) avaliada por citometria de fluxo, dentro de cada tempo de equilíbrio, em sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. [a]Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (P<0,05).

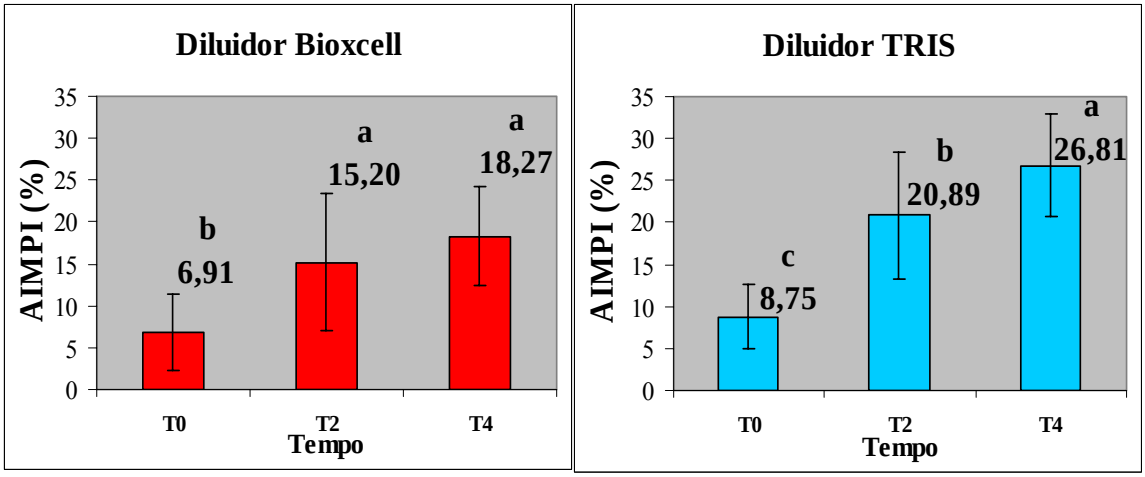


Gráfico 10 - Efeito do tempo de equilíbrio sobre a Integridade das membranas plasmática e acrossomal (AIMPI, %) (média ± desvio padrão) avaliada por citometria de fluxo, dentro de cada diluidor, em sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. [a] Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (P<0,05).

6.2.2 Membrana Plasmática Lesada (MPL)

Para a porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática lesada, avaliada por citometria de fluxo observou-se que não houve interação entre tempo de equilíbrio e diluidor (P>0.05). Entretanto houve efeitos isolados de diluidor e de tempo de equilíbrio sobre a MPL (%). O diluidor Bioxcell® apresentou maiores porcentagens de espermatozóides com membrana plasmática lesada (Bioxcell® MPL = 85,83 ± 7,92 %), enquanto que o diluidor TRIS apresentou as menores (TRIS MPL = 72,22 ± 13,26 %). Em relação ao tempo de equilíbrio, observou-se que o tempo de 4h apresentou

as menores porcentagens de espermatozóides com MPL, diferindo-se de 2h, e ambos diferiram do tratamento sem tempo de equilíbrio (controle, T0), indicando que um tempo de equilíbrio mais longo (T4) foi benéfico para a integridade de membrana plasmática em comparação com um tempo menor (T2), e os tratamentos com 2 e 4 horas apresentaram menores valores de MPL do que quando não se utilizou o tempo de equilíbrio (Gráfico 11; Tabela 9).

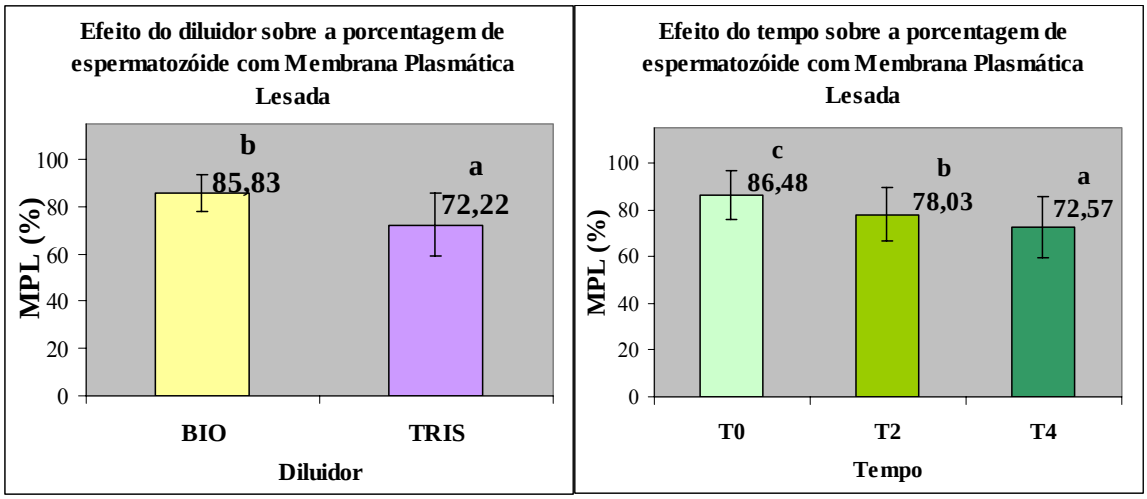


Gráfico 11 – Efeitos isolados de tempo de equilíbrio e de diluidor sobre a porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática lesada (MPL, %) (média ± desvio padrão), avaliada por citometria de fluxo, em sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. [a] Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (P<0,05).

Tabela 9 - Médias ± desvios padrão de espermatozóides com membrana plasmática lesada (MPL, %), em sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio.

	Tempo de Equilíbrio			**Média geral**
Diluidor	**T0**	**T2**	**T4**	**Diluidor**
TRIS	80,69 ± 11,61	71,82 ± 10,70	64,16 ± 12,69	**72,22 ± 13,26** [A]
BIO	92,27 ± 4,71	84,25 ± 8,23	80,98 ± 6,01	**85,83 ± 7,92** [B]
Média geral Tempo	**84,48 ± 10,49** [c]	**78,03 ± 11,29** [b]	**72,57 ± 12,96** [a]	

[aA] Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença pelo teste de Duncan (P<0,05).

6.2.3 Membrana Acrossomal Lesada (AL)

Houve interação entre tempo de equilíbrio e diluidor (P<0,05), para a porcentagem de espermatozóide com membrana acrossomal lesada (AL). O tratamento sem tempo de equilíbrio (T0, controle) apresentou os maiores valores diferindo-se (P<0,05) de 2h

(T2) e 4h (T4), para o diluidor TRIS, porém para este diluidor não houve diferença significativa (P>0,05) entre 2h e 4h de equilíbrio para a porcentagem de AL. Entretanto, para o diluidor Bioxcell® não houve diferença significativa entre os dois tempos de equilíbrio e o controle (T0), sem tempo de equilíbrio (ou seja, T0 = T2 = T4; e T0 = T4). Quando tomados separadamente cada tempo de equilíbrio, observou-se que no tempo controle (T0) não houve diferença significativa entre os diluidores, em relação a AL. No tempo de 2h de equilíbrio houve diferença significativa (p< 0,05) entre os diluidores, sendo que o diluidor Bioxcell® foi pior (P<0,05), pois apresentou uma maior porcentagem de AL. Porém no tempo de equilíbrio de 4h não houve diferença significativa (P>0,05) entre os dois diluidores (Gráficos 12 e 13; Tabela 10).

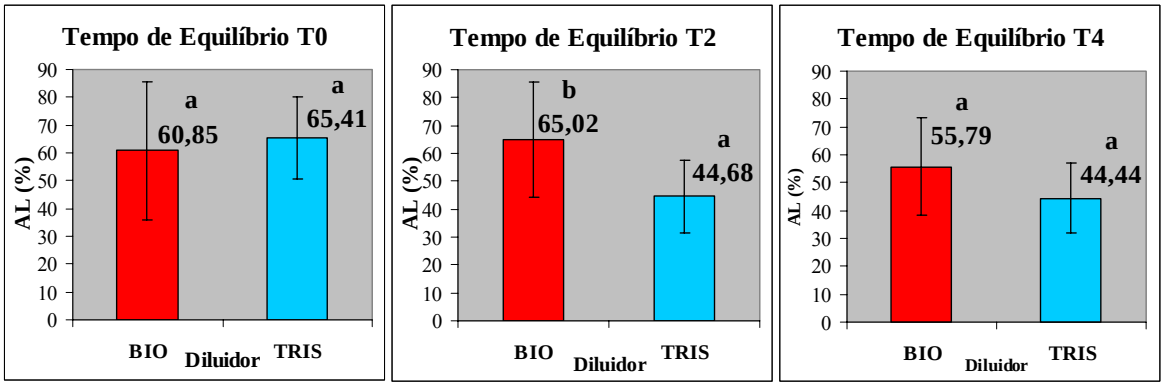


Gráfico 12 - Efeito do diluidor sobre a porcentagem de espermatozóides com membrana acrossomal lesada (AL, %) (média ± desvio padrão) avaliada por citometria de fluxo, dentro de cada tempo de equilíbrio, em sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. [a]Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (P<0,05).

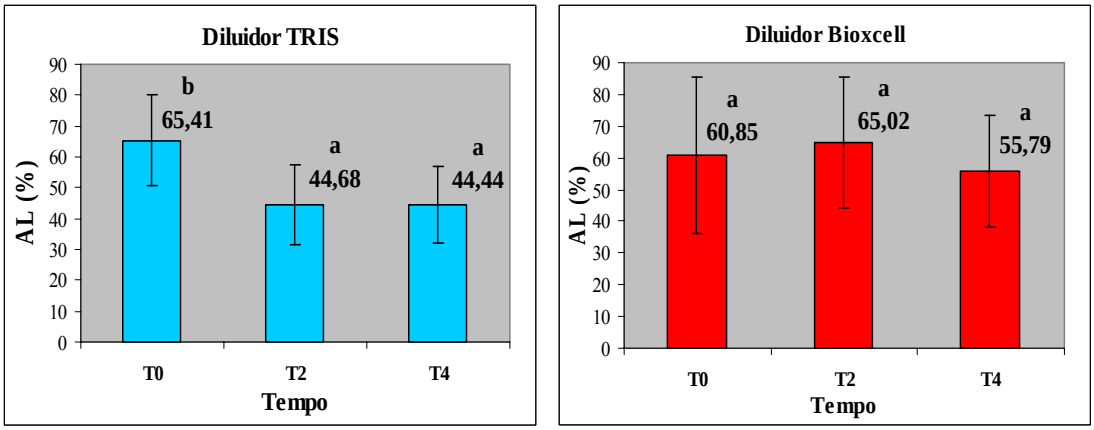


Gráfico 13 - Efeito do tempo de equilíbrio sobre a porcentagem de espermatozóide com membrana acrossomal lesada (AL, %) (média ± desvio padrão) avaliada por citometria de fluxo, dentro de cada diluidor, em sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. [a]Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (P<0,05).

Tabela 10 - Médias ± desvios padrão de espermatozóides com membrana acrossomal lesada (AL, %), em sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio.

	Tempo de Equilíbrio			Média geral
Diluidor	**T0**	**T2**	**T4**	**Diluidor**
TRIS	65,41 ± 14,77 $^{b\,A}$	44,68 ± 12,97 $^{a\,A}$	44,44 ± 12,54 $^{a\,A}$	51,51 ± 16,44
BIO	60,85 ± 24,74 $^{a\,A}$	65,02 ± 20,67 $^{a\,B}$	55,79 ± 17,49 $^{a\,A}$	60,55 ± 20,91
Média geral Tempo	63,13 ± 20,06	54,85 ± 19,81	50,12 ± 15,97	

^{aA} Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença pelo teste de Duncan (P<0,05).

6.2.4 Alto Potencial de Membrana Mitocondrial (APM)

Em relação ao potencial de membrana mitocondrial, avaliou-se apenas a porcentagem de células espermáticas que apresentavam alto potencial mitocondrial. Observou-se que os efeitos de diluidor e de tempo de equilíbrio não foram significativos (P>0,05) para a característica alto potencial mitocondrial (APM). Esta análise foi realizada com apenas 11 blocos, devido à perda de uma parcela durante a análise (Tabela 11).

Tabela 11 - Médias ± desvios padrão de espermatozóides bovinos com alto potencial de membrana mitocondrial (APM, %) criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio.

	Tempo de Equilíbrio			Média geral
Diluidor	**T0**	**T2**	**T4**	**Diluidor**
TRIS	20,65 ± 12,14	22,39 ± 7,09	19,89 ± 10,10	20,98 ± 9,73
BIO	19,93 ± 19,58	17,67 ± 11,96	15,56 ± 9,94	17,72 ± 14,10
Média geral Tempo	20,29 ± 15,90	20,03 ± 9,90	17,73 ± 10,02	

***** Os efeitos de tempo de equilíbrio e de diluidor não foram significativos (P>0,05)

6.3 Teste de Termorresistência Rápido (TTR-rápido)

Para análise estatística de resistência ao teste utilizou-se porcentagem de espermatozóides móveis, avaliados subjetivamente entre intervalos de 15 minutos. Utilizou-se para a comparação entre os tratamentos apenas a motilidade inicial e a motilidade após 30 e 60 minutos de incubação no TTR-rápido (45ºC/ 1h). Por ter sido utilizada avaliação subjetiva da motilidade, foi analisada como característica não-paramétrica. Considerou-se cada combinação de fatores (Diluidor e tempo de equilíbrio) um tratamento, e

quando o efeito de tratamento foi significante pelo teste de Friedman, utilizou-se o teste de Wilcoxon para comparar os tratamentos. Quanto à motilidade inicial, observou-se que os tratamentos que utilizaram o tempo de equilíbrio (T2 e T4) apresentaram valores significativamente maiores (P<0,05) de motilidade inicial comparados com os tratamentos que não utilizaram o tempo de equilíbrio (T0), para ambos diluidores. Não houve diferença significativa (P>0,05) entre os diluidores para motilidade inicial, nos tratamentos sem tempo de equilíbrio. Porém, nos tratamentos de 2 e 4 horas de equilíbrio, observou-se diferença significativa entre os diluidores quanto à motilidade inicial pós-descongelamento, sendo que o diluidor TRIS apresentou maiores valores do que o diluidor Bioxcell (Tabela 12).

Após 30 e 60 minutos de exposição ao TTR-rápido, Observou-se que a diferença existente entre os tratamentos que utilizaram o tempo de equilíbrio e os tratamentos sem tempo de equilíbrio se manteve até o final do teste de termorresistência. Na avaliação após 30 minutos do início do TTR, observou-se diferença significativa entre os diluidores, sendo que nos tratamentos sem tempo de equilíbrio o Bioxcell foi melhor (P<0,05) do que o diluidor TRIS. Porém no tempo de equilíbrio de 2 horas, o diluidor TRIS apresentou melhores resultados de motilidade do que o Bioxcell. Não houve diferença significativa entre o diluidor TRIS e o diluidor Bioxcell nos tratamentos com tempo de equilíbrio de 4h, na avaliação após 30 minutos de exposição ao TTR-rápido (Tabela 13).

Na avaliação após 60 minutos, observou-se que houve diferença significativa entre os diluidores apenas nos tratamentos sem tempo de equilíbrio (TRIST0 e BIOT0). Porém não houve diferenças significativas na motilidade entre os diluidores, após 60 minutos de TTR-rápido, dentro dos tempos de 2 e 4 h de equilíbrio. Nessa avaliação de 60 minutos observou-se diferença significativa entre os tratamentos que utilizaram o tempo de equilíbrio (T2 e T4) e os tratamentos sem tempo de equilíbrio (T0), para ambos diluidores utilizados no experimento (Tabela 14).

Tabela 12 - Médias ± desvios padrão de porcentagem de espermatozóides móveis (Motsubj, %) em sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio, avaliada por microscopia óptica logo após o descongelamento.

	Tempos de Equilíbrio		
Diluidores	**T0**	**T2**	**T4**
TRIS	15,60 ± 12,66 ^{bA}	36,0 ± 13,50 ^{aA}	40,0 ± 11,06 ^{aA}
BIO	17,0 ± 15,49 ^{bA}	25,0 ± 14,53 ^{aB}	30,5 ± 14,80 ^{aB}

^{aA} Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença significativa das medianas (P<0,05), pelo teste de Wilcoxon.

Tabela 13 - Médias ± desvios padrão de porcentagem de espermatozóides móveis (Mot30, %) em sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio, avaliada por microscopia óptica 30 minutos após o início do TTR-rápido.

	Tempos de Equilíbrio		
Diluidores	**T0**	**T2**	**T4**
TRIS	6,5 ± 9,02 ^{bB}	26,5 ± 11,80 ^{aA}	29,0 ± 12,43 ^{aA}
BIO	10,9 ± 12,87 ^{cA}	18,5 ± 9,14 ^{bB}	24,5 ± 11,65 ^{aA}

^{aA} Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença significativa das medianas (P<0,05), pelo teste de Wilcoxon.

Tabela 14 - Médias ± desvios padrão de porcentagem de espermatozóides móveis (Mot60, %) em sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio, avaliada por microscopia óptica 60 minutos após o início do TTR-rápido.

	Tempos de Equilíbrio		
Diluidores	**T0**	**T2**	**T4**
TRIS	2,10 ± 4,79 ^{bB}	12,40 ± 11,63 ^{aA}	12,8 ± 12,20 ^{aA}
BIO	4,20 ± 7,27 ^{bA}	8,30 ± 7,56 ^{aA}	11,60 ± 8,69 ^{aA}

^{aA} Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença significativa das medianas (P<0,05), pelo teste de Wilcoxon.

6.4 Análise da Morfologia Espermática

6.4.1 Morfologia pré-criopreservação

Abaixo (Tabela 15) são mostradas as médias e desvios padrão dos principais defeitos encontrados na avaliação no sêmen fresco antes da diluição e criopreservação. No Anexo 6 é mostrada uma tabela contendo todos os defeitos encontrados no sêmen antes da criopreservação.

Tabela 15 - Média ± desvios padrão da porcentagem dos principais defeitos espermáticos do sêmen bovino fresco pré-criopreservação, avaliada por microscopia de contraste de fase.

	Defeitos Espermáticos					
	Def._Maiores (%)	Across	**Def._menores (%)**	GCD	CaudaDob	**Def. Totais (%)**
Médias	**9,75 ± 4,71**	**2,42 ± 1,98**	**10,67 ± 6,02**	**5,25 ±6,92**	**3,58 ± 2,84**	**20,42 ± 5,73**

Across – Defeitos de acrossomo; GCD – Gota Citoplasmática Distal; CaudaDob – Cauda Dobrada; Avaliação segundo CBRA (2008) e espermiograma segundo Blom (1973).

6.4.2 Morfologia pós descongelamento

Em relação à morfologia pós-descongelamento, não houve nenhuma interação significativa (P>0,05) entre os efeitos de diluidor e tempo de equilíbrio em relação aos principais defeitos espermáticos. Observou-se, entretanto, a ocorrência de efeitos isolados de diluidor e tempo de equilíbrio. Quanto ao total de defeitos espermáticos, observou-se efeito significativo de tempo e de diluidor isoladamente. O diluidor TRIS apresentou maior porcentagem (P<0,05) de defeitos totais em relação ao Bioxcell®. O tempo de equilíbrio de 4h apresentou os melhores resultados, apresentando a menor porcentagem de defeitos totais, diferindo-se de 2h e do tratamento sem tempo de equilíbrio. O tempo de equilíbrio de 2 h apresentou uma menor porcentagem de defeitos totais em relação ao tempo T0, e o tratamento sem tempo de equilíbrio apresentando os maiores valores (P<0,05), para o total de defeitos espermáticos (Gráfico 14; Tabela 16).

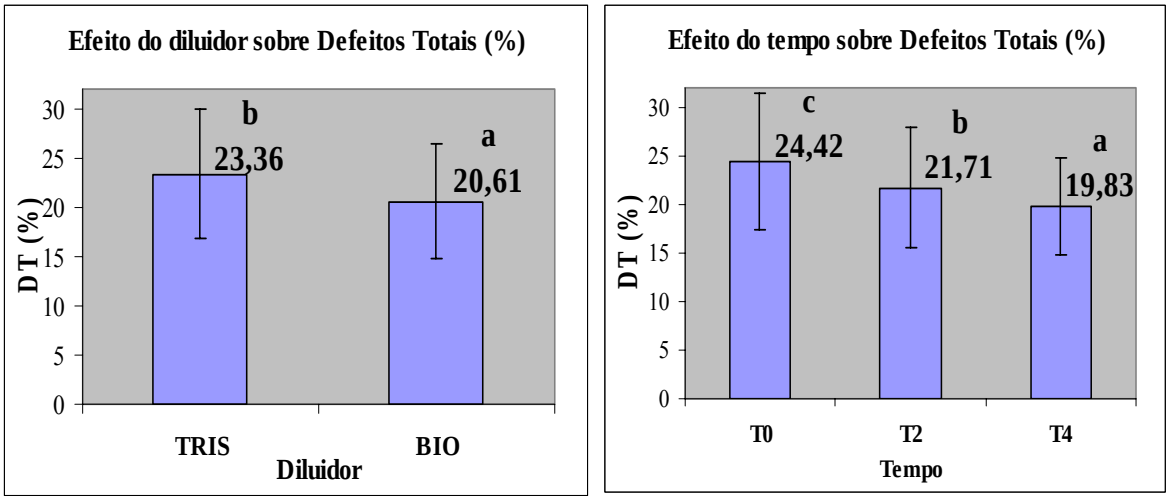


Gráfico 14 – Efeitos isolados de tempo de equilíbrio e de diluidor sobre a percentagem de Defeitos totais (DT, %) (média ± desvio padrão) de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. [a] Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (P<0,05).

Tabela 16 - Médias ± desvios padrão de porcentagem de Defeitos Totais (**DT**, %), de espermatozóides bovinos criopreservados com dois diluidores e três tempos de equilíbrio.

	Tempo de Equilíbrio			**Média geral**
Diluidor	**T0**	**T2**	**T4**	**Diluidor**
TRIS	26,33 ± 7,54	23,08 ± 6,17	20,67 ± 4,75	23,36 ± 6,52 [B]
BIO	22,50 ± 6,32	20,33 ± 6,04	19,00 ± 5,27	20,61 ± 5,91 [A]
Média geral Tempo	24,42 ± 7,08 [c]	21,71 ± 6,13 [b]	19,83 ± 4,98 [a]	

[aA] Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença pelo teste de Duncan (P<0,05).

Quando avaliados separadamente os defeitos maiores e defeitos menores, observou-se que os efeitos de tempo de equilíbrio e de diluidor não foram significativos para defeitos maiores. Esta variável não apresentou um comportamento que permitisse a utilização de testes paramétricos (não apresentava distribuição normal). Portanto, foi necessária a utilização de testes não paramétricos (teste de Friedman), e não foi encontrada significância para o efeito dos tratamentos (Tabela 17).

Os defeitos de acrossoma também não apresentaram distribuição normal, mas os testes não paramétricos demonstraram que o efeito de tratamento foi significativo para esta característica, e observou-se que houve diferença significativa entre os diluidores, dentro de cada tempo de equilíbrio. Porém não houve diferença estatística entre os tempos de equilíbrio, quando avaliados dentro de diluidor. Portanto o único efeito significativo sobre esta característica foi o efeito de diluidor (Tabela 18).

Tabela 17 - Médias ± desvios padrão de porcentagem de Defeitos Maiores (**Def. Maiores**, %), de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio.

	Tempo de Equilíbrio			**Média geral**
Diluidor	**T0**	**T2**	**T4**	**Diluidor**
TRIS	9,50 ± 4,06	8,25 ± 2,63	7,83 ± 3,01	8,53 ± 3,27
BIO	11,67 ± 5,28	10,58 ± 4,48	10,17 ± 4,00	10,81 ± 4,53
Média geral Tempo	10,58 ± 4,74	9,42 ± 3,79	9,00 ± 3,66	

***** Os efeitos de tempo dos tratamentos não foram significativos (P>0,05) pelo teste de Friedman

Tabela 18 - Médias ± desvios padrão de porcentagem de Defeitos de acrossoma (**Def. Acrossoma**, %), de espermatozóides bovinos criopreservados com dois diluidores e três tempos de equilíbrio.

	Tempo de Equilíbrio			**Média geral**
Diluidor	**T0**	**T2**	**T4**	**Diluidor**
TRIS	2,67 ± 1,78 ^{aA}	2,42 ± 1,44 ^{aA}	2,17 ± 1,64 ^{aA}	2,42 ± 1,59
BIO	5,50 ± 3,55 ^{aB}	5,08 ± 4,03 ^{aB}	5,25 ± 3,52 ^{aB}	5,28 ± 3,61
Média geral Tempo	4,08 ± 3,11	3,75 ± 3,26	3,71 ± 3,11	

^{aA} Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença significativa das medianas (P<0,05), pelo teste de Wilcoxon.

Ao analisar separadamente os defeitos menores, esta característica apresentou com distribuição normal após transformação logarítmica. Para esta característica não houve interação significativa (P>0,05) entre diluidor e tempo de equilíbrio, mas houve efeito isolado de diluidor e de tempo de equilíbrio (P<0,05). O diluidor Bioxcell® apresentou menores valores para porcentagem de feitos menores (Def. menores) em relação ao diluidor TRIS. O tempo de equilíbrio de 4 horas apresentou os menores valores de defeitos menores, diferindo-se do tratamento sem tempo de equilíbrio. Porém, o tempo de equilíbrio T2 não se diferiu de T4 ou de T0. O tratamento sem tempo de equilíbrio, portanto, apresentou os maiores valores para defeitos menores (Gráfico 15; Tabela 19).

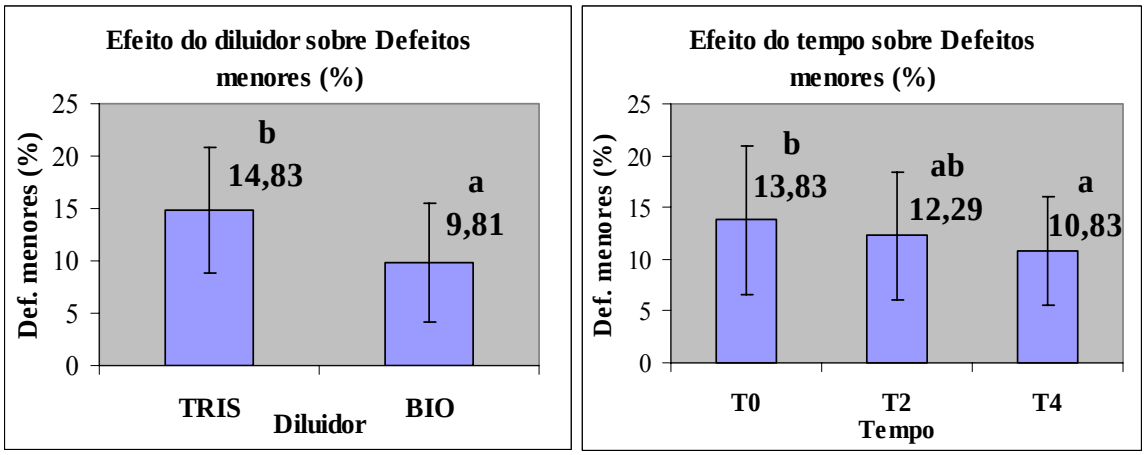


Gráfico 15 – Efeitos isolados de tempo de equilíbrio e de diluidor sobre a percentagem de Defeitos menores (Def. menores, %) (média ± desvio padrão) de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. [a]Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (P<0,05).

Tabela 19 - Médias ± desvios padrão de porcentagem de Defeitos menores (**Def. menores**, %), de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio.

	Tempo de Equilíbrio			Média geral
Diluidor	**T0**	**T2**	**T4**	**Diluidor**
TRIS	16,83 ± 7,30	14,83 ± 5,36	12,83 ± 4,67	14,83 ± 5,94 [B]
BIO	10,83 ± 5,95	9,75 ± 6,09	8,83 ± 5,10	9,81 ± 5,63 [A]
Média geral Tempo	13,83 ± 7,20 [b]	12,29 ± 6,18 [ab]	10,83 ± 5,20 [a]	

[aA] Letras diferentes, minúsculas na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna, indicam diferença pelo teste de Duncan (P<0,05).

A partir desta observação, verificou-se que o defeito que apresentou a maior contribuição para esta diferença foi o defeito de cauda dobrada. Em relação à porcentagem de espermatozóides com cauda dobrada, não houve interação entre tempo de equilíbrio e diluidor, mas houve efeito isolado de diluidor e de tempo de equilíbrio. O diluidor Tris apresentou os maiores valores de cauda dobrada ou enrolada, diferindo-se significativamente do diluidor Bioxcell. Em relação aos tempos de equilíbrio, observou-se que o tempo T4 apresentou os menores valores de cauda dobrada, e o tratamento controle (T0) apresentou os maiores valores. O Tempo de equilíbrio T2 não diferiu significativamente de T0 ou de T4, em relação à porcentagem de espermatozóide com cauda dobrada (Gráfico 16; Tabela 20).

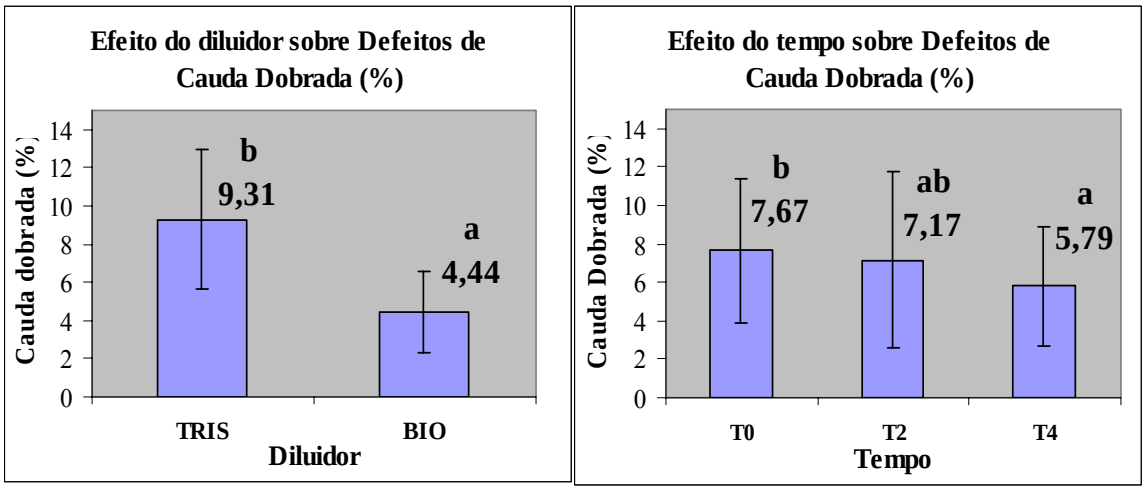


Gráfico 16 – Efeitos isolados de tempo de equilíbrio e de diluidor sobre a percentagem de espermatozóide com cauda dobrada ou enrolada (Cauda Dobrada, %) (média ± desvio padrão) de sêmen bovino criopreservado utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio. [a] Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (P<0,05).

Tabela 20 - Médias ± desvios padrão de porcentagem de caudas dobradas (**CaudaDob**, %), de espermatozóides bovinos criopreservados utilizando dois diluidores e três tempos de equilíbrio.

	Tempo de Equilíbrio			**Média geral**
Diluidor	**T0**	**T2**	**T4**	**Diluidor**
TRIS	10,50 ± 2,75	9,83 ± 4,53	7,58 ± 3,12	9,31 ± 3,67 [B]
BIO	4,83 ± 2,04	4,50 ± 2,75	4,00 ± 1,71	4,44 ± 2,17 [A]
Média geral Tempo	7,67 ± 3,74 [b]	7,17 ± 4,57 [ab]	5,79 ± 3,06 [a]	

[aA] Letras diferentes, minúsculas na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna, indicam diferença pelo teste de Duncan (P<0,05)

7 DISCUSSÃO

Na literatura, não existe uma concordância em relação ao efeito do tempo de equilíbrio sobre a viabilidade espermática. A maioria dos trabalhos que abordam o tema utilizam apenas os resultados de motilidade espermática avaliados subjetivamente após a criopreservação, como estimativa da sobrevivência espermática (Berndtson e Foote, 1969; Salisbury e Vandemark, 1964). Porém a análise visual por microscopia óptica não é precisa, e fornece apenas medidas superficiais da morfologia e motilidade espermáticas, devendo-se lembrar que além da normalidade desses parâmetros, o processo de fertilização envolve complicados eventos bioquímicos e morfológicos (Melo, 1999; Verstegen et al., 2002; Celeghini, 2005; Arruda, 2007).

Os resultados de vários testes de fertilidade a campo, realizados com o objetivo de determinar o tempo de equilíbrio ótimo para o sêmen bovino demonstraram efeito benéfico de um longo período (4-18 h) de manutenção do sêmen a 5ºC antes do congelamento para se obter a fertilidade máxima (Salisbury e Vandemark, 1964; Pickett e Berndtson, 1978; Muiño et al., 2007).

Ainda existem dúvidas do efeito do tempo de equilíbrio sobre os parâmetros de motilidade espermática e os seus efeitos sobre a integridade das membranas plasmática e acrossomal e a função mitocondrial. Vários trabalhos (Berndtson e Foote, 1969; Berndtson e Foote 1972 a,b; Dhami et al., 1992, 1993; Gao, Mazur e Critser, 1997; Foote e Kaproth, 2002; Muiño et al., 2007) ainda questionam a necessidade de se realizar o tempo de equilíbrio e do seu real benefício para a viabilidade espermática. Além disso, ainda se discute qual seria o tempo mínimo de equilíbrio necessário para obter resultados satisfatórios na criopreservação. Assim, avaliar os efeitos ou possíveis alterações causadas pelo tempo de equilíbrio sobre estas características espermáticas seria útil para elucidar as dúvidas que ainda existem em relação ao tempo de equilíbrio, além de permitir o desenvolvimento de melhores protocolos de criopreservação.

7.1 Análise computadorizada da motilidade espermática

A análise computadorizada fornece cálculos mais precisos da velocidade e da trajetória de cada célula espermática, dos quais alguns têm sido correlacionados com a fertilidade (porcentagem de espermatozóides móveis, r^2= 0,34) sendo que combinações de mais variáveis (2 a 5) do CASA apresentaram uma correlação mais alta com a fertilidade, quando são utilizadas equações de regressão múltipla (Farrel et al., 1998).

Neste experimento observou-se que os tratamentos que utilizaram tempo de equilíbrio (2 e 4 h) apresentaram motilidade total e progressiva maiores (P<0,05) que os tratamentos sem tempo de equilíbrio (T0), porém não houve diferença entre 2 e 4h para ambas motilidades. Quando se avaliou cada tempo separadamente, observou-se que o diluidor TRIS apresentou maiores valores (P<0,05) de motilidade total e motilidade progressiva do que o diluidor Bioxcell®, tanto para 2 horas quanto para 4 horas de equilíbrio, porém não houve diferença entre os diluidores quando não se utilizou o tempo de equilíbrio.

Estes resultados em relação à motilidade total e motilidade progressiva concordam com aqueles obtidos por Dhami e Sahni (1993) que avaliaram os efeitos do tempo de equilíbrio sob a motilidade pós-descongelamento (avaliada subjetivamente) e a fertilidade (taxa de não-retorno aos 90d) utilizando os diluidores TRIS-gema e leite integral-gema. Eles observaram que um resfriamento lento por duas horas e pelo menos 2h de tempo de equilíbrio a 5ºC, resultou em melhor motilidade pós-

descongelamento (44,03% vs 35,49%) e melhores taxas de fertilidade (57,86% vs 47,24%) do que sem tempo de equilíbrio. Além disso, sugeriram que esses resultados poderiam ser melhorados se fossem utilizados tempos de equilíbrio maiores. Porém, estes pesquisadores compararam apenas 0 e 2 horas de tempo de equilíbrio, e utilizaram a avaliação subjetiva da motilidade pós-descongelamento enquanto o atual trabalho utilizou a avaliação computadorizada da motilidade como método de avaliação da sobrevivência espermática ao processo de criopreservação.

Os trabalhos de Dhami et al. (1992, 1993), não utilizaram curvas de resfriamento e congelamento precisamente controladas e sim uma curva empírica, uma vez que não utilizaram aparelhos de congelamento automatizado, mas apenas cubas com água refrigerada, um refrigerador para o resfriamento, e o congelamento foi realizado por meio de um método artesanal utilizando vapor de nitrogênio. Isto não invalida o experimento, mas o torna menos preciso e sujeito a variações externas. Prova disso foi a diferença de resultados obtidos com método automatizado por Januskauskas et al. (1999).

Outros trabalhos também apresentam resultados que demonstram o efeito benéfico do tempo de equilíbrio para a motilidade espermática, porém os trabalhos sobre tempo de equilíbrio são muito contraditórios. Miller e Vandemark (1954), utilizando o diluidor citrato-gema, compararam 2, 6 e 18h de equilíbrio e encontraram que 6 horas de equilíbrio do glicerol foi adequado para uma sobrevivência ótima dos espermatozóides bovinos. Saroff e Mixer (1955), utilizando o método de ampolas e o diluidor citrato gema, observaram que quando o tempo de equilíbrio do glicerol é aumentado de 2 para 18 horas, ocorre um aumento progressivo na sobrevivência espermática no pós-descongelamento, após o congelamento a −75ºC, ou seja, utilizando protocolos de congelamento diferentes dos protocolos utilizados neste experimento.

O'Dell e Almquist (1954), utilizando diluidor a base de leite desnatado, não encontraram nenhuma diferença significativa comparando 30 minutos, 4 horas e 18 horas de equilíbrio. Outros trabalhos como o de O'Dell e Hurst (1955), utilizando diluidores a base de citrato-gema e leite desnatado, compararam o efeito de zero hora e 18 horas de tempo de equilíbrio e os resultados, baseados na avaliação visual da porcentagem de espermatozóides móveis, indicaram uma melhor taxa de recuperação para zero hora do que para 18 horas de equilíbrio. Esses trabalhos da década de 50 utilizavam métodos de congelamento diferentes (gelo seco, peletização, ampolas) dos métodos atuais, o que impossibilita confrontar essas pesquisas.

Muitos trabalhos consideram o tempo de equilíbrio como o tempo de exposição aos diluidores que contém glicerol, ou seja, o tempo de exposição ao glicerol, porém neste trabalho o tempo de equilíbrio foi definido como o tempo de exposição a temperatura de 5ºC, sendo que utilizou-se diluidores de fase única (com glicerol), portanto o tempo de exposição ao glicerol, antes da realização do equilíbrio, foi o mesmo para todos os tratamentos, uma vez que todos foram resfriados ao mesmo tempo.

Ennen et al. (1976), trabalhando com palhetas, encontraram que 1, 2, e 4 h de tempo de equilíbrio foram superiores a 16 h. Além disso, observou-se que o período de equilíbrio ótimo para espermatozóides congelados em palhetas variou de 2 a 10 h, e foi dependente do tempo de resfriamento. Segundo esses pesquisadores, espermatozóides resfriados lentamente parecem necessitar de um menor tempo de equilíbrio para uma motilidade ótima. Porém, em outro experimento, no mesmo trabalho, estes pesquisadores não

encontraram diferenças significativas entre 1, 2 e 4 h de equilíbrio em relação à motilidade após incubação a 38ºC por 2 horas, pós-descongelamento, porém estes tempos foram superiores a 16 h de equilibro em relação à motilidade no TTR.

Gilbert e Almquist (1978) estudaram os efeitos do tempo de resfriamento de 25 até 5ºC, tempo de equilíbrio (0, 3 ou 9 h) e método de descongelamento, na criopreservação do sêmen bovino. O sêmen foi diluído em diluidor Tris-gema (a 37ºC) com glicerol, e envasado em palhetas na temperatura ambiente e então congelado. A retenção do acrossoma (avaliada por microscopia DIC) e a motilidade espermática foram superiores ($P<0,01$) para 3,5 h comparado a 30 min de tempo de resfriamento, quando não houve tempo de equilíbrio. Além disso, 3 ou 9 h de equilíbrio foi superior ($P<0,01$) ao tratamento de 0h de equilíbrio. A interação entre o tempo de equilíbrio, tempo de resfriamento e método de descongelamento foi significativa ($P<0,01$). A retenção do acrossoma e a motilidade espermática foram máximas ($P<0,01$) após 9 h de equilíbrio quando as palhetas foram descongeladas a 35ºC/10seg; ou após 3 ou 9h quando descongeladas a 65 ou 95ºC. Esses resultados concordam com os resultados obtidos no atual experimento.

Em um estudo mais recente como congelamento em palhetas (Foote e Kaproth, 2002), utilizando diluidor a base de leite integral com ou sem frutose para sêmen bovino, foram obtidos resultados semelhantes de motilidade pós-descongelamento e taxas de não-retorno aos 56 d quando se utilizou 4 ou 28h de equilíbrio a 5ºC.

Em relação ao método de criopreservação do sêmen deve-se salientar que a maioria das pesquisas sobre o efeito do tempo de equilíbrio não utilizaram métodos automatizados de criopreservação e, devido a isso, as condições de congelamento são menos controladas e, portanto, as curvas de resfriamento e congelamento não apresentam alta precisão. Os trabalhos de Almquist e Wiggins (1973) e Landa e Almquist (1979), estudaram a técnica de congelação automatizada em sêmen bovino. Eles não encontraram nenhum efeito negativo da criopreservação de grande número de palhetas no aparelho automatizado (injeção forçada de nitrogênio) sobre a motilidade pós-descongelamento (subjetiva) e a retenção de acrossomos, comparada com o congelamento em pequenas partidas (estáticas) no vapor de nitrogênio. No entanto, Almquist et al. (1982) observaram que a taxa de não-retorno aos 75d foi inferior (diferença de 1,6%; $P<0,05$) para o sêmen processado no aparelho automatizado (64.7%) em relação ao sêmen criopreservado em pequenas partidas no vapor de nitrogênio (66.3%). Porém, Gonzalez (2004) não encontrou diferenças entre as técnicas convencional e automatizada em relação aos parâmetros de motilidade, vigor e integridade das membranas espermáticas.

A motilidade espermática é uma das características mais importantes associadas com a capacidade fertilizante do sêmen, e há muito tempo é reconhecida como essencial para o transporte espermático no trato reprodutivo feminino e para a fertilização (Januskauskas et al., 1999; Celeghini, 2005), entretanto a avaliação subjetiva da motilidade, que é o parâmetro mais utilizado para determinar a qualidade do sêmen bovino, já foi relatada tanto como fortemente correlacionada como fracamente correlacionada à fertilidade (Tartagliore e Ritta, 2004). Várias investigações utilizaram a determinação da porcentagem de espermatozóides com motilidade progressiva por microscopia óptica na tentativa de estabelecer a duração ótima do tempo de equilíbrio (Graham et al., 1957). Entretanto, não foi encontrada na literatura consultada avaliações e comparações entre as características de movimento espermático,

analisadas por sistema computadorizado (CASA), para diferentes tempos de equilíbrio. Porém existem vários trabalhos que estudaram os efeitos da criopreservação sobre os parâmetros de motilidade espermática avaliados por CASA.

No presente experimento, na avaliação antes da criopreservação observou-se apenas a motilidade e vigor subjetivos, porém no pós-descongelamento a avaliação da motilidade foi realizada por sistema computadorizado e visualmente.

Quanto à motilidade total e motilidade progressiva, o presente trabalho apresentou resultados diferentes dos trabalhos de Gonzalez (2004), Celeghini (2005) e Celeghini et al. (2008), uma vez que nestes trabalhos realizou-se a criopreservação logo após atingir a temperatura de 5ºC, ou seja, sem a realização do tempo de equilíbrio. No presente experimento, observou-se que no tempo T0 não houve diferença (P>0,05) entre os diluidores TRIS, a base de gema de ovo (TrisT0: MotTotal = 14.50 ± 12.73 %; MotProg. = 10,75 ± 9,29%) e Bioxcell® (BioT0: MotTotal = 16,75 ± 15,53 %; MotProg. = 13,83 ± 11,95 %), e este tempo apresentou os menores valores de motilidade. No trabalho de Celeghini et al. (2008) obtiveram-se bons resultados, sem a utilização do tempo de equilíbrio sendo que o diluidor com gema de ovo Botu-bov® (MT = 40,13 ± 1,92%; MotProg = 20,86 ± 1,46%) apresentou melhores resultados do que o diluidor com lecitina de soja Bioxcell® (MT = 24,18 ± 1,44%; MotProg = 10,71 ± 0,98%; média ± erro padrão). No trabalho de Gonzalez (2004), foram observados índices considerados satisfatórios (Motilidade visual de 30,50 ± 1,06%), utilizando o diluidor TRIS com glicerol, com técnica automatizada, sem a realização do tempo de equilíbrio.

Esta diferença de resultados obtidos pode ser devido ao fato de que no experimento de Celeghini et al. (2008) e Gonzalez (2004) provavelmente trabalhou-se com uma população mais homogênea, e provavelmente mais homogênea em relação à congelabilidade do sêmen, além do fato de terem utilizado animais de raça diferente (Simental, *Bos taurus taurus*) da utilizada no presente experimento. Enquanto que no atual experimento utilizou animais de 2 a 4 anos da raça Gir Leiteira (Bos *taurus* indicus) de congelabilidade desconhecida, selecionados apenas pelas características de motilidade, vigor e morfologia espermática. Portanto as grandes variações observadas no presente experimento pode ser devido à presença de animais de boa congelabilidade e animais de baixa congelabilidade, como ocorre na maioria das populações bovinas. Deve-se salientar que as raças taurinas são selecionadas para congelabilidade há muitos anos, desde os primórdios da criopreservação de sêmen.

Em relação aos outros parâmetros de motilidade espermática avaliados pelo CASA no presente experimento, o tempo de equilíbrio não apresentou efeitos significativos sobre a maioria das características do movimento espermático (VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, LIN), mas o tempo de equilíbrio preservou a motilidade total e progressiva do sêmen.

Observou-se que não houve diferença significativa para a velocidade do trajeto (VAP) como para velocidade curvilinear (VCL), e não houve interação significativa entre tempo de equilíbrio e diluidor para estas duas velocidades. Em relação à velocidade progressiva (VSL) observou-se que não houve interação entre os fatores, e não houve efeito significativo de tempo (P>0,05), porém houve efeito significativo do diluidor, sendo que o diluidor Bioxcell® (VSL = 64,74 ± 8,98 μm/s) apresentou valores superiores ao diluidor TRIS (VSL = 55,97 ± 5,59 μm/s), independente do tempo de equilíbrio utilizado. Estes dados diferem em parte dos resultados obtidos por Celeghini et al. (2008), pois neste

experimento apenas a VSL apresentou maiores valores para o diluidor Bioxcell® (a base de lecitina) do que para o diluidor a base de gema TRIS, enquanto que Celeghini et al. (2008), comparando o Bioxcell® com o Botu-Bov®, encontrou que as velocidades espermáticas avaliadas VAP, VSL e VCL, foram mais altas para o Bioxcell®.

Alberti et al. (2004) também verificaram diferenças entre os diluidores MC e glicina-gema (MG), em relação aos mesmos parâmetros, mas não sobre a motilidade total e progressiva. Amirat et al. (2004) observaram valores mais altos para motilidade, VCL e VAP para diluidor contendo LDL do que para outro contendo gema de ovo, embora não encontram diferenças para VSL. Celeghini et al. (2008) sugere que este achado discordante, uma vez que o diluidor de melhor motilidade total e motilidade progressiva (Botu-Bov®) apresentou menores valores de VAP, VSL e VCL, deve-se a possíveis diferenças na densidade entre os diluidores ou devido a presença de partículas maiores, que poderiam interferir na velocidade espermática. O mesmo em relação apenas a VSL foi observado neste experimento, e provavelmente deve-se a diferença de densidade ou viscosidade, o que na avaliação subjetiva também foi observado por um maior vigor do movimento dos espermatozóides diluídos no Bioxcell®, que é menos denso e menos viscoso do que o TRIS. Em relação ao VAP, apesar de se observar médias numericamente inferiores para o diluidor TRIS em relação ao Bioxcell®, esta diferença não foi estatisticamente significativa (P>0,05). Segundo Mortimer (1997), o aumento da viscosidade do meio externo dos espermatozóides resulta em diminuição da amplitude da onda flagelar.

Em relação à amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, *μm*), não houve interação entre tempo de equilíbrio e diluidor, e o efeito do tempo de equilíbrio não foi significativo neste experimento. Entretanto, observou-se que os valores de ALH foram significativamente (P<0,001) maiores para o diluidor TRIS (ALH: 6,11 ± 1,01), em comparação com os valores encontrados para o diluidor Bioxcell® (ALH: 5,61± 1,01). Esses resultados diferem dos obtidos por Celeghini et al. (2008), que obteve maiores valores de ALH para o diluidor Bioxcell® (5,7), em relação ao diluidor com gema de ovo (4,1; Botu-Bov®), porém o ALH foi maior no sêmen fresco do que no sêmen criopreservado (P<0,0001 para ambos diluidores). Aparentemente o deslocamento lateral da cabeça do espermatozóide não é desejado, pois pode interferir na progressão da célula. Segundo Arruda (2000), maior valor numérico de ALH se traduz em pior qualidade espermática, como demonstrado por Arruda et al. (2003). Porém, este valor foi determinado matematicamente e ainda não foram estabelecidos limites máximos e mínimos para dizer o quanto de deslocamento da cabeça poderia interferir na motilidade progressiva ou mesmo no processo de fertilização do oócito (Celeghini, 2005; Celeghini et al., 2008).

No atual experimento a freqüência de batimentos flagelares (BCF) foi significativamente maior para os espermatozóides criopreservados com o Bioxcell® do que para o diluidor TRIS, isto pode sugerir que o Bioxcell® preserva melhor as estruturas flagelares ou que os componentes presentes neste diluidor influenciam na produção de ATP. No experimento de Celeghini et al. (2008), observou-se uma BCF mais alta para o sêmen criopreservado com Botu-Bov® do que para o sêmen fresco e um menor valor para o sêmen diluído com Bioxcell®. Sugeriu-se que os componentes presentes no diluidor Botu-Bov® poderiam estar agindo estimulando a freqüência de batimentos. Entretanto a composição exata desses diluidores não é revelada devido a sigilo industrial.

Quanto à retilinearidade (STR) do movimento espermático, observou-se que em todos os tempos o diluidor Bioxcell® apresentou valores significativamente maiores de STR do que o diluidor TRIS. Além disso, apenas para o diluidor TRIS o tempo T0 apresentou maiores valores de STR do que T2, mas os valores de T4 não diferiram de T0 e T2. Para o Bioxcell® não houve diferença significativa entre os tempos de equilíbrio. Quanto a Linearidade (LIN), observou-se efeito ($P<0,05$) apenas para diluidor, sendo que o diluidor Bioxcell® apresentou os maiores valore de LIN, porém o efeito do tempo de equilíbrio não foi significativo ($P>0.05$).

A STR é obtida pela razão entre VSL/ VAP, ou seja, é uma comparação da linha reta com a média do caminho do espermatozóide. Já a LIN é obtida pela razão entre VSL/ VCL, ou seja, é uma comparação da linha reta com o caminho curvilíneo do espermatozóide (Cancel et al., 2000; Raphael, 2007). Como a VSL foi maior para o diluidor Bioxcell®, e não houve diferença significativa para os valores de VAP e de VCL entre os diluidores, portanto ao se dividir a VSL por elas geram valores maiores de STR e LIN para o Bioxcell®. Um alto valor de STR indica que a trajetória dos espermatozóides é mais uniforme e com baixa amplitude, enquanto que uma alta LIN indica uma baixa amplitude do caminho curvilíneo e direção parecida com o caminho em linha reta. A diferença entre médias para STR foi de 6,20 % e para LIN 4,97%, assim indicando que o movimento dos espermatozóides criopreservados no TRIS era mais circular do que no Bioxcell, porém não se sabe se estas diferenças poderiam afetar a fertilidade do sêmen diluído com TRIS.

Celeghini et al. (2008) observaram maior ($P<0,05$) STR para o espermatozóides criopreservado com o Botu-Bov® do que para o sêmen fresco ou criopreservado com o Bioxcell®, porém não se sabe essas diferenças poderiam afetar a fertilidade do sêmen. Em comparação com o sêmen fresco, não houve mudança para o sêmen criopreservado com o Botu-Bov®, porém se observaram menores valores de LIN com o Bioxcell®. Amirat et al (2004) não encontraram diferenças entre diluidores em relação a LIN, diferindo de Arruda (2003) que encontrou diferença na LIN entre diluidores diferentes. Entretanto, o valor desta variável deve ser melhor estudada, já que Januskauskas et al. (2003) não encontraram correlação entre LIN e taxa de fertilidade em bovinos.

Moussa et al. (2002) compararam três diluidores: Triladyl® (com 20% de gema), Triladyl® (com LDL) e Biociphos®, utilizando 2h de tempo de equilíbrio. Observaram que a motilidade e as características de movimento espermático no sêmen pós-descongelamento foram maiores no diluidor contendo LDL do que no Triladyl original com gema. Também observaram melhores resultados no Biociphos®, comparado com o Triladyl® original (gema). Observaram que com a concentração de 5 a 10% de LDL no Triladyl® modificado, a motilidade total foi superior ao Biociphos® (54.8% versus 51.0%). Já quanto à análise das características do movimento revelaram que VSL e LIN foram significativamente maiores nos diluidores com 5 e 10 % de LDL do que no controle Triladyl® com gema. Para VCL, ALH e VAP, os resultados foram melhores com 10 e 15% de LDL, quando comparado com o Triladyl® original. Quando comparado com o Biociphos®, as características de movimento espermático foram semelhantes apenas quando as concentrações de LDL estavam entre 5 e 10%. Os resultados de Moussa et al. (2002) sugerem que diluidores a base de LDL fornecem melhor proteção do que a gema de ovo durante o processo de criopreservação e que as concentrações mais eficientes estão entre 5 e 10% de LDL.

7.2 Análises da Integridade das Membranas Plasmática, Acrossomal e do Potencial de membrana Mitocondrial

No presente trabalho observou-se que o tempo de equilíbrio foi benéfico para a manutenção da integridade da membrana plasmática e acrossomal. Em relação à porcentagem de espermatozóides com Acrossoma e Membrana Plasmática Intacta (AIMPI), observou-se a existência de uma interação ($P<0,05$) entre tempo de equilíbrio e o diluidor. Sendo que os tratamentos sem tempo de equilíbrio apresentaram as menores porcentagens de células AIMPI, para ambos diluidores e não houve diferença ($P<0,05$) entre estes neste tempo (T0). No diluidor TRIS observou-se claramente um aumento da proporção de células AIMPI com o aumento do tempo de equilíbrio, sendo que para este diluidor o tempo de 4 horas foi melhor do que os demais tempos. Isto é um indicativo de maior fertilidade, uma vez que o espermatozóide necessita de membrana plasmática intacta para a manutenção da homeostase celular e para a realização de todas as atividades celulares necessárias para a sobrevivência espermática. Além disso, o espermatozóide necessita de um acrossoma intacto e funcional para que seja capaz de realizar a reação acrossômica, penetração da zona pelúcida e fecundação do oócito.

Em relação ao diluidor Bioxcell®, observou-se que não houve diferença significativa entre os tempos T2 e T4, mas estes foram diferentes do tratamento sem tempo de equilíbrio. Os diluidor TRIS com gema de ovo, preservou melhor a integridade das membranas plasmáticas e acrossomal nos tempos de 2 e 4 horas de equilíbrio.

Quanto à porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática lesada (MPL) observou-se que houve efeito isolado dos fatores, e um tempo de equilíbrio mais longo resultou em uma menor porcentagem de espermatozóides MPL indicando que independente do diluidor o tempo de equilíbrio foi benéfico para a integridade da membrana plasmática. O tratamento sem tempo de equilíbrio foi prejudicial causado um aumento significativo das lesões de membrana plasmática. O diluidor TRIS apresentou menores valores de MPL do que o Bioxcell® (72,22 ± 13,26 % vs. 85,83 ± 7,92), indicando uma maior proteção à membrana plasmática pelo diluidor com gema de ovo.

Na porcentagem de espermatozóides com Acrossoma lesado (AL) observou-se interação entre os fatores sendo que o tratamento sem tempo de equilíbrio apresentou os piores resultados para o diluidor TRIS, sendo significativamente diferente de T2 e T4. Porém, o mesmo comportamento não foi observado para o Bioxcell®, e não observou-se diferença significativa entre os tempos, isto se deve a grande variação de respostas para este diluidor que pode ser verificado pelo grande desvio-padrão observado. Devido a esta grande variabilidade nas respostas apenas no tempo T2 observou-se diferença significativa entre os diluidores, sendo que o diluidor TRIS foi melhor neste tempo (44,68 ± 12,97% vs. 65,02 ± 20,67). Isto indica uma maior eficácia do diluidor TRIS na proteção da membrana acrossomal, pois suas respostas foram mais homogêneas e observou-se diferença em pelo menos um dos tempos empregados.

No presente experimento a porcentagem de membrana plasmática lesadas pela criopreservação foi maior do que a porcentagem de perda da motilidade. Este achado está de acordo com os achados de Salamon e Maxwell (1995b), que demonstrou que os espermatozóides criopreservados podem estar móveis, mas apresentarem danos às membranas, o que torna pouco provável que tais células possam penetrar a zona pelúcida e fertilizar o oócito.

Estudando a criopreservação do sêmen de carneiros Valcárcel et al. (1994), utilizando as sondas CFDA e PI, encontraram que os espermatozóides apresentaram uma queda de 70% na integridade da membrana plasmática, sendo que apenas 15% das membranas permaneceram intactas. Arruda et al. (2005) estudaram o efeito da criopreservação de espermatozóides bovinos com o diluidor Tris-gema contendo glicerol e demonstrou que apenas 15% dos espermatozóides possuíam membrana plasmática intacta. Celeghini et al. (2008) obtiveram resultados semelhantes para o diluidor Bioxcell® (18,1%). No presente experimento foram obtidos resultados semelhantes para o Bioxcell, porém melhores resultados foram obtidos com o diluidor TRIS, que são comparáveis com os resultados obtidos por Celeghini et al. (2008) com o diluidor BotuBov® (28,8%).

Os resultados da presente pesquisa também validam as observações de várias pesquisas que sugerem que um maior tempo de equilíbrio é benéfico para a sobrevivência espermática, uma vez que se observa um aumento da integridade das membranas e este resultado é favorecido pela utilização de diluidores à base de gema de ovo. Estes resultados vão de encontro com o que é utilizado na maioria dos protocolos de criopreservação de sêmen. Segundo Muiño et al. (2007) os protocolos de criopreservação de sêmen bovino incluem o resfriamento lento do sêmen diluído até 4 a 5ºC seguido por um longo tempo de equilíbrio a baixa temperatura antes do congelamento. Segundo estes pesquisadores, a maioria dos protocolos de criopreservação estabelece um tempo de equilíbrio de 3 a 4 horas, assim, o sêmen tem que ser congelado no mesmo dia. O presente trabalho também concorda com os resultados de Saroff e Mixner (1955) que encontraram que aumentando o tempo de equilíbrio há um aumento progressivo da sobrevivência espermática pós-descongelamento. Entretanto este trabalho foi baseado em técnicas de congelamento diferentes das atuais, quando ainda se utilizava a criopreservação em gelo seco (-75ºC), o que dificulta uma comparação com os resultados do presente experimento mas provavelmente o mecanismo de proteção do tempo de equilíbrio deve ser semelhante, independente da técnica utilizada.

Os efeitos dos diluidores do presente estudo confirmam as observações de De Leeuw et al. (1993), que relataram efeitos dos componentes do diluidor influenciam sobre a integridade da membrana plasmática de espermatozóides bovinos resfriados até 5ºC e congelados.

Estudos anteriores sobre a criopreservação do sêmen comparando diluidores a base de lecitina de soja e a base de gema de ovo, relatam resultados conflitantes. Gil et al. (2000), utilizando 4h de equilíbrio, encontraram que a proporção de espermatozóides com membranas intactas avaliado pelo método CalceinAM foi significativamente maior no Biociphos Plus® comparado ao Triladyl® (gema) mas tal diferença não foi vista quando se utilizou SYBR-14 na avaliação, porém não houve diferença de fertilidade entre os diluidores. Outras pesquisas relataram uma redução na taxa de não-retorno ao 56d (Van Wagtendonk-de Leeuw et al., 2000), menor motilidade pós-descongelamento, viabilidade, morfologia e resistência osmótica (Thun et al., 2002) ou menor sobrevivência espermática durante a incubação (Christensen et al., 2005) quando o sêmen bovino foi criopreservado utilizando Biociphos Plus® comparado com diluidores a base de Tris-gema.

Aires et al. (2003) não encontraram diferenças significativas na qualidade espermática *in vitro* criopreservado com Andromed® ou um diluidor Tris-gema, mas a motilidade espermática pós-descongelamento e a fertilidade *in vivo* do

sêmen diluído com Andromed® foi maior (P<0,05) do que com Tris-gema.

Amirat et al. (2004) não encontraram diferenças, entre um diluidor contendo LDL e um diluidor contendo gema de ovo em relação aos seus efeitos sobre a integridade da membrana plasmática. Os achados de Amirat et al. (2004) sugerem que os efeitos da lipoproteína sobre a membrana são semelhantes, independente da sua fonte (tanto adicionada isoladamente quanto como contida dentro da gema de ovo). Essa pesquisa utilizou o teste hiposmótico para detectar a integridade da membrana plasmática e como nesse experimento observou-se melhor motilidade e maior taxa de clivagem para o sêmen criopreservado com LDL, questiona-se se em teste laboratorial mais preciso não seria possível identificar diferenças de integridade de membrana.

No atual trabalho, a diferença de composição dos diluidores em relação a concentração de glicerol (TRIS – 7%; Bioxcell® – 3,19% v/v), também pode ser um dos motivos da melhor ação crioprotetora do diluidor TRIS em relação ao Bioxcell®, uma vez que 7% é considerada como a concentração ótima para o diluidor Tris-gema. Porém, a concentração ótima de glicerol para o congelamento de sêmen bovino também é influenciada pelos outros componentes no diluidor (Vishwanath e Shannon, 2000).

Herold et al. (2006) pesquisaram o congelamento de espermatozóides de epidídimos de bufalos africanos e observaram que o diluidor Triladyl® (a base de Tris-gema) apresentou maior motilidade pós-descongelamento e integridade acrossomal do que o Andromed®, e para ambos diluidores a qualidade espermática não foi afetada por diferentes tempos de equilíbrio que variaram entre 2 a 9 h. Entretanto em um estudo anterior Herold et al. (2004) encontraram que não havia diferença entre 4 a 9h de equilíbrio, porém afirmou-se que tempos de equilíbrio inferiores a 4 h eram prejudiciais aos parâmetros pós-descongelamento. Entretanto, como esses estudos foram realizados com espermatozóides do epidídimo a comparação com o atual estudo deve ser feito com certa cautela.

Em relação ao tempo de equilíbrio, Dhami e Sahni (1993) observaram que um tempo de equilíbrio de 2h a 5ºC causou uma redução na motilidade pré-congelamento, porém aumentou significativamente (P<0,01) a motilidade pós-descongelamento, a perda da enzima GOT e a fertilidade do sêmen bovino criopreservado. Em relação a integridade de membrana essa pesquisa diferencia-se da atual pois realizou avaliações indiretas da integridade da membrana plasmática, que é um método de menor precisão do que a avaliação direta da integridade por sondas fluorescentes.

Quanto à avaliação da função mitocondrial, a avaliação do alto potencial de membrana mitocondrial mostrou resultados que não seguiram o padrão observado para as outras características avaliadas. Não houve efeito significativo do tempo de equilíbrio e nem do diluidor sobre o alto potencial mitocondrial. Portanto não observou-se diferenças significativas entre os tratamentos. Uma explicação para isto pode ser a grande variação individual da funcionalidade das mitocôndrias antes da criopreservação para esta população de reprodutores, o que resultou em grande variação também pós-criopreservação.

A importância da mitocôndria para a motilidade espermática, foi reconsiderada recentemente. Vários trabalhos sugerem que os espermatozóides produzem a maior parte do ATP necessário para o batimento do flagelo por glicólise (produção anaeróbia de ATP), e que esta produção ocorre mesmo em condições aeróbicas. Além disso, provou-se a existência de enzimas

envolvidas na glicólise que estão ligadas à bainha fibrosa, e também a importância da glicólise para a hiperativação. Espermatozóides submetidos a drogas que interferem na fosforilação oxidativa na mitocôndria continuaram vivos e móveis (Turner, 2006; Silva e Gadella, 2006).

Entretanto, as mitocôndrias provavelmente fornecem energia para a peça intermediária e para a cabeça do espermatozóide, necessária para a manutenção de importantes processos na membrana. Dentre esses, uma das atividades mais importantes é a manutenção do gradiente de Na^+/K^+ ao longo da membrana. A bomba de Na^+/K^+ também está envolvida indiretamente no transporte de outras substâncias e assim regula os gradientes químico e elétrico da membrana plasmática, que influenciam na sobrevivência espermática. Dessa forma, a integridade funcional da mitocôndria pode ser importante para a sobrevivência espermática no trato genital feminino e nas técnicas de reprodução assistida (Silva e Gadella, 2006; Raphael, 2007). Tendo em vista o exposto, não se sabe com certeza qual é o significado biológico da porcentagem de espermatozóides que apresentam alto potencial mitocondrial, e sobre a sua real importância para o processo de fertilização do oócito e para a fertilidade do sêmen criopreservado.

Neste experimento foram avaliados apenas características morfológicas e motilidade antes da criopreservação, portanto não se sabe sobre a funcionalidade mitocondrial antes da criopreservação. Devido ao exposto sugere-se que devem ser realizadas novas pesquisas para confirmação dos dados observados. Sugere-se que uma avaliação mais completa da funcionalidade mitocondrial antes da criopreservação e após a criopreservação pode fornecer informações que esclareçam os resultados observados. Outros fatores que não puderam ser identificados ou controlados no atual experimento também podem ter influenciado esta resposta.

Os resultados encontrados por Celeghini et al. (2008) em relação a esta característica demonstraram diferenças entre os diluidores Botu-Bov® e Bioxcell®, sendo que o diluidor Botu-Bov® (média = 23,96 %), com gema de ovo, apresentou melhor capacidade de preservação da função mitocondrial do que o Bioxcell (16,96%). Estas médias observadas foram próximas das médias observadas no presente experimento onde o TRIS apresentou média de 20,98 ± 9,73% e o Bioxcell apresentou média de 17,72 ± 14,10% de células com alto potencial. Entretanto, deve-se lembrar que a técnica de avaliação foi diferente do atual experimento, uma vez que nesse experimento utilizou-se a microscopia de epifluorescência. Celeghini et al. (2008), também observaram correlações positivas entre a função mitocondrial e as motilidades total ($r=0,87$; $P<0.0001$) e progressiva ($r=0,87$).

Os resultados encontrados no presente experimento para a integridade das membranas plasmática e acrossomal concordam com os resultados de várias pesquisas que realizaram vários testes de fertilidade, na tentativa de determinar o período de equilíbrio ótimo para o sêmen bovino e observaram o efeito benéfico do tempo de equilíbrio a 5ºC antes do congelamento, para se obter a fertilidade máxima (Salisbury e Vandemark, 1964; Pickett e Berndtson, 1978; Muiño et al., 2007).

Apesar de no presente experimento não terem sido realizados testes de fertilidade a campo, existem trabalhos que correlacionaram as avaliações de integridade com a fertilidade a campo. Exemplo destes são os trabalhos de Januskauskas et al. (2003) que encontraram correlações significativas ($P<0,05$) entre fertilidade a campo (taxa de não retorno aos 56 d) com sêmen bovino criopreservado e

espermatozóides com membrana plasmática lesada, positivas ao PI, sobre partidas de sêmen (r = -0,40) e sobre touros (r = -0,56). Já trabalhando com sêmen bovino fresco, Anzar et al. (2002) também observaram correlações negativas entre fertilidade a campo e espermatozóide lesados corados por PI (r = >-0.87) em sêmen bovino fresco.

No presente trabalho utilizou-se apenas 4 h de tempo de equilíbrio, mas vários estudos indicam que prolongando o tempo de equilíbrio até 18 h antes do congelamento resultaram em aumento da fertilidade (veja Pickett e Berndtson, 1978). Exemplo disso foi a pesquisa de Graham et al. (1957) que realizou um estudo comparativo de fertilidade a campo entre 4, 8, e 12h de equilíbrio. Nesse experimento, utilizando cerca de 1000 inseminações por tratamento, observou-se diferença significativa apenas entre 12 e 4 horas de equilíbrio (67,8% vs. 63,4%, respectivamente), em relação a taxa de não retorno aos 75 dias.

Muiño et al. (2007) utilizando 18 h de tempo de equilíbrio e avaliando o sêmen pós-descongelamento por meio do TTR lento até 9 h, comparou o diluidor Biladyl® (a base de Tris-gema) com os diluidores Andromed® e Biociphos Plus® (ambos a base de lecitina de soja). Utilizando a avaliação por citometria de fluxo pela associação dos corantes SYBR-14, PI e PE-PNA observou que o sêmen diluído com Biladyl apresentou os melhores resultados apresentado maior sobrevivência espermática e maior longevidade. Obtiveram valores de viabilidade logo após o descongelamento 47,9%, 38,5% e 34,9% e após 9 h de incubação a 37ºC, valores de 30,3 %, 17,3% e 21,6% (porcentagem de espermatozóides com membranas plasmática e acrossomal intactas) para Biladyl®, Andromed® e Biociphos Plus® respectivamente. Muiño et al. (2007) sugeriram que o efeito benéfico do uso do diluidor Biladyl® foi provavelmente devido a melhor ação crioprotetora das lipoproteínas da gema de ovo em relação a lecitina de soja, embora um efeito da diferente exposição ao glicerol não possa ser descartado.

Em outras espécies também se observa um efeito benéfico do tempo de equilíbrio. Fiser et al. (1996) que observaram na espécie suína um efeito benéfico da exposição a temperatura de 5ºC. Observou um aumento gradual da motilidade com o aumento do tempo de equilíbrio. Nesse experimento com o sêmen suíno sem glicerol também se beneficiou da exposição prolongada a 5ºC de maneira semelhante ao sêmen glicerolado, apesar do sêmen sem glicerol apresentar menor motilidade do que o sêmen glicerolado nos mesmos tempos testados. Sugere-se então que a exposição a 5ºC pode ser importante para que ocorram mudanças na membrana espermática que tornem os espermatozóides menos susceptíveis aos danos da criopreservação.

Os trabalhos de Bernedtson e Foote (1969; 1972) indicam que o glicerol penetra rapidamente no espermatozóide bovino e, portanto, os resultados sugerem que o tempo de equilíbrio é uma período de adaptação das membranas e do metabolismo celular com o frio, ao invés de um período de penetração e equilibração do glicerol. E que provavelmente neste período ocorrem mudanças importantes na membrana que permitem ela se adaptar a baixas temperaturas e aumentam a sua resistência a criopreservação (Coulter, 1992; Muiño et al. 2007). Os resultados encontrados no presente experimento apóiam esta teoria.

Os resultados observados em relação a motilidade e a preservação da integridade das membranas indicam que ocorrem interações entre o diluidor e o tempo de equilíbrio que resultam numa maior sobrevivência espermática. Esses resultados concordam com os resultados de Muiño et al. (2007). Sugere-se que o efeito benéfico do diluidor TRIS para as membranas é devido a melhor ação crioprotetora do LDL

da gema de ovo em relação à lecitina de soja do diluidor Bioxcell®. Um novo mecanismo de proteção do espermatozóide pelo LDL da gema de ovo foi proposto recentemente por Manjunath et al. (2002) e por Bergeron et al. (2004). Estes estudos demonstraram que o LDL da gema de ovo nos diluidores protege os espermatozóides de duas formas. Primeiro, a associação do LDL com as BSP's protege o espermatozóide por evitar que essas proteínas do plasma seminal se liguem ao espermatozóide a causem danos à membrana pela remoção de lipídios (colesterol e fosfatidilcolina). Segundo, os lipídios da fração de lipoproteína de baixa densidade ou a molécula inteira de LDL se associariam à membrana, preservando a integridade da membrana plasmática durante a preservação do sêmen. No experimento de Bergeron et al. (2004) quando os espermatozóides foram diluídos com gema de ovo observou-se uma redução da associação das proteínas BSP's à superfície dos espermatozóides, além disso, observaram um ganho de colesterol e fosfolipídios pela membrana espermática, indicando uma forte associação do LDL à membrana. É possível que estes mecanismos de ação do LDL sejam responsáveis pelo melhor efeito crioprotetor do diluidor TRIS observados no presente estudo. Durante o tempo de equilíbrio antes do congelamento, o LDL da gema de ovo pode ter evitado ou reduzido os efeitos prejudiciais das proteínas BSP's sobre as membranas, enquanto que a lecitina de soja não teve a mesma capacidade de evitar tais efeitos.

A partir dos resultados observados no presente trabalho, sugere-se que a utilização de no mínimo 4 h de tempo de equilíbrio garante uma melhor sobrevivência espermática. Observou-se neste experimento que existe uma grande variação nas respostas aos protocolos de criopreservação e uma vez que neste experimento não se sabia a congelabilidade do sêmen antes da criopreservação, sugere-se que, quando realiza-se a criopreservação de animais de fertilidade e congelabilidade desconhecida, a utilização de uma tempo de equilíbrio de no mínimo 4 horas para se obter maior sobrevivência espermática pós-criopreservação.

Entretanto, no presente trabalho não se pode descartar um efeito benéfico do glicerol, que pode atuar juntamente com o tempo de equilíbrio, e influenciar na resposta (como foi observado em outras espécies como a espécie suína por Fiser, 1996) uma vez que neste experimento não houve a comparação entre diluidores com e sem glicerol.

Gonzalez (2004) comparou o efeito de diferentes agentes crioprotetores penetrantes (Dimetilformamida e Etilenoglicol), substituindo o glicerol na composição do meio diluidor TRIS-gema, sobre a integridade das membranas espermáticas, avaliada por microscopia de epifluorescência. Observou-se que o glicerol preservou melhor as membranas plasmáticas, Acrossomal e mitocondrial, sendo que este apresentou a maior proporção de células com membrana plasmática e acrossomal intactas e com potencial mitocondrial (14,82% e 15,83%) do que o etilenoglicol (9,20 e 9,92%) e a dimetilformamida (4,65 e 5,17%), mostrando a importância do agente crioprotetor penetrante. Esses resultados demonstram o efeito benéfico do glicerol. Esses valores obtidos por Gonzalez (2004) poderiam ser maiores se o experimento tivesse utilizado o tempo de equilíbrio.

7.3 Teste de Termorresistência Rápido (TTR-rápido)

Os resultados observados no Teste de Termorresistência Rápido demonstraram um padrão semelhante às outras características estudadas. A diferença de motilidade observada na avaliação computadorizada foi semelhante àquela observada na avaliação subjetiva. Logo após a criopreservação observou-se que os tratamentos com pior

motilidade foram aqueles onde não se utilizou o tempo de equilíbrio, para ambos diluidores. Nos tratamentos com tempo de equilíbrio a motilidade subjetiva inicial foi significativamente maior para o diluidor TRIS, em relação ao Bioxcell®. Após 30 minutos de TTR-rápido, observou-se que no tratamento sem tempo de equilíbrio ocorreu uma rápida redução da motilidade do sêmen criopreservado com diluidor TRIS, e observou-se que a motilidade no tratamento com Bioxcell®, neste período de incubação foi significativamente maior. Isto pode indicar que os diluidores a base de gema de ovo necessitam do tempo de equilíbrio para manifestar a proteção máxima às estruturas celulares, enquanto que os diluidores a base de lecitina começam a proteger a célula mais rapidamente, apesar de sua proteção não ser tão eficiente quanto a do LDL da gema de ovo. No mesmo tempo de TTR (30 min) observou-se uma diferença significativa entre os diluidores no tempo de 2 h de equilíbrio, refletindo a maior proteção dos diluidores a base de gema de ovo. Porém, no tratamento de 4h de equilíbrio não se observou diferença significativa (apenas uma diferença numérica das médias) para motilidade entre os diluidores. No final do TTR (60 min) observou-se uma maior motilidade para o diluidor Bioxcell® no tratamento sem o tempo de equilíbrio, porém os resultados foram muito inferiores aos outros tratamento que utilizaram o tempo de equilíbrio. Não houve diferença significativa entre os diluidores nos tempos de 2 e 4 h de equilíbrio, mas apenas uma diferença numérica entre as médias. Ao longo de todo o teste de TTR observou-se a manutenção da diferença entre os tratamentos que utilizaram o tempo de equilíbrio e o tratamento controle. Isto indica uma maior longevidade espermática do sêmen quando se utiliza o tempo de equilíbrio.

A capacidade de resistência espermática ao calor tem sido utilizada como uma das características para predizer a fertilidade do sêmen congelado durante vários anos. Ludwick et al. (1948) observaram correlações altamente significativas entre fertilidade e longevidade de espermatozóides de bovinos a 38ºC. Dimitropoulos (1967) denominou de TTR (Teste de termorresistência) a prova que consiste na incubação de uma amostra de sêmen a 38ºC durante 5 horas, após o que se verifica a porcentagem de motilidade progressiva. Este teste apresenta correlação positiva e altamente significativa (0,78) com a fertilidade real, avaliada pela taxa de não-retorno aos 60-90 dias. Dimitropoulos (1973) observou não existir dúvida na decisão a tomar com ejaculações cujos espermatozóides apresentavam 15% ou mais de movimento progressivo depois do TTR. Em contrapartida, o problema apresentava-se com os lotes situavam-se ao redor de 5%. O autor constatou que certos touros ainda mostravam fertilidade compatível apesar do TTR acusar esse baixo valor, enquanto que outros com o mesmo resultado a fertilidade era considerada insatisfatória. Nestas condições, estudou uma prova complementar, denominada de TTR-rápido, colocando a amostra em banho-maria a 46ºC, durante meia hora, o que proporcionou maior rapidez na avaliação do sêmen congelado. Verificou assim que grande número de ejaculados mantinham motilidade semelhante ou ligeiramente inferior à que apresentavam quando recém descongeladas, enquanto que em outras a perda da motilidade era manifesta (citado por Arruda, 1988).

Jondet et al. (1978) verificaram que quanto maior a classificação inicial da amostra logo após o descongelamento, tanto menor é a diferença na queda percentual dos espermatozóides exibindo movimentos progressivos (citado por Arruda, 1988). Comparando os testes de TTR-lento e TTR-rápido, Arruda (1988) concluiu que a prova rápida de termorresistência pode substituir a prova lenta, na avaliação de sêmen congelado, pois observou-se que não houve diferença significativa nas taxas de prenhez

de fêmeas inseminadas com sêmen submetido a ambas as provas de termorresistência e não houve diferença significativa nas taxas de prenhez de fêmeas inseminadas com sêmen submeto ao teste de termorresistência rápido, cujos resultados de motilidade progressiva variaram de 20 a 40%.

O Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) estipula que deve ser considerado de boa qualidade a amostra de sêmen que apresenta pelo menos 15% dos espermatozóides com motilidade progressiva no final do TTR-rápido, sendo que este deve ser realizado submetendo a amostra a 46ºC por 30 minutos.

Pelo exposto, observamos que neste experimento que apenas os tratamentos que utilizaram o tempo de equilíbrio (T2 e T4) apresentaram motilidade superior a 15% na avaliação do TTR-rápido com 30 min. e assim atende os requisitos sugeridos por Arruda (1988) e pelo CBRA (1998). Portanto, observa-se que o tempo de equilíbrio foi essencial para se obter uma maior longevidade do sêmen criopreservado e atender os padrões mínimos exigidos pelo teste de termorresistência. Porém é importante salientar que neste experimento alguns touros apresentaram bons resultados mesmo no tratamento sem tempo de equilíbrio, o que sugere uma grande diferença de congelabilidade, e possivelmente em um grupo de animais de alta fertilidade e congelabilidade os resultados pós-descongelamento do sêmen criopreservado sem tempo de equilíbrio podem ser satisfatórios. No entanto, provavelmente a as características espermáticas deste sêmen de alta congelabilidade poderiam ser melhoradas e atingir uma maior fertilidade e longevidade se utilizarmos um tempo de equilíbrio mínimo de 4 horas, que demonstrou apresentar maior integridade das membranas e melhores parâmetros de motilidade.

O trabalho de Muiño et al. (2007), que avaliou a longevidade espermática pela integridade das membranas plasmática e acrossomal por citometria de fluxo, sugere que provavelmente tempos de equilíbrios maiores do que 4 horas sejam benéficos para a integridade de membranas pós-descongelamento e para a longevidade espermática. Além disso conclui que os diluidores a base de gema de ovo apresentam melhor resultado do que diluidores a base de lecitina de soja quando se realiza o congelamento no dia seguinte ao dia da coleta (tempo de equilíbrio 18 h), provavelmente devido a melhor ação crioprotetora das lipoproteínas da gema de ovo em relação a lecitina de soja.

Valcárcel et al. (1994) encontrou uma correlação positiva ($r=0.64$; $P<0.001$) entre a integridade da membrana plasmática avaliada por sondas fluorescente (CFDA e PI) logo após o descongelamento e a motilidade após 8 h de incubação a 37ºC, em espermatozóides de carneiros. Esse achado apóia os resultados de longevidade espermática obtidos no presente experimento.

7.4 Análise da Morfologia Espermática

O aumento do percentual de alguns defeitos espermáticos após a criopreservação observados (defeitos de acrossoma, cauda dobrada, defeitos maiores, defeitos totais) aqui também é relatado por outros trabalhos como os trabalhos de Vertegen et al. (2002) e de Celeghini et al. (2008). O aumento mais relatado é o de defeitos de acrossoma (Verstegen et al, 2002; Celeghini, 2008). O que é esperado tendo em vista que após o congelamento do sêmen, a motilidade é mais bem preservada do que a integridade acrossomal dos espermatozóides. Os danos ao acrossoma podem ocorrer durante o processo de resfriamento, congelamento ou mesmo durante o descongelamento (Amman

e Pickett, 1987; Watson, 1995; Celeghini, 2005).

Quanto aos defeitos totais observou-se neste experimento efeito significativo do diluidor e do tempo de equilíbrio. O efeito do diluidor demonstrou que apesar da melhor preservação da integridade de membranas o diluidor TRIS apresentou um pequena diferença em relação aos defeitos totais, apresentando maior proporção de defeitos em relação ao diluidor Bioxcell®. Enquanto aos tempos de equilíbrio, o tratamento sem tempo de equilíbrio apresentou valores significativamente maiores de defeitos totais em relação aos tratamentos T2 e T4, enquanto tratamento T4 apresentou os valores mais baixos.

Não observou-se diferença significativa para defeitos maiores, entretanto observou-se diferença significativa entre os diluidores em relação aos defeitos de acrossoma, sendo que o diluidor Bioxcell® apresentou uma maior proporção de defeitos de acrossoma, o que reflete a menor preservação da integridade acrossomal. Estes resultados diferiram de Celeghini (2005) que obteve maiores valores de defeitos de acrossoma para o diluidor a base de gema de ovo do que para o diluidor a base de lecitina de soja.

Em relação aos defeitos menores, também houve efeitos independentes de diluidor e tempo de equilíbrio. O diluidor Tris apresentou os maiores valores de defeitos menores em relação ao Bioxcell®, apesar de apresentar melhor preservação da membrana plasmática. Esta diferença foi devido a uma maior proporção de caudas dobradas observadas no diluidor TRIS. Já em relação ao tempo observou-se o mesmo padrão onde o tratamento sem tempo de equilíbrio apresentou os piores resultados (maiores valores) e o tempo T4 os melhores resultados (menor quantidade de defeitos menores), o tempo T2 não diferiu de T4 e nem de T0 em relação a defeitos menores e defeitos de cauda dobrada.

Uma explicação para esta observação pode ser devido às diferenças de atuação dos diluidores. O diluidor TRIS apesar de preservar a membrana pode não atuar da mesma forma sobre as estruturas do axonema, o que causou uma maior proporção de defeitos de cauda, e o diluidor Bioxcell®, pode atuar preservando melhor estas estruturas. Porém os métodos empregados não permitiram identificar estas possíveis diferenças de atuação. Outra hipótese é que células que apresentavam lesadas nas estruturas do axonema antes da criopreservação no diluidor TRIS manifestaram dobramento da cauda, uma vez que este manteve a integridade da membrana. Isto não aconteceu no Bioxcell porque este diluidor não preservou a integridade da membrana da cauda e por isso estas células sofreram morte celular e permaneceram com as caudas retas ao invés de apresentar o dobramento do axonema dentro da membrana.

8 CONCLUSÕES

O tempo de equilíbrio é necessário para preservação da motilidade total, da motilidade progressiva, da integridade das membranas plasmática e acrossomal, e aumenta a longevidade do sêmen bovino durante o processo de criopreservação, uma vez que estes parâmetros são afetados na ausência do tempo de equilíbrio.

O tempo de equilíbrio também atua na preservação da morfologia espermática.

Durante o processo de criopreservação, ocorrem interações entre o tempo de equilíbrio e o diluidor sobre vários parâmetros espermáticos que permitem maior sobrevivência e longevidade espermática.

O tempo de equilíbrio não afeta a maioria das características do movimento espermático (velocidade do trajeto, velocidade progressiva, velocidade curvilinear, amplitude lateral da cabeça, freqüência de batimentos flagelares e linearidade), porém aumenta a motilidade total e progressiva do sêmen criopreservado.

A utilização de no mínimo 4 h de tempo de equilíbrio garante uma maior sobrevivência espermática avaliada pela integridade das membranas plasmática e acrossomal dos espermatozóides bovinos criopreservados.

Diluidores com formulações diferentes atuam de forma distinta na proteção dos diversos compartimentos celulares durante a criopreservação e interagem com o tempo de equilíbrio na preservação das membranas celulares.

O diluidor TRIS quando associado a um período de equilíbrio de 4h, garante maior motilidade total e progressiva e promove maior proteção às membranas plasmática e acrossomal de espermatozóides bovinos criopreservados do que o diluidor Bioxcell®.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGCA, Y.; CRITSER, J.K. Cryopreservation of spermatozoa in assisted reproduction. *Seminars in Reproductive Medicine*, v. 20, n. 1, p. 15-23, 2002.

AIRES, V.A.; HINSCH, K-D.; MUELLER-SCHLOESSER, F. et al. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, v. 60, n. 2, p. 269–279, 2003.

ALBERTI, K. *Congelação de sêmen bovino*: Novos enfoques em meios diluidores. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2004. Monografia – Seminários em Reprodução Animal I. Disponível em: <http://br.geocities.com/biotecvet/semi04/Karina_Alberti.pdf>. Acessado em: 02 jan 2008.

ALBERTI, K.; CARMO, M.T.; OBA, E. et al. Eficiência de novo diluente na congelabilidade de sêmen bovino. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 32, suplemento 1, p. 176, 2004.

ALMQUIST, J.O.; ALLEN, C.H.; BRANAS, R.J. Effect on fertility of freezing large numbers of straws of bovine spermatozoa in a mechanical freezer. *Journal of Animal Science*, v. 55, n. 2, p. 232-235, 1982.

ALMQUIST, J.O.; WIGGINS, H.B. Survival of bull spermatozoa frozen and thawed by different methods in plastic straws. *A. I. Digest*, v. 21, n. 7, p. 12, 1973.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 7, n. 3, p. 145-174, 1987.

AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L. et al. Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, v. 61, n. 5, p. 895-907, 2004.

ANZAR, M.; HE, L.; BUHR, M.M. et al. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow citometry and its relation with fertility. *Biology of Reproduction*, v. 66, n. 2, p. 354-360, 2002.

ARRUDA, R.P. *Avaliação do sêmen congelado de bovinos:* prova lenta e rápida de termorresistência: efeitos sobre a fertilidade. 1988. 41f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo.

ARRUDA, R.P. *Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)*. 2000. 121 f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; PERES, K.R. et al. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen eqüino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, n. 1, p. 8-16, 2007. Disponível em: <http://www.cbra.org.br>. Acessado em: 02 jan 2008.

ARRUDA, R.P.; FORERO-GONZALEZ, R.A.; CELEGHINI, E.C.C. et al. Effects of cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotectants on plasmatic, acrosomal and mitochondrial membranes of bovine spermatozoa. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 33, suplemento 1, p. 329, 2005.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ANDRADE, A.F.C. et al. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1., 2004, Londrina. *Anais...* São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, 2004. p. 166-179.

ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G. et al. Evaluation of effects of extenders and cryoprotectants on equine spermatozoa using computer-assisted sperm analyses (CASA) and flow cytometry. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 31, suplemento, p. 228-229, 2003.

ASHIZAWA, K.; WISHART, G.J.; RANASINGHE, A.R.A.H. et al. Protein phosphatase-type 2B is involved in the regulation of the acrosome reaction but not in the temperature-dependent flagellar movement of fowl spermatozoa. *Reproduction*, v.128, n. 6, p. 783-787, 2004.

BAAS J.W.; MOLAN P.C.; SHANNON P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 68,n. 2, p. 275-280, 1983.

BALL, P.J.H; PETERS, A.R. Artificial insemination. In:__. *Reproduction in cattle*. 3. ed. Oxford: Blackwell Pub., 2004. Cap. 10, p. 124-133.

BAMBA, K.; CRAN, D.G. Effect of rapid warming of boar semen on sperm morphology and physiology. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 75, n. 1, p. 133-138, 1985.

BAMBA, K.; CRAN, D.G. Effect of rapid warming of bull and rabbit semen. *Journal*

of Reproduction and Fertility, v. 82, n. 2, p. 501-507, 1988.

BAVISTER, B.D.; LEIBFRIED, M.L.; LIEBERMAN, G. Development of preimplantation embryos of golden hamster in a defined medium. *Biology of Reproduction*, v. 28, n. 1, p. 235-247, 1983.

BELLIN, M.E.; OYARZO, J.N.; HAWKINS, H.E. et al. Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. *Journal of Animal Science*, v. 76, n. 8, p. 2032-2039, 1998.

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

BERNDTSON, W.E.; FOOTE, R.H. The survival of frozen bovine spermatozoa following minimum exposure to glycerol. *Cryobiology*, v. 5, n. 6, p. 398-402, 1969.

BERNDTSON, W.E.; FOOTE, R.H. Bovine sperm cell volume at various intervals after addition of glycerol at 5 °C. *Cryobiology*, v.9, n. 1, p. 29-33, 1972a.

BERNDTSON, W.E.; FOOTE, R.H. The freezability of spermatozoa after minimal pre-freezing exposure to glycerol or lactose. *Cryobiology*, v. 9, n. 1, p. 57-60, 1972b.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nordisk Veterinaermedicin*, v. 25, n.7-8, p. 383-391, 1973.

BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J.P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B. et al. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*, v. 50, n. 5, p. 699-706, 1998.

BUNCH, D.O.; WELCH, J.E.; MAGYAR, P.L. et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-S protein distribution during mouse spermatogenesis. *Biology of Reproduction*, v. 58, n. 3, p. 834-841, 1998.

CANCEL, A.M.; LOBDELL, D.; MENDOLA, P. et al. Objective evaluation of hiperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted analysis. *Human Reproduction*, v.15, n. 6, p. 1322-1328, 2000.

CARTAXO, W.O.; PENA-ALFARO, C.E.; BACALHAU, A. et al. Parâmetros seminais e circunferência escrotal de touros jovens da raça Guzerá criados no estado da Paraíba. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 25, n. 2, p. 214-215, 2001.

CARVALHO, L.A.; NOVAES, L.P.; GOMES, A.T. et al. Sistema de produção de leite (Zona da Mata Atlântica). [s.l.]: Embrapa Gado de Leite, 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteZonadaMataAtlantica/importancia.html>. Acessado em: 20 out. 2006.

CBRA – COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.* Belo Horizonte, 1998. 49p.

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

CELEGHINI, E.C.C; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C. et al. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 42, n. 5, p. 479-488, 2007.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C. et al. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin, *Animal Reproduction Science*, v. 104, n. 2-4, p. 119-131, 2008.

CELEGHINI, E.C.C; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C. et al. Simultaneous evaluation of the plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in equine spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. *Abstracts...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004. p. 511.

COOK, W.H; MARTIN, W.G. Egg lipoproteins. In: TRIA, E.; SCANU, A.M. (Eds.). *Structural and functional aspects of lipoproteins in living systems*. New York: Academic Press, 1969. p. 579-615.

COTTORELLO, A.C.P. *Criopreservação de sêmen eqüino utilizando associação de etilenoglicol e glicerol.* 2002. 47f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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.

COULTER, G.H. Bovine spermatozoa in vitro: a review of storage, fertility estimation and manipulation. *Theriogenology*, v. 38, n. 2, p. 197-207, 1992.

CHANG, M.C. A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature*, v. 179, n. 4553, p. 258-259, 1957.

CHAVEIRO, A.; LIU, J.; ENGEL, B. et al. Significant variability among bulls in the sperm membrane permeability for water and glycerol: Possible implications for semen freezing protocols for individual males. *Cryobiology*, v. 53, n. 3, p. 349-359, 2006.

CHEN, V.; FOOTE, R.H.; TOBBACK, C. et al. Survival of bull spermatozoa seeded and frozen at different rates in egg yolk-tris and whole milk extenders. *Journal of Dairy Science*, v. 76, n.4, p. 1028-1034, 1993.

CHRISTENSEN, P.; BOELLING, D.; PEDERSEN, K.M. et al. Relationship between sperm viability as determined by flow cytometry and non return rate of dairy bulls. *Journal of Andrology*, v. 26, n. 1, p. 98-106, 2005.

CRAGLE, R.G.; MYERS, R.M. Effects of levels of sodium citrate, glycerol, e equilibration time on recovery of bovine spermatozoa after storage at −79ºC. *Journal of Dairy Science*, v. 37, n. 6, p. 652, 1954.

CRAGLE, R.G.; MYERS, R.M.; WAUGH, R.K. et al. The effects of various levels of sodium citrate, glycerol, and equilibration time on survival of bovine spermatozoa after storage at –79°C. *Journal of Dairy Science*, v. 38, n. 5, p. 508-514, 1955.

CRITSER, J.K.; HUSE-BENDA, A.R.; AAKER, D.V. et al. Cryopreservation of human spermatozoa. II. Post-thaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. *Fertility and Sterility*, v. 47, n. 6, p. 980-984, 1987.

CROZET, N. Fertilization in vitro and in vivo. In: THIBAULT, C.; LEVASSEUR, M.C.; HUNTER, R.H.F. (Eds.) *Reproduction in mammals and man*. Paris: Ellipses, 1993. p.327-347.

CURRY, M.R.; WATSON, P.F. Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology*, v. 31, n. 1, p. 39-46, 1994.

DALIMATA, A.M.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. *Theriogenology*, v. 48, n. 5, p. 831-841, 1997.

DEVIREDDY, R.V.; SWANLUND, D.J.; BISHOF, J.C. The effect of extracellular ice on the water permeability parameters of mouse sperm plasma membrane during freezing. In: ASME/JSME JOINT THERMAL ENGINEERING CONFERENCE, 5. 1999, San Diego. *Proceedings*... New York: American Society of Mechanical Engineers, 1999. CD-ROM, paper 6205.

DE LEEUW, F.E.; CHEN, H.C.; COLENBRANDER, B. et al. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*, v. 27, n. 2, p. 171-183, 1990.

DE LEEUW, F.E.; DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, H.G. et al. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, v. 30, n. 1, p. 32-34, 1993.

DHAMI, A.J.; SAHNI, K.L.; MOHAN, G. Effect of various cooling rates (from 30ºC to 5ºC) and thawing temperatures on the deep-freezing of Bos Taurus and Bos Bubalis semen. *Theriogenology*, v. 38, n. 3, p. 565-574, 1992

DHAMI, A.J.; SAHNI, K.L. Evaluation of different cooling rates, equilibration periods and diluents for effects on deep-freezing, enzyme leakage and fertility of taurine bull spermatozoa. *Theriogenology*, v. 40, n. 6, p. 1269-1280, 1993.

DIAS, J.C. *Aspectos andrológicos, biometria testicular e parâmetros genéticos de características reprodutivas de touros nelore, de dois e três anos de idade, criados extensivamente no Mato Grosso do Sul.* 2004. 52 p. Dissertação (Mestrado em zootecnia) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DIMITROPOULOS, E. La signification du test de la thermoresistence dans l'appreciation de la valeur fécondante du sperme congelé. *Annales de Médecine Vétérinaire*, v. 111, n. 4, p. 215-224, 1967.

DIMITROPOULOS, E. Données actuelles sur les milieux de dilution du sperme de taureau et critères d'appréciation de sa valeur fécondante après congélation. In: SYMPOSIUM OF ZOOTECNIA, 8., 1973. Milan. *Proceedings*... Milan: Società Italiana per il Progresso della Zootecnia, 1973. p. 115-123.

DUMOULIN, J.C.M.; BERGES-JANSSEN, J.M.; PIETERS, M.H. et al. The protective effects of polymers in the cryopreservation of human and mouse zonae pellucidae and embryos. *Fertility and Sterility*, v. 62, n. 4, p. 793-798, 1994.

EDDY, E.M.; O'BRIEN, D.A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. (Eds.) *The physiology of reproduction*. 2. ed. New York: Raven Press, 1994. Cap. 2, p. 29-77.

ENNEN, B.D.; BERNDTSON, W.E.; MORTIMER, R.G. et al. Effect of processing procedures on motility of bovine spermatozoa frozen in .25-ml straws.

Journal of Animal Science, v. 43, n. 3, p. 651-656, 1976.

ERICSSON, S.A.; GARNER, D.L.; REDELMAN, D. et al. Assessment of the viability and fertilizing potential of cryopreserved bovine spermatozoa using dual fluorescent staining and two-flow cytometric systems. *Gametes Research*, v. 22, n. 4, p. 355-368, 1989.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectants "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology*, v. 23, n. 1, p. 1-13, 1986.

FARRELL, P.B.; PRESICCE, G.A.; BROCKETT, C.C. et al. Quantification of bull sperm characteristics measured by Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, v. 49, n. 4, p. 871-879, 1998.

FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W.; PANISH, P.L. Glycerol equilibration time revisited. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 3., 1996, Mariensee. *Proceedings…* Berlim: Blackwell, 1996. p. 141-146.

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.

FOOTE, R.H.; KAPROTH, M.T. Large batch freezing of bull semen: effect of time of freezing and fructose on fertility. *Journal of Dairy Science*, v. 85, n. 2, p. 453-456, 2002.

FOULKES, J.A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 49, n. 2, p. 277-284, 1977.

FRASER, L.R.; QUINN, P.J. A glycolytic product is obligatory for initiation of sperm acrossome reaction and whiplash motility required for fertilization in the mouse. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 61, n. 1, p. 25-65, 1981.

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

GAO, G.Y.; ASHWORTH, E.; WATSON, P.F. et al. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. *Biology of Reproduction*, v. 49, n. 1, p. 112-123, 1993.

GAO, D.; MAZUR, P.; CRITSER, J.K. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. In: KAROW, A.M.; CRITSER, J.K. (Eds.) *Reproduction tissue banking:* scientific principles. San Diego: Academic, 1997. p. 263-328.

GAO, D.Y.; LIU, J.; LIU, C. et al. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reproduction*, v. 10, n. 5, p. 1109-1122, 1995.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozóides e plasma seminal. In: HAFEZ, E.S.E. (Ed.) *Reprodução animal*. 6 ed. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1995. p. 167-190.

GARNER, D.L.; PINKEL, D.P.; JOHNSON, L.A. et al.. Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent attaining and flow cytometric analysis. *Biology of Reproduction*, v. 34, n. 1, p. 127-138, 1986.

GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; GRAVANCE, C.G. The effect of glycerol on the viability mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa

Reproduction in Domestic Animals, v. 34, n. 5, p. 399-404, 1999.

GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; JOERG, H.W. et al. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v. 57, n. 6, p. 1401-1406, 1997.

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

GIL, J. JANUSKAUSKAS, A.; HAARD, M.Ch. et al. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-Plus and Tryladil. *Reproduction in Domestic Animals*, v.35, n. 2, p. 69-77, 2000.

GILBERT, G.R.; ALMIQUIST, J.O. Effects of processing procedures on post-thaw acrosomal retention and motility of bovine spermatozoa packaged in 0.3-ml straws at room temperature. *Journal of Animal Science*, v. 46, n. 1, p. 225-231, 1978.

GILMORE, J.A.; LIU, J.; GAO, D.Y. et al. Determination of optimal cryoprotectans and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. *Human Reproduction*, v. 12, n. 1, p. 112-118, 1997.

GONZALEZ, R.A.F. *Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membrana do espermatozóide e a integridade de membrana do espermatozóide bovino.* 2004. 92f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

GRAHAM, J.K. Response of spermatozoa to freezing. In: TECHNIQUES FOR HANDLING AND UTILIZATION OF TRANSPORTED COOLED AND FROZEN EQUINE SPERMATOZOA. 1995. Fort Collins. *Proceedings*... Fort Collins: Colorado State University, 1995. p. 83-95.

GRAHAM, E.F.; ERICKSON, W.E.; BAYLEY, N.D. Effect of glycerol equilibration on frozen bovine spermatozoa. *Journal of Dairy Science*, v. 40, n. 5, p. 510-515, 1957.

GRAHAM, J.K. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 12, n.1, p. 119-130, 1996a.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Reproduction and Technology*. v. 12, n. 1, p. 131-145, 1996b.

GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science*, v. 68, n. 3-4, p. 239-247, 2001.

GRAHAM J.K.; FOOTE RH. Effect of several lipids fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*, v. 24, n. 1, p. 42-52, 1987.

GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry, *Biology of Reproduction*, v. 43, n. 1, p. 55-64, 1990.

GRAHAM, E.F.; SCHMEHL, M.K.L.; NELSON, D.S. Problems with laboratory assays. In: NATIONAL ASSOCIATION OF ANIMAL BREEDERS TECHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION. 8., 1980, Columbia. P*roceedings*... Columbia: National Association of Animal Breeders, 1980. p. 59-66.

HAMMERSTED, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of

mammalian sperm: What we ask them to survive. *Journal of Andrology*, v. 11, n. 1, p. 73-78, 1990.

HARRISON, R.A.P; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 88, n. 1, p. 343-352, 1990.

HAUGLAND, R.P. *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*. 8. ed. Eugene: Molecular Probes Inc., 2001.

HEROLD, F.C.; DE HAAS, K.; COLENBRANDER, B. et al. Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from African buffalo (Syncerus caffer) using Triladyl™ or AndroMed®. *Theriogenology*, v. 66, n. 5, p. 1123-1130, 2006.

HEROLD, F.C.; DE HAAS, K.; COOPER, D. et al. Comparison of three different media for freezing of epididymal sperm from the African buffalo (*Syncerus caffer*) and influence of equilibration time on the post-thaw sperm quality. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v. 71, n 3, p. 203-210, 2004.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, n. 1-3, p. 3-22, 2000.

HOLT, W.V.; HEAD, M.F.; NORTH, R.D. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. *Biology of Reproduction*, v. 46, n. 6, p. 1086-1094, 1992.

HOLT, W.V.; NORTH, R.D. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. *Journal of Experimental Zoology*, v. 230, n. 3, p. 473-483, 1984.

HOLT, W.V.; NORTH, R.D. Determination of lipid components and thermal phase transition temperature in an enriched plasma membrane fraction from spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 73, n. 1, p. 285-294, 1985.

HOLT, W.V.; NORTH, R.D. Thermotropic phase transition in the plasma membrane of ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 78, n.2, p. 447-457, 1986.

HOSHI, K.; TSUKIKAWA, S.; SATO, A. Importance of Ca^{2+}, K^{+} and glucose in the medium for sperm penetration through the human zona pellucida. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, v. 165, n. 2, p. 99-104, 1991.

IUPAC. Guia IUPAC para a Nomenclatura de Compostos Orgânicos" Tradução Portuguesa na variantes Européia e Brasileira de "A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds - Recomendations 1993", original em inglês Ed. PÂNICO, R.; POWELL, W.H.; RICHER, J-C, 1993.

IWAMOTO, T.; GAGNON, C. Purification and characterization of a sperm motility inhibitor in human seminal plasma. *Journal of Andrology*, v. 9, n. 6, p. 377-383, 1988.

JASKO, D.J.; LITTLE, T.V.; SMITH, K. et al. Objective analysis of stallion sperm motility. *Theriogenology*, v. 30, n. 6, p. 1159-1167, 1988.

JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SÖDERQUIST, L. et al. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology*, v. 52, n. 4, p. 641-658, 1999.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle

membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*, v. 60, n. 4, p. 743-758, 2003.

JOHNSON, L.; VARNER, D.D.; ROBERTS, M.E. et al. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, p. 471-480, 2000.

JONDET, R. Influence du temps d'equilibration sur la congelation et le pouvoir fecondant du sperme de taureau. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales*, v. 161, n. 53, p. 1407, 1967.

JONDET, R. Survival rate and fertilizing ability of frozen bull spermatozoa following 8 and 1 minute of exposure to glycerol. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 7., 1972, Munich. *Proceedings...*, v. 2, p. 1371, 1972.

JONDET, R.; MIES-FILHO, A.; RABADEUX, Y. L'épreuve de thermorésistance dans l'appréciationde la valeur du sperm bovin congelé. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales*, v. 172, n. 4, p. 764-769, 1978.

JUHÁSZ, J.; NAGY, P.; KULCSÁR, M. et al. Methods for semen and endocrinological evaluation of stallion: a review. *Acta Vetereinaria BRNO*, v.69, n. 4, p. 247-259, 2000.

KAROW, A.M. *Cryobiology 2001 for mammalian embryologists*. Xytex Corporation, 2001. Disponível em: <http://www.xytex.com/Cryobiology>. Acessado em: 10 out 2001.

KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction*, v. 49, n. 6, p. 1202-1207, 1993.

KJAESTAD, H.E.; ROPSTAD, E.; ANDERSEN BERG, K. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.34, n. 3, p. 299-303, 1993.

KUNDU, C.N.; CHAKRABORTY, J.; DUTTA, P. et al. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. *Cryobiology*, v. 40, n. 2, p. 117-125, 2000.

LANDA, C.A.; ALMQUIST, J.O. Effect of freezing large numbers of straws of bovine spermatozoa in an automatic freezer on post-thaw motility and acrosomal retention. *Journal of Animal Science*, v.49, n. 5, p. 1190-1194, 1979.

LARSEN, L.; SCHEIKE, T.; JENSEN, T. K. et al. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. *Human Reproduction*, v. 15, n. 7, p. 1562-1567, 2000.

LEIBO, S.P.; BRADLEY, L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: GAGNON, C. (Ed.) *The male gamete.* Vienna: Cache River Press, 1999. p. 501-516.

LUDWICK, T.M.; OLDS, D.; CARPENTER, M. A method of evaluating bull semen. *Journal of Dairy Science*, v. 31, n. 8, p. 677, 1948.

MAGISTRI, M.; VIDAMENTB, M.; CLEMENT, F. et al. Fertility prediction in stallions. *Animal Reproduction Science*, v. 42, n. 1-4, p. 181-188, 1996.

MANN, T.; WHITE, I. G. Glycerol metabolism by spermatozoa. *Biochemical Journal* , v. 65, n.4, p. 634-639, 1957.

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A. et al. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biology of Reproduction* , v. 67, n. 4, p. 1250-1258, 2002.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology* , v. 53, n. 1, p. 109-119, 2002.

MARTIG, R.C.; ALMQUIST, J.O. Effect of glycerol equilibration time on fertility of bull spermatozoa frozen in homogenized milk-frutose diluent. *A. I. Digest*, v. 14, n. 5, p. 8-9, 1966.

MARTIN, I.C.A. The influence of diluents and processing time after ejaculation on the revival of deep-frozen bull spermatozoa. *Journal of Agricultural Science*, v. 61, p. 55-63, 1963.

MARTIN, I.C.A.; EMMENS, C.W. Effects of time of equilibration and addition of fructose on the survival and fertility of bull spermatozoa deep frozen to –79°C. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 2, p. 404-410, 1961.

MAZUR, P. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. In: INTERNATIONAL CONGRESS IN ANIMAL REPRODUCTION AND INSEMINATION, 9., 1980, Madrid. *Proceedings*... Madrid: Ed. Garsi, 1980. p. 99-114.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, v. 247, n. 3, p. C125-C142, 1984.

McKINNON, A.O. Artificial insemination of cooled, transported and frozen semen. *Australian Equine Veterinarian*, v. 14, n. 4, p. 156-175, 1996.

MELO, M.I.V. *Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino*. 1999. 67 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MIKI, K.; QU, W.; GOULDING, E.H. et al. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 101, n. 47, p. 16501-16506, 2004.

MILLER, W.J.; VANDEMARK, W.L. The influence of glycerol level, various temperature aspects, and certain other factors on the survival of bull spermatozoa at sub-zero temperatures. *Journal of Dairy Science*, v. 37, n. 1, p. 45-51, 1954.

MILLER, D.J.; WINER, M.A.; AX, R.L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biology of Reproduction*, v. 42, n. 6, p. 899-915, 1990.

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.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A. et al. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v. 57, n. 6, p. 1695-1706, 2002.

MUIÑO, R.; FERNÁNDEZ, M.; PEÑA, A.I. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 42, n. 3, p. 305-311, 2007.

MULLER, K.; POMORSKI, T.; MULLER, P. et al. Protein-dependent translocation of aminophospholipids and asymmetry transbilayer distribution of phospholipids in the plasma membrane of ram sperm cells. *Biochemistry*, v. 33, n. 33, p. 9968-9974, 1994.

NAGY, S.; JANSEN, J.; TOPPER, E.K. et al. A triple-stain flow cytometric method to asses plasma and acrossome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biology of Reproduction*, v. 68, n. 5, p. 1828-1835, 2003.

NASH, T. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage to freezing and thawing. In: MERYMAN, H.T. (Ed.) *Cryobiology*. New York: Academic Press, 1966. p. 179-220.

O'DELL, W.T.; ALMQUIST, J.O. Techniques for freezing bull spermatozoa in heated milk and preliminary breeding results. *Journal of Dairy Science*, v. 37, n. 6, p. 652, 1954

O'DELL, W.T.; ALMQUIST, J.O. Freezing bovine semen I. Techniques for freezing bovine spermatozoa in milk diluents. *Journal of Dairy Science*, v. 40, n. 12, p. 1534-1541, 1957.

O'DELL, G.D.; HURST, V. The effect of glycerol equilibration time on the freezing of bovine spermatozoa in egg yolk-sodium citrate and skim milk semen extenders. *Journal of Dairy Science*, v. 39, n. 8, p. 1156-1160, 1956.

O'DELL, W.T.; FLIPSE, R.J.; ALMQUIST, J.O. Metabolism of bovine semen III. Uptake and metabolic utilization of glycerol-1-C^{14} by bovine spermatozoa. *Journal of Dairy Science*, v. 39, n. 2, p. 214-218, 1956.

O'DELL, G.D.; HURST, V. The effect of glycerol equilibration time on freezing of bovine spermatozoa in yolk-citrate and skimmilk semen diluters. *Journal of Dairy Science*, v. 38, n. 6, p. 623, 1955.

PACE, M.M.; GRAHAM, E.F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *Journal of Animal Science*, v. 39, n. 6, p. 1144-1149, 1974.

PARKS, J.E. Hypothermia and Mammalian gametes, In: KAROW, A.M.; CRITSER, J.K. (Eds.) *Reproduction Tissue Banking:* scientific principles. San Diego: Academic Press, 1997. p. 229-261.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v. 38, n. 2, p. 209-222, 1992.

PARKS, J.E.; LYNCH, D.V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, v. 29, n.2, p. 255-266, 1992.

PARKS, J.E.; MEACHAM, T.N.; SAACKE, R.G. Cholesterol and phospholipids of bovine spermatozoa. I. Selection of a PIPES-buffered diluent for evaluating the effect of egg yolk lipoproteins on sperm cholesterol and phospholipids. *Biology of Reproduction*, v. 24, n. 2, p. 393-398, 1981.

PHILLIPS, P.H. Preservation of bull semen. *Journal of Biological Chemistry*, v. 130, n. 1, p. 415, 1939.

PICKETT, B.W. Seminal extender and cooled semen. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (Eds.) *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 746-754.

PICKETT, B.W.; BERNDTSON, W.E. Preservation of bovine spermatozoa by freezing in straws: A Review. *Journal of Dairy Science*, v. 57, n. 11, p. 1287-1301, 1974.

PICKETT, B.W.; BERNDTSON, W.E. Principles and techniques of freezing spermatozoa. In: SALISBURY, G.W.; VANDEMARK, N.L.; LODDGE, J.R. (Eds.), *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle*. San Francisco: WH Freeman and Company, 1978. p. 494-589.

POLGE, C.; JAKOBSEN, K.F. Techniques for freezing bull semen. *Veterinary Record*, v. 71, n. p. 928-932, 1959.

POLGE, C.; ROWSON, L.E.A. Long-term storage of bull semen frozen at very low temperatures (−79ºC). In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PHYSIOLOGY AND PATHOLOGY OF ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 2., 1952, Copenhagen. *Proceedings*... p. 90-98, 1952a.

POLGE, C.; ROWSON, L.E.A. Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing to −79ºC. *Nature*, v. 169, n. 4302, p. 626, 1952b.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydratation at low temperatures. *Nature*, v. 164, n. 4172, p. 666, 1949.

QUINN; P.J. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. *Cryobiology*, v. 22, n. 2, p. 128-146, 1985.

QUINN; P.J. Principles of membrane stability and phase behavior under extreme conditions. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v.21, n. 1, p. 3-19, 1989.

QUINN, P.J.; CHOW, P.Y.; WHITE, I.G. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 60, n. 2, p. 403-407, 1980.

RAPHAEL, C.F. *Efeito da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozóide eqüino refrigerado.* 2007. 111f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo.

REERS, M.; SMITH, T.W.; CHEN, L.B. J-agregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry*, v. 30, n. 18, p. 4480-4486,1991.

ROBERTSON, R.T.; BHALLA, V.K.; WILLIAMS, W.L. Purification and the peptide nature of decapacitation factor. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v. 45, n. 5, p. 1331-1336, 1971.

RUSSEL, L.D. Role in spermiation. In: RUSSEL, L.D.; GRISWOLD, M.D. (Eds.) *The Sertoli cell*. Clearwater: Cache River Press, 1993. p. 269-304.

RUSSEL, L.D.; ETTLIN, R.E.; HIKIM, A.P.S. et al. *Histological and histopathological evaluation of the testis***.** Clearwater: Cache River Press, 1990. 284 p.

SAEG 9.1 Sistema de análises estatísticas e genéticas - Manual do usuário. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa- UFV. Versão 9.1, 2001, 301p.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, v. 37,n. 3-4, p. 185-249, 1995a.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*, v. 38, n. 1-2, p. 1-36, 1995b.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, n. 1-3, p. 77-111, 2000.

SALISBURY, G.W.; VANDEMARK, N.L. Principios y técnicas de la conservación del esperma. In:___. *Fisiologia de la reproduccion e inseminacion artificial de los bovidos*. Zaragoza: Acribia, 1964. Cap. 16, p. 417-451.

SALVIOLI, S.; ARDIZZONI, A.; FRANCESCHI, C. et al. JC-1, but not DiOC6 (3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to asses ΔΨ changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *Federation of European Biochemical Society Letters*, v. 411, n. 1, p. 77-82, 1997.

SANTOS, G.C.J. *Congelabilidade do sêmen eqüino em diferentes diluidores.* 2003. 50f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SAKKAS, D.; MARIETHOZ, E.; MANICARDI, G. et al. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Reviews of Reproduction*, v. 4, n. 1, p. 31-37, 1999.

SAROFF, J.; MIXNER, J.B.; The relationship of egg-yolk and glycerol content of diluters and glycerol equilibration time to survival of bull spermatozoa after low temperature freezing. *Journal of Dairy Science*, v. 38, n. 3, p. 292-297, 1955.

SENGER, P.; BECKER, W.C.; HILLERS, J.K. Effect of thawing and post-thaw temperature on motility and acrossomal maintenance in bovine semen frozen in plastic straws. *Journal of Animal Science*, v. 42, n. 4, p. 932-936, 1976.

SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, v. 65, n. 5, p. 958-978, 2006.

SINGER, S.J., NICHOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cells membranes. *Science,* v. 175, n. 4023, p. 720-731, 1972.

SNOECK, P.P.N. *Aspectos da criopreservação de sêmen eqüino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade.* 2003. 116 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SOTO, M.A.B. *Caracterização de proteínas do sêmen congelado de touros da raça Nelore e suas correlações com taxas de prenhez*. 2005. 54f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SOUZA, N.L. *Avaliação de técnicas para determiner a viabilidade e a integridade do acrossoma de espermatozóides criopreservados de eqüinos.* 2001. 76 f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

STATVIEW. Using Statview, SAS Institute Inc. second edition, 1998. 288 p.

STOREY, B.T.; KAYNE, F.J. Energy metabolism of spermatozoa. V. The Embden-Myerhof pathway of glycolysis: activities of pathways enzymes in hypotonically treated rabbit epididymal spermatozoa. *Fertility and Sterility*, v. 26, n. 12, p. 1257-1265, 1975.

SZTEIN, J.M.; NOBLE, K.; FARLEY, J.S. et al. Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, v. 42, n. 1, p. 28-39, 2001.

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, n. 7, p. 1245-1252, 2004.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipids-binding proteins stimulate phospholipids efflux from epididymal sperm. *Biology of Reproduction*, v. 61, n. 3, p. 590-598, 1999.

THOMAS, C.A.; GARNER, D.L.; DEJARNETTE, J.M. et al. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determinated by flow cytometry. *Biology of Reproduction*, v. 58, n. 3, p. 786-793, 1998.

THUN, R.; HURTADO, M.; JANETT, F. Comparison of Biociphos-Plus® and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*, v.57, n. 3, p. 1087-1094, 2002.

TRAVIS, A.J.; FOSTER, J.A.; ROSENBAUM. N.A. et al. Targeting of a gem cell-specific type 1 hexokinase laking a porin-binding domain to the mitochondria as well as to the head and fibrous sheath of murine spermatozoa. *Molecular Biology of the Cell*, v. 9, n. 2, p. 263-276, 1998.

TRIMECHE, A.; ANTON, M.; RENARD, P. et al. Quail egg yolk: A novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm. *Cryobiology*; v. 34, n. 4, p. 385-393, 1996.

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.

TURNER, R.M.; ERICKSSON, R.L.; GERTON, G.L. et al. Relationship between sperm motility and the processing and tyrosine phosphorylation of two human sperm fibrous sheath proteins, pro-hAKAP82 and hAKAP82. *Molecular Human Reproduction*, v. 5, n. 9, p. 816-824, 1999.

TURNER, R.M.; JOHNSON, L.J.; HAIG-LADEWIG, L. et al. An X-linked gene encodes a major human sperm fibrous sheath protein, hAKAP82. Genomic organization, protein kinase A-RII binding, and distribution of the precursor in the sperm tail. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 48, p. 32135-32141, 1998.

TSUTSUI, T. Functional properties of heat-treated egg yolk low density lipoprotein. *Journal of Food Science***,** v. 53, n. 4, p. 1103-1106, 1988.

URNER, F.; SAKKAS, D. Glucose participates in sperm-oocyte fusion in the mouse. *Biology of Reproduction*, v. 55, n. 4, p. 917-922, 1996.

VALE FILHO, V.R.; ANDRADE, V.J.; SALVADOR, D.F. Melhoramento genético e manejo reprodutivo de touros jovens (CAP/DEP's) na raça Tabapuã : Projeto UFMG/ Núcleo Três Fronteiras. *ABCZ Revista Brasileira do Zebu e seus Cruzamentos*, n. 12, p. 44-47, 2003.

VALLE, G.R.; SILVA FILHO, J.M. Membrana plasmática do espermatozóide.

Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia, n. 36, p. 45-53, 2001.

VAN WAGTENDONK-DE LEEW, A.M.; HARING, R.M.; KAAL-LANSBERGEN, L.M.T.E. et al. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soybean extract. *Theriogenology*, v. 54, n.1, p. 57-67, 2000.

VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A.; PÉREZ, L. et al. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. *Theriogenology*, v. 41, n.2, p. 483-489, 1994.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v. 57, n. 1, p. 149-l79, 2002.

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.

WAKAMATU, T.; SATO, Y.; SAITO, Y. Identification of the components responsible for the gelation of egg yolk during freezing. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.46, n. 6, p. 1495-1503, 1982.

WATSON, P.F Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 7, n. 4, p. 871-891, 1995.

WATSON, P.F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 62, n. 2, p. 483-492, 1981.

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

WATSON, P.F.; DUNCAN, A.E. Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. *Cryobiology*, v. 25, n. 2, p. 131-142, 1988.

WAY, A.L.; GRIEL Jr., L.C.; KILLIAN, G.J. Effects of accessory sex gland fluid on viability, capacitation, and the acrosome reaction of cauda epididymal bull spermatozoa. *Journal of Andrology*, v. 21, n.2, p. 213-219, 2000.

WESTHOFF, D.; KAMP, G. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is bound to the fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Journal of Cell Science*, v. 110, n. 15, p. 1821-1829, 1997.

WHITE, I.G. The effect of some inorganics ions on mammalian spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 3., 1956, Cambridge. *Proceedings...*, v. 1, p. 23-25, 1956.

WILLET, E.L.; SALISBURY, G.W. The effect of various diluters, cooling rate, temperature of storage, and some other factors on the livability of spermatozoa in stored samples of bull semen. *Cornell University Agricultural Experiment Station Memoir*, v. 249, p. 45, 1942.

WIGGIN, H.B.; ALMQUIST, J.O. Combinations of glycerol percent, glycerol equilibration time, and thawing rate upon freezability of bull spermatozoa in plastic straws. *Journal of Dairy Science.*, v. 58, n. 3, p. 416-419, 1975.

ANEXOS

ANEXO - 1

TAP SPERM (Bavister et al., 1983)

1. SOLUÇÃO DE SAIS DO TALP (para preparar 500mL)

Componentes:

- NaCl .....2,1 g
- KCl .....0,935 g
- $NaHCO_3$ .....1,05 g
- NaH2PO4 .....0,025 g
- CaCl 2H2O……...0,04 g
- Herpes …….3,25 g

Preparo:

- Diluir CaCl 2H2O e MgCl 6H2O em 200 mL de água destilada
- Diluir os outros sais em 200 mL de água destilada
- Combinar as duas soluções e completar para 500mL
- Filtrar
- Manter resfriado

2. SOLUÇÃO DOS METABÓLITOS GLICOSADOS

- SOLUÇÃO ESTOQUE (para preparar 50 mL)

Componentes

- Glicose ..... 2,5 g
- Lactato de Sódio ..... 9,25 mL
- Piruvato de Sódio ..... 70 mg
- Pen-Stret .....12,5 mL

Preparo :

- Dissolver todos os componentes
- Alíquotas (alíquotas de 5 mL)
- Manter em freezer (-20º C)

- SOLUÇÃO TRABALHO

Preparo:

- Colocar 45 mL da Solução de Sais do TALP
- Ajustar o pH para 7,4
- Colocar 5 mL da Solução Estoque dos Metabólitos Glicosados
- Filtrar em filtro de 0,45 μm
- Aliquotar (alíquotas de 300 μL)
- Manter em freezer (-20º C)

3. TALP SPERM (preparo do dia)

Componentes:

- 10 mL da Solução de Sais do TALP
- 200 μL da Solução (trabalho) de Metabólitos Glicosados
- 100 mg de soro albumina bovina (BSA)

Preparo:

- Dissolver o BSA em incubador por 10 minutos
- Ajustar o pH para 7,4
- Filtrar em filtro de 0,45 μm

ANEXO - 2

DILUIÇÕES E PREPARO DAS SONDAS FLUORESCENTES

1 . IODETO DE PROPÍDIO (PI, Sigma – Aldrich, 28,707-5 25 mg)

- SOLUÇÃO ESTOQUE (25 mg/mL)

25 mg de PI + 1 mL de DMSO

- SOLUÇÃO TRABALHO (0,5 mg/mL)

20 μL da solução estoque de IP + 980 µL de DPBS

Armazenar em freezer, no escuro.

2. FITC-PSA (FITC-PSA, Sigma, L-0770 – 2mg)

- SOLUÇÃO TRABALHO (100 μg/mL)

2 mg de FITC-PSA + 20 mL de DPBS + 10% de solução de azida de pódio 10%

Aliquotar e Armazenar a 4º C, no escuro

3. JC-1 (Molecular Probes, T-3168 – 5mg)

- Solução ESTOQUE (DMSO) – 1,53 mM

- SOLUÇÃO TRABALHO (DMSO) - 153 μM

Armazenar em freezer, no escuro.

ANEXO - 3

SETUP-HAMILTON THORNE BIOSCIENCES (Ultimate – Sperm Analyzer)

CARACTERÍSTICA	**AJUSTE**
Número de imagens adquiridas	30
Taxa de aquisição das imagens	60 Hz
Contraste mínimo da célula	50
Tamanho mínimo da célula	6 pixels
Contraste para células imóveis	30
Retilinearidade (STR), Limiar	60%
Valor de corte de VAP para células lentas	30,0 μm/
VAP mínimo para células progressivas	40,0 μ m/s
Valor de corte de VSL para células lentas	20,0 μm/s
Tamanho da célula	6 pixels
Intensidade da célula	80
Tamanho da cabeça estática	0,23 a 1,91
Intensidade da cabeça estática	0,56 a 1,20
Alongamento estático	8 a 92
Aumento	1,89
Freqüência de vídeo	60
Intensidade de iluminação	2203
Temperatura	37º C

ANEXO – 4

BIOXCELL ® (IMV Technologies, IVP do Brasil)

Composição química por litro (g/L):

- Tris ..... 2,30 g
- Citrato de sódio ..... 6,20 g
- Cloreto de potássio ..... 0,80 g
- Frutose ..... 1,20 g
- Monohidrato de Lactose ..... 0,80 g
- Glicina ..... 0,20 g
- Glicose Anidra ..... 0,20 g
- Taurina ..... 0,005 g
- Sulfato de Gentamicina ..... 0,24 g
- Tartrate de Tilosina ..... 0,33 g
- Lincospectina 100 ..... 0,383 g
- Glicerol ..... 40,20 g (31,87 mL)
- Hidrato de Cálcio Lactato ..... 0,70 g
- Lecitina de Soja ..... 1,50 g
- Monohidrato de àcido Cítrico ..... 2,50 g
- Água ultra pura ..... 0,065 L

  - Apresentação comercial: frasco com 100 mL (diluidor concentrado 5x)
  - Diluir com água ultra pura q.s.p para 500 mL
  - Após preparo manter congelado a -20ºC por até 4 meses
  - PH final ..... 6,8 a 7,3
  - Osmolaridade final ..... 1.250 a 1.450 mOs/Kg H_2O
  - Concentração final de Glicerol ..... ~ 3,19 % v/v

ANEXO – 5

Diluidor TRIS – Fração única (Gonzalez, 2004)

Ingredientes	Quantidade
Tris (tris(hidroximetil)aminometano)	**2,42 g**
Ácido cítrico P.A.	**1,36 g**
Frutose P.A.	**1,0 g**
Gema de ovo	**20 mL**
Glicerol P.A. 99,5%(Glicerina)	**7 mL (7% v/v)**
Penicilina G potássica	**0,028 g**
Água destilada deionizada q.s.p.	***q.s.p para 100 mL**

(*) q.s.p. – quantidade suficiente para completar o volume de 100 mL

P.A – Puro para Análise

Osmolaridade = 1432 mOs/Kg H_2O

Densidade do Glicerol : 1,2613 g/cm^3

ANEXO – 6

Morfologia espermática do sêmen fresco pré- diluição e criopreservação

Espermiograma segundo Blom (1973).

Espermiograma	**Morfologia espermática pré-criopreservação**											
Fazenda: EPAMIG - UBERABA	**EPAMIG - Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais**										Data: 24/04/2007	
Nº de Ordem:	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Nº Touro (identificação)	X	472	406	415	410	398	330	790	273	375	373	419
ASPECTOS MORFOLÓGICOS												
DEF. MAIORES (%)	**7%**	**15%**	**10%**	**16%**	**10%**	**3%**	**7%**	**19%**	**5%**	**9%**	**7%**	**9,0%**
Acrossoma	3	6	2	2	2	1	3	6		1	3	
Gota Cit. Proximal (GCP)	3	1	1	1				1		1		1
Subdesenvolvido												
Cabeça Isol. Patológica												
Delgado na Base		1		5	5			4		3	1	3
Piriforme			1		1			3		1		2
Pequena Anormal											0	
Contorno Anormal		5		7			1	3		1	1	1
Pouch Format. (diadema)					1				1			1
Teratológica (form. duplas)											1	
Peça Intermediária (PI)	1	2	6	1	1	2	3	2	4	2	1	1
Cau. Fort. Dob./Enr.												
Cauda Enr. Cabeça												
Outros												
DEF. MENORES (%)	**12%**	**6%**	**3%**	**3%**	**14%**	**14%**	**24%**	**8%**	**6%**	**15%**	**10%**	**12%**
Gota Cit. Distal (GCD)	5	2	2	2	13	7	24	4	3		1	
Cabeça Delgada										7	1	3
GCLP (perda menb. acr)												1
Cabeça Isol. Normal	4	1	1		1	1					1	1
Abax./Retro./Obliq.												
Cauda Dob./Enr.	3	3		1	1	6		4	3	8	7	7
TOTAL DEFEITOS (%)	**19%**	**21%**	**13%**	**19%**	**24%**	**17%**	**31%**	**27%**	**11%**	**24%**	**17%**	**21%**
ASPECTOS FÍSICOS												
Volume	12 ml	8 ml	12 ml	8 ml	10 ml	6 ml	12 ml	12 ml	9 ml	8 ml	9 ml	10 ml
Motilidade Total (%)	70	65	65	65	65	70	70	65	70	70	65	70
Vigor (1-5)	5	5	4	5	5	4	5	5	5	5	5	5
CONCENTRAÇÃO (x 10^6/ ml)	425	615	310	340	185	225	200	175	275	480	1230	345
Medidas												
CE	41,3	35,3	32,5	37,1	35	31,9	38	35,4	35,5	39,5	39,6	36,5
Comprimento	12,5	10	9,8	12	11,1	9,3	12,2	11,2	11	12,4	10,8	10,8
Largura	7,9	6,5	6,2	7,2	6,5	5,8	7,3	6,8	6	7,6	7,2	7,4

ANEXO – 7




Fotos dos equipamentos de criopreservação do sêmen portátil (modelo TK-3000®)






Fotos dos equipamentos e procedimentos de análise e criopreservação do sêmen




Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia - Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal - FMVZ-USP Campus de Pirassununga - SP

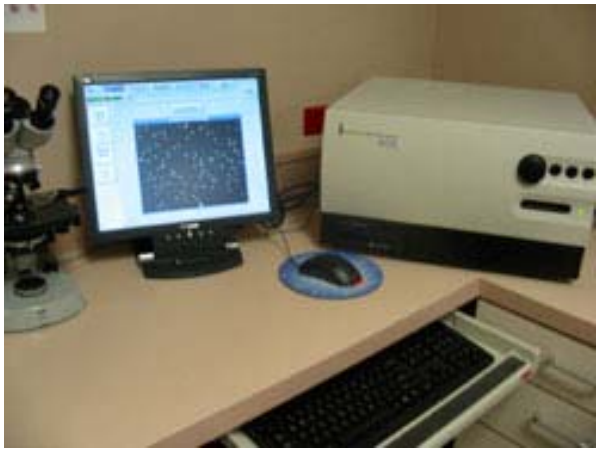


Foto do aparelho IVOS (Versão 12.3, Hamilton-Thorne Bioscience).

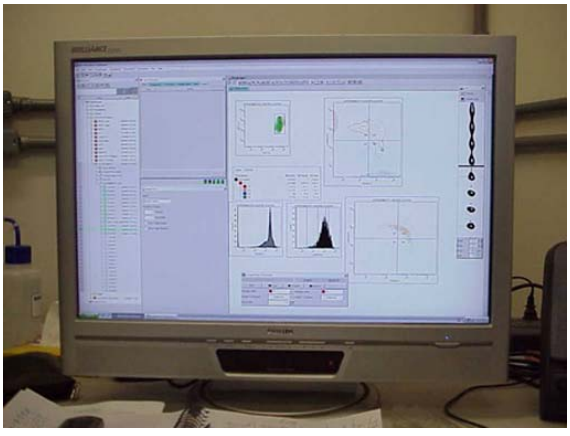



Foto do citômetro de fluxo da FMVZ-USP Campus de Pirassununga - SP