

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE ZOOTECNIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**DISSERTAÇÃO**

**Eficiência da congelação automatizada na viabilidade de  
sêmen bovino.**

**Wilson Franklim de Vasconcelos Filho**

**2010**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**EFICIÊNCIA DA CONGELAÇÃO AUTOMATIZADA NA  
VIABILIDADE DE SÊMEN BOVINO.**

**WILSON FRANKLIM DE VASCONCELOS FILHO**

*Sob a Orientação do Professor*  
**MARCO ROBERTO BOURG DE MELLO**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal.

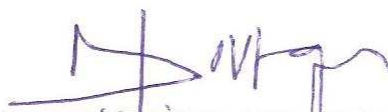
Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**WILSON FRANKLIM DE VASCONCELOS FILHO**

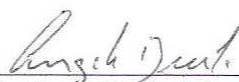
Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de Concentração em Produção Animal.

**DISSERTAÇÃO APROVADA EM 05/03/2010**



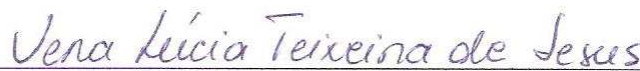
---

Marco Roberto Bourg de Mello. Dr. UFRRJ  
(Orientador)



---

Ângelo José Burla Dias. Dr. UENF



---

Vera Lúcia Teixeira de Jesus. Dr. UFRRJ

## AGRADECIMENTOS

- A Deus, pois está sempre comigo e tem cumprido suas promessas.
- Aos meus pais, Wilson e Vera, pelo apoio, incentivo e orações em todos os momentos da minha vida.
- Ao Prof. Marco Mello por ter sido paciente, ter confiado em mim e ter me passado conhecimentos que vão além da pesquisa.
- Às minhas irmãs Tatiany e Elen e seus respectivos esposos Ricardo e Leandro por terem sempre se preocupado comigo, sempre oferecendo ajuda.
- Aos amigos Marcus Aguiar, Paula Sant'ana e Raissa Mirella pelo companheirismo e por terem me ajudado muito tanto indireta quando diretamente nestes estudos.
- Aos meus sobrinhos Maria Clara e Matheus por serem uma motivação constante pra mim;
- Ao Departamento de Reprodução e Avaliação Animal do Instituto de Zootecnia, representado pelos seus professores, que muito me ajudaram com o decorrer da pesquisa;
- Ao órgão fornecedor da bolsa de estudos – REUNE;
- Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

## RESUMO

VASCONCELOS FILHO, W.F. **Eficiência da congelação automatizada na viabilidade de sêmen bovino.** 58 f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Zootecnia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2010.

Mesmo com os avanços tecnológicos no campo da inseminação artificial, ainda é grande o número de pessoas que realizam a congelação de sêmen de maneira manual. Esta técnica tem se mostrado viável, porém, é difícil padronizar as curvas de resfriamento e de congelação, uma vez que dependem da qualidade do material utilizado (vedação da geladeira, tipo de caixa de isopor, quantidade de gelo, nível de nitrogênio líquido e outros). Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da criopreservação de sêmen bovino utilizando duas técnicas de congelação (convencional e automatizada) sobre a motilidade, vigor e resistência térmica dos espermatozoides após a descongelação. O experimento foi elaborado em um período de 12 semanas, sendo dividido em duas partes, uma inicial de seis semanas onde foi utilizado o diluidor Tris-gema e uma segunda parte na qual o diluidor utilizado foi Citrato-gema. Foram utilizados três touros holandeses para coleta de sêmen semanal pelo método da vagina artificial. Após a coleta, foram avaliados: volume, motilidade, turbilhonamento, vigor e concentração espermática para determinação do número de doses. Após diluição, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 ml. Em seguida, as palhetas foram submetidas às técnicas de congelação convencional (uso de geladeira, vapor de nitrogênio e imersão em nitrogênio líquido) e automatizada (aparelho da Cryogen®). Após 24 horas as amostras foram descongeladas, reavaliadas e submetidas ao teste de termoresistência rápido (TTR). Os resultados foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis (análise de variância não paramétrica) com nível de significância de 5% com auxílio dos programas BioEstat 4 e Systat 11. Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as técnicas automatizada e manual para os dois diluidores testados, sendo a técnica automatizada a que apresentou melhores resultados para motilidade e vigor após a criopreservação e teste de resistência térmica. Desta forma, pode-se concluir que a técnica automatizada para congelação de sêmen bovino apresenta-se vantajosa e prática pois além de proporcionar melhores resultados, ela padroniza as curvas de refrigeração e de congelamento.

Palavras chaves: criopreservação, diluidores, automatizado.

## ABSTRACT

VASCONCELOS FILHO, W.F. **Efficiency of automated freezing on the viability of bovine semen.** [Eficiência da congelação automatizada na viabilidade de sêmen bovino]. 58 f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Zootecnia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2010.

Even with technological advances in the field of artificial insemination, there is a huge number of people freezing semen in a manual way. This technique has proven to be viable, however, it is difficult to standardize the cooling and freezing curves, since they depend on the quality of the material used (refrigerator sealing, type of cooler, liquid nitrogen level and other). Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of the cryopreservation of bovine semen using two freezing techniques (conventional and automated) on motility, vigor and heat resistance of the sperm after thawing. The experiment was developed over a period of 12 weeks, divided into two parts, an initial six weeks part where Tris-yolk extender was used and a second part in which the extender used was Citrate-yolk. Three Holstein bulls were used for weekly semen collection by artificial vagina method. After collection, were evaluated: volume, motility, mass motility and sperm concentration to find out the number of doses. After dilution, the semen was stored in straws of 0.5 ml. Then the straws were subjected to conventional freezing technique (use of refrigerator, nitrogen vapor and immersion in liquid nitrogen) and automated technique (machine from Cryogen ®). After 24 hours the samples were thawed, re-tested and underwent the quick thermoresistance test. The results were analyzed by Kruskal-Wallis analysis of variance (nonparametric) with a significance level of 5% with the aid of BioEstat 4 and Systat 11 PC-programs. There was significant difference ( $p < 0.05$ ) between automated and manual techniques for both extenders used, and the automated technique has presented the best results for motility and vigor after cryopreservation and thermoresistance test. Thus, we can conclude that the automated technique to freezing bovine semen has shown to be advantageous and practical because as well as providing better results, it standardizes cooling and freezing curves.

**Key words:** cryopreservation, extender, automated.

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2 - REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>05</b>
2.1 – Princípios da criopreservação de Espermatozoides.....	06
2.2 – Crioprotetores.....	08
2.2.1 – Crioprotetores não penetrantes.....	08
2.2.2 – Crioprotetores penetrantes.....	08
2.2.2.1 – Glicerol.....	09
2.3 – Métodos de Congelação.....	10
2.4 – Diluidores.....	12
2.4.1 – Tris-gema.....	14
2.4.2 – Gema-citrato.....	15
2.5 – Métodos para avaliação do sêmen congelado.....	15
2.5.1 – Teste de Termorresistência.....	16
2.5.2 – Avaliação da estrutura da cromatina espermática.....	17
2.5.3 – Avaliação espermática por citometria de fluxo.....	17
2.6 – Sêmen sexado.....	18
<b>3 – OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
3.1 – Geral.....	20
3.2 – Específicos.....	20
<b>4 - MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
4.1 – Animais e manejo.....	22
4.2 – Local e período.....	22
4.3 – Coleta de Sêmen.....	22
4.4 – Análise das amostras.....	23
4.4.1 – Características das amostras.....	23
4.4.1.1 – Aspecto.....	23
4.4.1.2 – Volume.....	24
4.4.2 – Características microscópicas.....	24
4.4.2.1 – Turbilhonamento.....	24
4.4.2.2 – Motilidade e vigor.....	25
4.4.2.3 – Concentração espermática.....	25
4.4.3 – Cálculo do número de doses.....	26
4.5 – Técnicas de congelação.....	26
4.5.1 – Congelação manual.....	26
4.5.2 – Congelação automatizada.....	28
4.6 – Descongelação das amostras.....	29
4.7 – Teste de Termoresistência Rápido.....	29
4.8 – Análise estatística.....	29
<b>5 – RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
5.1 – Sêmen Fresco.....	31
5.2 – Tris-gema.....	32
5.3 – Citrato-gema.....	32
5.4 – Touros.....	33
<b>6 – DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
6.1 – Diluidores.....	40
6.2 – Touros.....	41
6.3 – Teste de Termoresistência Rápido.....	41
<b>7 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>42</b>
<b>8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>44</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>57</b>

## **1 INTRODUÇÃO**

---



## 1 INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) é a técnica singular mais importante desenvolvida para o melhoramento genético dos animais, já que poucos reprodutores selecionados produzem sêmen suficiente para inseminar milhares de fêmeas anualmente (HAFEZ et al., 2004). Além disso, a IA é a tecnologia reprodutiva mais amplamente utilizada em rebanhos bovinos em todo o mundo. Sua importância na pecuária leiteira pode ser avaliada pelo fato de que todo o ganho em produção de leite, nos últimos 50 anos, deve-se apenas ao seu uso. No Brasil, o percentual de produtores que adotam a inseminação artificial em seus rebanhos ainda é limitado, observando-se consideráveis diferenças entre regiões e entre sistemas de produção de leite. Isso reflete, além de conjunturas econômicas, diferenças na percepção que os produtores têm sobre a viabilidade ou não da técnica.

Em 2008, o crescimento na venda de sêmen foi de 9,45% comparado ao ano anterior com mais de oito milhões de doses comercializadas. No acumulado dos últimos dez anos o crescimento chega a 47,35% sendo 67,54% de vendas das raças leiteiras. Do total comercializado em 2008, 59,19% são de genética nacional. No mesmo ano houve ainda crescimento nas exportações de 6,20%. Foram exportadas mais de 286.000 doses para os países como Angola, Argentina, Bolívia, Canadá, Colômbia, Equador, Paraguai, Peru, Uruguai e Venezuela (ASBIA, 2009).

As vantagens do uso da inseminação artificial são bem conhecidas. Hafez et al. (2004) e a ASBIA (2009) citam que entre elas, estão: (a) possibilita a larga expansão de reprodutores superiores de alto valor genético em qualquer tipo de criação; (b) facilita o teste de progênie em uma série de condições ambientais e de manejo, melhorando, assim, a acurácia da seleção; (c) leva ao melhoramento do desempenho e à potencialidade do rebanho nacional; (d) permite cruzamentos que modificam características de produção; (e) acelera a introdução de novos processos genéticos; (f) evita os custos e riscos da manutenção de touros na propriedade, assim como os gastos periódicos na aquisição de novos reprodutores; (g) possibilita a utilização de reprodutores já mortos, por meio de sêmen congelado, colaborando na preservação de linhagens seletas; (h) permite o uso de sêmen de reprodutores incapacitados ou oligospermicos; (i) elimina o risco de transmissão de doenças venéreas, como a tricomonose e a campilobacteriose, e reduz o risco da introdução de doenças infecto-contagiosas, como brucelose, leptospirose e IBR; (j) é de utilização essencial após a sincronização do cio em grandes grupos de animais; (k) permite que reprodutores com características desejáveis sejam

utilizados em acasalamentos genéticos específicos; (1) possibilita meios úteis de pesquisas dos muitos aspectos da fisiologia reprodutiva de machos e fêmeas.

Dessa forma, a utilização de sêmen congelado é indispensável para um bom programa de inseminação artificial, visto que a manipulação de sêmen fresco ou resfriado confere validade curta do material. O objetivo da congelação de sêmen é a produção de um banco de células espermáticas utilizadas para técnicas da reprodução, tendo a disposição um material sem prazo de validade, potencializando a eficiência na reprodução animal (AMIRAT et al., 2004). Todavia, o processo de criopreservação das células espermáticas resulta em diminuição da fertilidade quando comparada com o sêmen fresco. Este fato se dá pelos danos às organelas e membranas dos espermatozoides, induzindo também mudanças na capacitação espermática e reação acrossomal (GARNER et al., 2001; WATSON, 1995). A partir desse fato, os protocolos de congelação visam minimizar esses efeitos deletérios aos espermatozoides (KUMAR et al., 2003).

Quando sêmen congelado bovino foi testado pela primeira vez comercialmente, vários fatores foram considerados, como meios diluentes, taxa de resfriamento, concentração, tempo e método de adição do glicerol, métodos de envase e condições de congelação (FOOTE et al., 2002). Em função de ter atingido índices de congelabilidade e fertilidade considerados satisfatórios, poucas inovações vem sendo atribuídas na congelação de sêmen desta espécie.

A produção de leite e carne bovina, comparada com as demais espécies, tem mostrado índices muito elevados. Com isto em vista, qualquer melhora nos índices de produção resultarão num menor custo de produção, o que contribuirá para uma melhor rentabilidade na pecuária bovina.

Biotécnicas cada vez mais modernas vem sendo aplicadas garantindo avanço da reprodução animal nas diferentes espécies a partir do desenvolvimento de técnicas adequadas para preservação de sêmen (PAPA et al., 2000).

Durante trabalhos em campo, profissionais costumam utilizar materiais simples, como: caixas de isopor e gelo ou fazem uso de geladeiras da propriedade para realizar o resfriamento, e em seguida congelam em caixa de isopor com nitrogênio líquido. Apesar de essa técnica ter se mostrado viável, a padronização das curvas de resfriamento e de congelação são difíceis, uma vez que dependem da qualidade do material utilizado, como por exemplo, as condições e o tipo da caixa de isopor, quantidade de gelo, nível de nitrogênio líquido, vedação da geladeira, entre outros.

Equipamentos automatizados portáteis para a prática de congelação de sêmen têm sido desenvolvidos e chegam ao mercado com baixo custo. Esse tipo de sistema eletrônico permite

programar um ou vários tipos de curvas de resfriamento e de congelação, garantindo homogeneidade e padronização da curva utilizada.

Entretanto, para se obter sucesso após o processo de congelação e descongelação, é indispensável a adição de crioprotetor à solução diluidora. O crioprotetor é uma substância essencial para a congelação, exercendo função protetora as células espermáticas, sem a qual os espermatozoides não suportariam a variação de temperatura e morreriam logo no início do processo. No caso do sêmen bovino, o glicerol é o crioprotetor utilizado em predileção para os dois métodos de congelação, convencional e automatizado (POLGE et al., 1949).

Dessa forma, faz-se necessário a adição do crioprotetor ao sêmen em baixas temperaturas, mas não é o que ocorre quando se utiliza a técnica automatizada, embora fabricantes aleguem que a qualidade do sêmen congelado-descongelado não varie de uma técnica para a outra. Por outro lado, a padronização das curvas de resfriamento e congelação garantidas pelo sistema eletrônico parece ser uma vantagem considerável, sem levar em conta a praticidade no decorrer da técnica.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

---

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Princípios da Criopreservação de Espermatozóides

A moderna indústria bovina em todo mundo é baseada na utilização da inseminação artificial (IA) com sêmen congelado (AIRES et al., 2003). Todavia, o processo de criopreservação das células espermáticas resulta em diminuição da fertilidade quando comparada com o sêmen fresco. Mudança de temperatura e a formação e dissolução de cristais de gelo e suas conseqüências, são exemplos dos maiores estresses da criopreservação que promovem injúrias às organelas celulares (WATSON, 1995). Considerando isto, o meio diluente e crioprotetores são utilizados com o intuito de proteger os espermatozóides dos choques térmicos e osmóticos que ocorrem durante o processo de congelação (CASTELO et al., 2008). Como resultado dos danos causados, as células de mamíferos não sobrevivem a resfriamentos abaixo de  $-20^{\circ}\text{C}$ , a não ser que se utilize um crioprotetor (SZELL & SHELTON, 1986). Entretanto, o sucesso na concepção e nos benefícios econômicos desta técnica depende da viabilidade do sêmen criopreservado para fertilização do ovócito (WATSON, 1999).

A utilização de técnicas mais modernas, como por exemplo a citometria de fluxo, tem demonstrado a ocorrência de alterações no material genético das células espermáticas após o processo de congelação e descongelação. A integridade da estrutura da cromatina espermática tem sido amplamente estudada desde a década anterior (EVENSON *et al.*, 1980; EVENSON AND JOST, 1994).

Chernos & Martin (1989) avaliaram espermatozóides humanos após processo de criopreservação e não observaram alterações na frequência de cromossomos anormais ou diferença na proporção de cromossomos sexuais comparando as amostras antes e após o processamento.

Lançando mão desses resultados, Royere et al. (1996), avaliaram o efeito da criopreservação na cromatina espermática humana, utilizando a citofotometria pela coloração de Feulgen ou laranja de acridina. Inicialmente foi observado um grande grau de desnaturação do DNA em condições ácidas após o congelamento-descongelação, entretanto, também foi observado uma redução no acesso do corante ao DNA, sugerindo que a cromatina espermática estaria num estado de condensação além do normal. Foi sugerido então que essa condensação elevada possa estar relacionada com o atraso no início dos eventos de fertilização após testes comparativos com sêmen fresco.

A remoção de água das células antes de se proceder a sua congelação é, na verdade, um fator desejável. Se esta desidratação não ocorrer, grandes cristais de gelo se formarão intracelularmente danificando as estruturas de forma irreversível (CELEGHINI, 2005). Por outro lado, um efeito de solução exagerado também é prejudicial, pois a remoção excessiva de água das células proveniente de um aumento na concentração de soluto extracelular pela formação de cristais de gelo, levará a desnaturação de proteínas e conseqüente morte celular (SEIDEL Jr., 1986). Dessa forma, enquanto a congelação lenta evita a formação de grandes cristais de gelo intracelular, ela leva a um aumento dos danos por efeitos de solução. Portanto, a taxa ótima de congelação para um dado tecido depende de sua tolerância relativa ao dano causado pelos cristais de gelo e da toxicidade dos efeitos de solução (HAFEZ et al., 2004). A adição de crioprotetores intracelulares tais como glicerol e dimetilsulfóxido (DMSO) ao meio de congelação, resulta na congelação a temperaturas mais baixas. Isso provavelmente retarda a desidratação das células e os efeitos de solução deletérios resultantes, evitando, portanto, a formação de grandes cristais de gelo. Watson (2000) cita ainda que para obter melhores taxas de sobrevivência, deve ser utilizada uma rápida taxa de resfriamento entre 15 e 60°C/min.

Salamon & Maxwell (1995) e Suarez (1998) relatam que metade das células espermáticas em amostras normais são perdidas durante o processo de criopreservação, e conseqüentemente há necessidade de se utilizar um número maior de espermatozóides para uma IA com sêmen congelado quando comparado a amostras de sêmen fresco. Isso se dá pelo fato de que os processos de congelação e descongelação trazem como conseqüência danos a estrutura físico-química das células causando danos principalmente, a membrana, ao acrossoma, a motilidade progressiva e ao metabolismo para produção de energia (PICKETT et al., 1987). O estado funcional dos espermatozóides congelados e descongelados é examinado em base de resultados de testes funcionais e estruturais da competência espermática (WATSON, 1995). É indispensável que em uma amostra, após processo de congelação e descongelação, se tenha um número de espermatozóides suficientes e ainda que estes estejam em condições que permita a fecundação do óvulo. Daí se dá a importância da proteção exercida pelos crioprotetores e da técnica realizada de forma correta visando, assim, o tempo de sobrevivência das células espermáticas no trato reprodutivo da fêmea (VALCARCELL et al., 1996).

Os espermatozóides podem ser preservados por longos períodos em um estado de animação suspensa se forem capazes de suportar a criopreservação a temperaturas nas quais nenhuma

atividade biológica adicional ocorra. O nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  satisfaz essa condição (HAFEZ et al., 2004).

## **2.2 Crioprotetores**

Os crioprotetores são substâncias necessárias para a criopreservação de espermatozóides, pois protegem as células espermáticas contra os danos causados durante a congelação e a descongelação. Conforme resultados de estudos ao longo de décadas, muitos fatores podem afetar a sobrevivência dos espermatozóides, estes fatores incluem dentre outros a composição dos meios e os crioprotetores usados para congelação (LIU et al., 1998; GUTHRIE et al., 2002). Os agentes crioprotetores, de acordo com sua permeabilidade, podem ser classificados como agentes crioprotetores não penetrantes (extracelulares) e agentes crioprotetores penetrantes (intracelulares) (MAZUR, 1980). O coeficiente de permeabilidade de cada crioprotetor está relacionado diretamente com seu peso molecular. De maneira geral, quanto menor o peso molecular da substância maior será sua permeabilidade.

### **2.2.1 Crioprotetores não penetrantes**

O mecanismo de ação dos agentes crioprotetores não penetrantes baseia-se na proteção dos espermatozóides contra os efeitos osmóticos durante o processo de congelação, promovendo um meio hipertônico que induz a saída de água das células levando a desidratação, ou seja, eles agem no meio extracelular, reduzindo assim a possibilidade da formação de cristais de gelo intracelular. Estes são representados pelos açúcares (sacarose, trealose lactose, glicose), proteínas do leite e lipoproteínas da gema do ovo que atua ainda na estabilização de membranas (AMANN & PICKETT, 1987).

### **2.2.2 Crioprotetores penetrantes**

Os crioprotetores penetrantes são substâncias que tem a capacidade de proteção intracelular das células espermáticas (NASH, 1966). O mecanismo de ação destes crioprotetores baseia-se em estruturas que promovem ligações de hidrogênio com as moléculas da água. Estas ligações mudam a orientação da molécula da água nos cristais de gelo, criando um ambiente menos nocivo para as células (DALIMATA & GRAHOM, 1997).

Os crioprotetores penetrantes utilizados em meios diluentes para congelação de sêmen em animais domésticos são: os álcoois incluindo o etanol, etilenoglicol, glicerol, metanol e polietilenoglicol (DE LEEW et al., 1993) e também as amidas, incluindo a acetamida, formamida, lactamida e bem como o DMSO (JEYENDRAN & GRAHAM, 1980; ASHWOOD – SMITH, 1986; MEDEIROS et al., 2002). Dentre estes, sem dúvida nenhuma, o glicerol tem sido o crioprotetor de eleição para criopreservação do sêmen da maioria das espécies domésticas.

### 2.2.2.1 Glicerol

É considerado quimicamente um álcool que contém três grupos funcionais de hidroxilas que podem aceitar um hidrogênio da molécula de água em seis sítios diferentes e sua fórmula química é  $C_3H_5(OH)_3$  (GONZALEZ, 2004). Dentre algumas características biofísicas do Glicerol estão: peso molecular de 92,10 e gravidade específica de 1,25 g/cm<sup>3</sup> a 20°C. Seu número no catálogo da sigma Chemical é G-7757 (HAFEZ et al., 2004).

O glicerol tem sido o crioprotetor mais utilizado desde a sua descoberta em 1949, por Polge et al., sendo que seu efeito crioprotetor se relaciona à sua capacidade de ligação com a água e a baixa dissociação com sais, portanto, diminuindo a osmolaridade do meio de congelação. Estas propriedades são favorecidas por sua capacidade de atravessar facilmente a membrana celular, mantendo a osmolaridade interna e externa (POLGE et al., 1949).

Dentre os efeitos do Glicerol à membrana plasmática, pode-se citar: ligação com fosfolípidios reduzindo a fluidez da membrana, interagindo com proteínas e glicoproteínas e formando agrupamentos intramembrana; redução da capacidade elétrica provavelmente pela promoção de reorganizações, em grande escala, na estrutura de membrana que inclui a formação de junções semelhantes às junções Gap; formação de interdigitações dos folhetos da bicamada alterando a fluidez pela organização do interior das cadeias de ácidos graxos (PARKS & GRAHAM, 1992).

Se por um lado o glicerol age promovendo proteção às células, por outro, ele pode ser ligeiramente tóxico, o que torna indispensável um controle de sua concentração. Além disso, outros fatores podem aumentar o poder tóxico do mesmo. Taxa de resfriamento, velocidade de congelação, composição do diluidor, método de adição do glicerol e temperatura no momento da adição são outros fatores que aumentam sua toxicidade (FAHY, 1986; WOELDERS, 1997).



Os espermatozoides de bovinos são rotineiramente criopreservados utilizando 7% de glicerol como concentração ótima para diluidores à base de citrato-gema ou tris-gema tendo resultados aceitáveis (De LEEW et al. 1993), contudo, esta concentração é influenciada por outros componentes presentes no meio diluente (WOELDERS et al., 1997). As concentrações de glicerol para congelamento de sêmen bovino tem estado entre 0,25 M (2,25%) e 1 M (9%), sendo que esta última concentração tem mostrado toxicidade (FAHY, 1986). Esta variação das concentrações de glicerol foi citada por Watson (1979), onde descreve que a concentração ideal para a congelamento de sêmen pode variar dependendo da curva de congelamento, da presença dos componentes do meio diluente e da espécie em questão. O glicerol pode ser ligeiramente tóxico aos espermatozoides mesmo na concentração de 4% (FISER; FAIRFULL, 1984) e seu efeito prejudicial é menor quando sua adição é feita à temperaturas próximas a 0°C. A explicação possível desta toxicidade é o efeito osmótico imediato causado pela adição abrupta ao sêmen (MAZUR, 1985).

Dentre os efeitos tóxicos do glicerol, Becker et al (1977) e Hammerstedt & Graham (1992) citam mudanças nas estruturas citoplasmáticas devido ao aumento da viscosidade pelo glicerol intracelular, alteração da polimerização da tubulina, efeitos no balanço bioenergético e alteração direta nas proteínas da membrana plasmática.

Liu (1998) comparando os efeitos osmóticos no volume e na motilidade do espermatozoide bovino exposto a diferentes agentes crioprotetores, concluiu que o glicerol e 1,2-propanodiol penetram rapidamente no espermatozoide não afetando o volume e a motilidade espermática. Esta propriedade é benéfica ao espermatozoide por manter o volume de solução intracelular levando a uma regulação osmótica.

### **2.3 Métodos de Congelamento**

Existem basicamente dois métodos de congelamento de sêmen, o manual realizado com auxílio de um refrigerador e o automatizado pelo uso de aparelho programável que exerça todas as etapas de refrigeração e congelamento.

Durante o processamento da técnica manual existem duas frações de diluidor. Uma é a chamada fração 'A', composta por sêmen adicionado de solução diluente, e outra é a fração 'B', composta por crioprotetor intracelular adicionado de solução diluente. Métodos convencionais de congelamento em palhetas de 0,25 mL e 0,5 mL têm utilizado quantidades de 7% de glicerol como concentração ótima para diluidores à base citrato-gema ou tris-gema (De LEEW et al., 1993).

O Glicerol pode ser ligeiramente tóxico aos espermatozóides mesmo na concentração de 4% (FISER; FAIRFULL, 1984) e seu efeito prejudicial é menor quando sua adição é feita a temperaturas próximas a 0°C. A explicação possível desta toxicidade é o efeito osmótico imediato causado pela adição abrupta ao sêmen (MAZUR, 1980). Por esta razão que, durante o método convencional, se faz necessária a existência de duas frações de diluidor para que o crioprotetor seja adicionado ao sêmen a temperaturas mais baixas, na qual a toxicidade do crioprotetor às células espermáticas é menor, sendo realizado dentro de um refrigerador à 5°C após as duas frações terem permanecido na geladeira pelo período de uma hora. A fração 'B' é então dividida em três partes para ser adicionada gradualmente com intervalo de cinco minutos na fração 'A', evitando um choque às células espermáticas pela concentração do glicerol. Junta-se as frações, gota a gota, enquanto que, com um delicado movimento de rotação, auxilia-se mais intimamente a mistura dos dois líquidos (MIES FILHO, 1987). Após completa esta etapa do processo, se aguarda quatro horas para o período conhecido como tempo de glicerolização (tempo para que o glicerol possa agir nos espermatozóides) e só então é realizado o envase das doses nas palhetas dentro do refrigerador. Tem se então concluído a etapa de resfriamento.

No método manual, as palhetas geralmente são congeladas em vapor de nitrogênio líquido e estocadas a -196°C (POLGE et al., 1949). Devido à grande área de superfície da palheta e sua parede fina, a transferência de calor é rápida e o sêmen congela rapidamente, geralmente em poucos minutos. Porém, um processo de congelação muito rápido pode causar choque térmico e formação de cristais de gelo dentro das células. Por outro lado, a congelação lenta causa aumento na concentração de sais à medida que a água congela (WATSON, 2000). Esse aumento na pressão osmótica por um longo período de congelação lenta pode danificar as proteínas e lipoproteínas da célula espermática e do acrossomo (FISER; FAIRFULL, 1984). Dessa forma, é necessário que se mantenha uma velocidade de resfriamento adequada para que o processo não ocorra nem muito rapidamente nem muito lentamente (PICKETT et al., 1987)

Por outro lado, a técnica automatizada, que é realizada por um aparelho programável, exige a adição de crioprotetor ao sêmen ainda à temperatura ambiente, não existindo mais duas frações de diluidor e sim apenas uma. O envase em palhetas é realizado na bancada devidamente higienizada e à temperatura ambiente. Embora exista o inconveniente da toxicidade à temperatura ambiente, uma padronização da curva de resfriamento e de congelamento parece ser uma vantagem sobre a outra técnica, visto que durante a técnica manual essa padronização é difícil, uma vez que depende da qualidade do

material utilizado, como por exemplo, vedação da geladeira e suas condições internas, e ainda a possível ocorrência de falha humana entre outros. Além da padronização, a praticidade de se ter todas as etapas controladas por um aparelho se constitui em outra vantagem.

O aparelho programável realiza toda a curva de resfriamento de forma padronizada, respeitando a temperatura de 5°C para o tempo de glicerolização que dura quatro horas e meia. Quando completo esse período, o aparelho emite sinal sonoro indicando o momento de adicionar nitrogênio líquido em seu recipiente, iniciando a curva de congelamento. A temperatura mínima atingida é de -135°C na máquina, sendo necessário mergulhar as palhetas em nitrogênio líquido ao se atingir tal temperatura.

Além da taxa de resfriamento e a composição do diluidor, Graves (2007) destaca como itens importantes a adequada manutenção, tanto do sêmen em botijões criogênicos, como do equipamento de inseminação, além da correta manipulação do sêmen.

## **2.4 Diluidores**

O sêmen pode manter-se congelado por diversos anos, permanecendo potencialmente fecundante quando descongelado e utilizado em IA. No entanto, para que se obtenha sucesso com a IA é estritamente necessário o uso de um bom diluidor que contenha nutrientes como uma reserva de energia, sirva como tampão contrapondo as alterações do pH, mantenha a pressão osmótica e a concentração de eletrólitos dentro dos padrões fisiológicos do sêmen, previna o crescimento de bactérias, proteja a célula do choque térmico durante o processo de resfriamento, e possua crioprotetores que reduzam os danos às células espermáticas durante a congelação e posterior descongelação (SALISBURY et al., 1978; MIES FILHO, 1986; CONCANNON & BATTISTA, 1989; BART; OKO, 1992; FOOTE et al., 2002).

Em concordância, um rápido resfriamento de células espermáticas na ausência de diluidores leva aos danos tanto da membrana plasmática como acrossomal (BALL, 1998). 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 lipídeos da bicamada e alteração do estado funcional da membrana. Sabe-se que em sêmen bovino, a maior mudança de fase ocorre entre 5 a 15°C, intervalo de temperatura onde é produzida a injúria (AGCA; CRITSER, 2002; De LEEW et al.. 1990; WATSON, 2000).

Outro fator que afeta a qualidade do sêmen é a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estas possuem a propriedade de induzir a peroxidação dos lipídeos das membranas celulares de espermatozóides, contribuindo para redução da motilidade ou morte celular

espermática. Deste modo, o balanço entre a produção de radicais livres e sua detoxicação pode ser um importante fator para a sobrevivência espermática antes e após o processo de resfriamento (MENEZES et al., 2008).

Nesse sentido, tem sido sugerido o uso de antioxidantes aos diluidores, visando minimizar os efeitos da geração de ROS, destacando-se o uso da catalase, glutathione reduzida (GSH), glutathione peroxidase e vitamina E (BUCAK et al., 2008).

England (1993) cita que a gema de ovo é o componente de origem biológica mais largamente utilizado na composição dos diluidores para o sêmen. Este fato está relacionado às suas propriedades que permitem que a capacidade de fertilização do espermatozóide após o processo de congelação/descongelação se mantenha (THUN et al., 2002). Há décadas já se sabia a importância da gema de ovo no diluidor, sendo comprovada por Foote et al. (1960), o qual realizou um estudo retirando a gema de ovo de um diluidor, tendo como resultado uma diminuição significativa na motilidade espermática, porém, não se sabia ainda, ao certo, o motivo.

Thun et al. (2002) citam que o principal benefício da gema de ovo, especialmente das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) existentes, é prevenir a perda da membrana fosfolipídica aumentando a tolerância do espermatozóide ao processo de congelação. Amirat et al. (2004) estudaram o efeito destas lipoproteínas sobre as membranas do espermatozóide bovino, porém, não foi possível obter o conhecimento claro do mecanismo preciso pelo qual o LDL interage com a membrana espermática. Com o intuito de verificar se diferentes percentuais de gema de ovo influenciariam na qualidade final do sêmen bovino, Aguiar et al. (2007) testaram a gema de ovo nos percentuais de 5, 10, 15 e 20% em diluidor PBS e observaram que, variando o valor, não se altera a qualidade final do sêmen, por outro lado, a concentração mais baixa estudada apresenta a vantagem de permitir uma avaliação das características microscópicas sem interferência de sedimentos.

Outro componente que é indispensável se acrescentar ao diluidor é o antibiótico. Sua utilização visa principalmente evitar o contágio de doenças bacterianas para a fêmea após a IA, uma vez que a dose inseminante permanece em seu trato reprodutivo. Hafez (2004) descreveu que uma combinação de penicilina entre 50 e 100 UI/mL e estreptomicina entre 500 e 1.000 UI/mL proporciona um largo espectro de atividade antibacteriana. Miraglia et al. (2003), comparando a capacidade de quatro antibióticos, acrescidos ao diluidor gema-citrato, concluíram que a associação penicilina-estreptomicina apresentou os melhores resultados na inativação de leptospiras, mas houve 2,9% de cultivos positivos para leptospiras.

Amoxicilina, ceftiofur sódico e a combinação de ambos, nas concentrações de 1.000 µg/mL, não foram efetivos para inativar as leptospiras.

Além disso, cada espécie animal apresenta melhor resultado para determinado diluidor e crioprotetor. No intuito de preservar a qualidade espermática, é de suma importância conhecer as características fisiológicas espécies-específicas do sêmen. Evitando-se dessa forma uma queda na qualidade do material por utilizar diluidores e procedimentos desenvolvidos para bovinos no sêmen de animais de outras espécies (BARROS, 2007). As razões pelas quais um meio diluidor confere maior ou menor proteção aos espermatozóides devem-se ao fato de haver diferenças na composição da membrana espermática entre espécies, raças ou entre indivíduos da mesma espécie (HOLT, 2000).

O sêmen bovino geralmente é diluído com solução de gema-citrato, homogeneizado com leite integral, leite desnatado fresco ou liofilizado, leite de coco ou solução de lactose. O sêmen tem sido preservado com sucesso em diluidores baseados no tampão orgânico Tris (hidroximetil) aminometano (HAFEZ et al., 2004).

#### **2.4.1 Tris-gema**

É o meio mais utilizado comercialmente para bovinos devido aos ótimos resultados obtidos quanto à congelabilidade do sêmen e posterior motilidade ao descongelamento, frente aos outros meios diluidores. O diluente sintético Tris-gema contém como tampão o tris, glicose ou frutose como fonte de energia e gema de ovo para proteger a membrana contra o choque térmico (EVANS e MAXWELL, 1987).

A fórmula química do tampão não eletrolítico (tampão orgânico) TRIS é descrita por Mies Filho (1987), como  $C_4H_{11}O_3$ .

Viana (2003) em estudo comparando o diluidor Tris-gema ao diluidor leite desnatado-glicose em sêmen caprino, conclui que o diluidor tris-gema, preservou melhor a motilidade, vigor e patologia de acrossoma.

Estudando diluidores para sêmen bovino, Gonzalez (2004) observou que a criopreservação de sêmen com diluidor à base de tris-gema apresentou melhores resultados quando associado ao glicerol, como crioprotetor penetrante, do que quando associado ao etilenoglicol ou dimetilamida, pois o diluidor contendo glicerol preservou melhor a motilidade, vigor, função mitocondrial, integridade das membranas plasmáticas e acrossomal.

### **2.4.2 Citrato-gema**

O diluente sintético Gema-citrato constitui-se basicamente de citrato sódico, glicose ou frutose como fonte de energia e gema de ovo (EVANS e MAXWELL, 1987). O citrato de sódio atua como tampão no sêmen conservado em refrigeração por vários dias e como regulador do equilíbrio osmótico no sêmen preparado para o congelamento, em virtude de impedir o rápido ingresso do glicerol no espermatozóide (NAGASE, 1972). A importância da gema de ovo reside na proteção da membrana contra o choque térmico (acima de 0°C), mediante a lecitina e efeito energético mediante a glicose (MIES FILHO, 1987).

Karabinus et al. (1991) compararam os meios citrato-gema com os a base de leite evidenciando uma maior motilidade espermática pós-descongelamento no grupo congelado com diluidor de leite e uma maior crioproteção, preservação da cromatina espermática e integridade da membrana celular, do sêmen congelado com diluidor a base de citrato. Sugere-se na conclusão que a microcomposição dos dois meios (aminoácidos, lipídios...) são responsáveis pelas diferenças encontradas.

### **2.5 Métodos para Avaliação do Sêmen Congelado**

É bem conhecido que após o processo de congelamento e descongelamento, as células espermáticas sofrem danos em suas estruturas. Neste contexto, a necessidade de se ter em mãos vários métodos laboratoriais para avaliação do sêmen é indispensável, uma vez que até o presente momento, nenhum teste laboratorial isolado pode estimar este potencial. Estes em conjunto, podem ajudar a prever o potencial fecundante de uma amostra seminal. Podem então ser citadas as análises computadorizadas do movimento e morfologia espermáticos, composição do plasma seminal, integridade da membrana plasmática e acrossomal, função mitocondrial, desnaturação da cromatina, peroxidação das membranas espermáticas, entre outros (ARRUDA et al., 2007).

Dentre os componentes de uma célula, o material genético poderia ser dito como um dos mais importantes, visto que possui as informações genéticas indispensáveis para o seu desenvolvimento. Seguindo nesta linha, técnicas modernas que demonstram o grau de integridade do DNA (ácido desoxirribonucleico) das células espermáticas ganham sua devida importância. Arruda (2000) cita o uso de sondas fluorescentes na avaliação espermática, que vêm sendo utilizados isoladamente ou em combinação para determinar a integridade e a viabilidade celular. Alguns corantes fluorescentes específicos para DNA, por serem

impermeáveis às membranas intactas, coram apenas células com membrana plasmática lesada. As lecitinas fluorescinadas se ligam de forma específica a glicoconjugados presentes no acrossomo, e também têm sido utilizadas para avaliar integridade do acrossomo em diversas espécies. Essas características de marcar estruturas específicas das células e de detectar integridade estrutural ou funcionalidade de forma clara permitem que o uso de sondas fluorescentes ganhe sua devida importância na avaliação espermática (CELEGHINI, 2005).

Várias sondas fluorescentes podem ser utilizadas para a avaliação da integridade da membrana plasmática espermática, como o brometo de etídio (Halangk *et al.*, 1984), corantes supravitais Hoechst 33258 (H258), 33342 (H342) (Casey *et al.*, 1993; Maxwell *et al.*, 1997), SYBR-14 (Garner *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 1998) e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) (Harrison e Vickers, 1990; Peña *et al.*, 1998; Souza, 2001; Valcárcel *et al.*, 1994); todavia, o iodeto de propídio (PI) vem se destacando em pesquisas pela sua facilidade de preparação e aplicação da técnica, estabilidade e eficiência na avaliação da integridade da membrana, seja isoladamente ou associada a outro corante fluorescente para avaliar membrana plasmática. Esta sonda possui afinidade ao DNA e cora em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada (Arruda, 2000; Arruda *et al.*, 2003; Graham *et al.*, 1990; Maxwell *et al.*, 1997; Celeghini, 2005).

Já a aglutinina de *Pisum sativum* (PSA), quando conjugada a isotiocionato de fluoresceína (FITC), marca com sucesso o acrossomo espermático na cor verde amarelado, o que facilita a visualização e a identificação dos acrossomos lesados, sendo utilizado em espermatozoides humanos (Cross *et al.*, 1986; Mendoza *et al.*, 1992; Tesarik *et al.*, 1993), bovinos (Graham *et al.*, 1990; Arruda e Celeghini, 2003), eqüinos (Arruda, 2000; Arruda, 2003; Casey *et al.*, 1993; Farlin *et al.*, 1992; Celeghini *et al.*, 2004) e suínos (Mattioli *et al.*, 1996).

### **2.5.1 Teste de Termorresistência (TTR)**

O teste de termoresistência (TTR) foi proposto por Dimitropoulos (1967), para a avaliação do potencial de fertilidade das partidas de sêmen congelado de bovinos, sendo adaptado posteriormente para outras espécies. O teste consiste em submeter às amostras a um estresse térmico por um determinado período de tempo, sendo em seguida avaliado a motilidade e o vigor espermático. O TTR obteve grande aceitação, pois submete o sêmen à condições de temperatura semelhantes ao trato genital de fêmeas em estro.

Por alguns anos se acreditou possuir uma correlação positiva e altamente significativa dos valores obtidos no TTR com a fertilidade a campo frente aos testes realizados por Kozumplík

e Sosnová (1985). No entanto, estudo mais recente (SIQUEIRA et al. 2007) avaliou a relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática, como o TTR, e concluiu que não existe correlação entre eles, de modo que o presente teste nem sempre expressa na prática os seus valores obtidos.

### **2.5.2 Avaliação da estrutura da cromatina espermática**

A análise da estrutura da cromatina do espermatozóide (SCSA) é um método para se determinar a susceptibilidade do DNA espermático à desnaturação, a qual é relacionada à fertilidade. Através deste teste, pode se avaliar a relação do DNA simples (considerado anormal) e duplo-filamento (nativo) presente no espermatozóide. O resultado se dá através da fluorescência verde ou laranja emitida por cada espermatozóide em virtude do uso de uma sonda metacromática (laranja de acridina). A SCSA pode ser utilizada para avaliar a integridade do DNA no sêmen fresco, resfriado ou congelado (LOVE, 2005).

### **2.5.3 Avaliação espermática por citometria de fluxo**

Para o funcionamento adequado do espermatozóide é essencial que se tenha integridade na membrana plasmática. Diferentes métodos de avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal tem sido testados, entre estes testes podemos citar os que usam fluorocromos. Entretanto, existe uma vantagem considerável quando se faz o uso de sondas fluorescentes para a análise das organelas combinada com o uso da citometria de fluxo, uma vez que a citometria permite a análise de milhares de células por segundo quando comparado às análises por microscopia de fluorescência, na qual se avaliam apenas poucas centenas de células (PEÑA *et al.*, 1999). Diferentes sondas fluorescentes tem sido utilizadas, em conjunto a citometria de fluxo, para mensurar a viabilidade espermática de diferentes espécies (GARNER E JOHNSON, 1995; GRAHAM *et al.*, 1990; PAPAIOANNOU *et al.*, 1997).

Arruda et al. (2007) citam que além da análise da integridade das membrana plasmática e acrossomal a citometria de fluxo combinada ao uso de fluoróforos permite a avaliação do potencial de membrana mitocondrial, integridade do DNA, peroxidação lipídica, capacitação e reação acrossômica, apoptose, entre outros.



## 2.6 Sêmen Sexado

As vantagens no uso do sêmen sexado são diversas: melhor programação das populações do rebanho, maior ganho na produção de carne e leite, facilidade em direcionar reposição de matrizes, ganhos genéticos e redução de tempo na seleção de plantéis, melhor direcionamento nos testes de progênie, entre outros. Entretanto, o custo desse sêmen é maior do que o sêmen não sexado ou convencional, tornando necessária uma análise econômica prévia ao uso dessa tecnologia (LIMA, 2005).

O sêmen sexado para a produção de bovinos apresenta várias vantagens. No entanto, deve-se salientar as limitações, as quais muitas vezes limitam a utilização dessa tecnologia. Foi descrito que a técnica de citometria de fluxo induz a alterações na cromatina e membrana espermática, acelerando o processo de reação acrossômica no espermatozóide após a criopreservação, processo conhecido como pré-capacitação (MOCÉ et al., 2006; OLIVEIRA, 2007). Segundo Maxwell et al. (2004) e Mocé et al. (2006), o processo acarreta uma redução da sobrevivência do espermatozóide sexado. Para Mocé et al. (2006) esse fato justifica a deposição do sêmen próximo do local da fertilização, assim como no momento mais próximo possível à ovulação, podendo este fato constituir-se em solução objetivando o aumento das taxas de prenhez. Contudo mais pesquisas ainda são necessárias para elucidar tais dúvidas.

Meirelles et al. (2008) realizando um estudo comparativo da eficiência da inseminação artificial com sêmen sexado e sêmen convencional, demonstraram uma queda significativa na taxa de prenhez ao utilizar-se sêmen sexado. As taxas de nascimento ( $P < 0,05$ ) foram de 23% para o sêmen sexado e 46,45% para o convencional, gerando um aumento no custo do bezerro produzido com o sêmen sexado. Apesar da reduzida taxa de prenhez do sêmen sexado, a acurácia da sexagem observada no nascimento foi de 93,02%.

Sabe-se que além das alterações na membrana celular causadas pelo processamento da técnica, a concentração espermática do sêmen sexado comercializado em uma dose pelas empresas é significativamente inferior a do sêmen não sexado, residindo aí outra justificativa para a queda na fertilidade. Concluiu-se neste estudo que o sêmen sexado apresentou índices inferiores (menor taxa de nascimento e elevado custo/bezerro), porém a acurácia quanto à sexagem foi significativa, ao se comparar com o sêmen convencional.

## **OBJETIVOS**

---

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Geral**

- Avaliar a viabilidade de sêmen bovino criopreservado por diferentes métodos e diferentes diluidores.

### **3.2 Específicos**

- Avaliar o efeito das técnicas de congelação convencional e automatizada na viabilidade de sêmen bovino criopreservado.
- Avaliar o efeito dos diluidores TRIS-gema e Citrato-gema na congelação de sêmen bovino.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

---

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Animais e Manejo**

Foram utilizados três touros da raça Holandesa com idades entre 4 e 8 anos. Antes do início do experimento, amostras dos animais foram submetidas aos exames de Tuberculose, Brucelose, IBR, BVD e Leptospirose. Os animais eram mantidos confinados em baias individuais na maior parte do tempo, permanecendo em piquetes apenas na parte da manhã, entre as 7 e 10hs. As baias individuais eram de 3 X 3,5m, pé-direito com altura de 7 metros e 20cm de cama. Os animais eram alimentados com mistura de capim picado (Camerão + Braquiária), suplementados com cevada, farinha de trigo e sal mineral e água a vontade. Os animais foram vermifugados e amostras foram coletadas para exame de Brucelose e Tuberculose rotineiramente. Foi realizado ainda o controle de ectoparasitas. Antes do início do experimento houve um período de adaptação dos animais ao novo manejo de coleta de sêmen pelo período de dois meses. Eram realizadas uma coleta por semana com horários e dias da semana fixos.

### **4.2 Local e Período**

O experimento ocorreu entre o período de março a agosto de 2008 e foi realizado no Departamento de Reprodução e Avaliação Animal do Instituto de Zootecnia, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, na cidade de Seropédica, Rio de Janeiro.

### **4.3 - Coleta de Sêmen**

Foi realizada uma coleta de sêmen de cada touro por semana sempre em horário e dia fixos da semana. Antes da coleta do sêmen, os animais passavam por processo de higiene (externa e interna) que era realizado na seguinte seqüência: estímulo de micção, aparagem de pêlos do prepúcio (quando necessário), lavagem externa do prepúcio com água a temperatura ambiente, lavagem interna do prepúcio com solução salina à 37°C e secagem da região do prepúcio. Após esse processo o animal era direcionado e posicionado para a monta em um outro animal (manequim).

O método de coleta de sêmen escolhido para obtenção do material foi o da vagina artificial (VA). A VA era constituída por um tubo cilíndrico de borracha rígida (envoltório térmico), uma mucosa fina de borracha, um cone de borracha com paredes finas e um tubo graduado de coleta protegido da luz e do choque térmico. O espaço entre o tubo rígido e a mucosa fina era preenchido com água quente de modo a garantir uma temperatura de aproximadamente 45°C no momento da coleta.

Após o estímulo pré-coleta, constituído por três a cinco montas falsas com o animal contido, permitia-se que o touro saltasse sobre o animal-manequim. O estímulo pré-coleta foi realizado para aumentar o interesse do touro para a monta a fim de se obter um ejaculado de melhor qualidade.

No momento da monta, o responsável pela coleta desviava o pênis do animal para dentro da VA. Em contato com a superfície aquecida, o touro ejaculava dentro da VA. Depois da ejaculação, a VA era imediatamente colocada na vertical com o tubo coletor na extremidade de baixo. O sêmen era drenado para o tubo coletor, que então era removido e colocado em banho-maria, mantido a 37°C enquanto eram realizadas as análises das amostras.

#### **4.4 Análise das Amostras**

Todas as amostras dos três animais passaram por análises macro e microscópicas, realizadas sempre pelo mesmo avaliador, antes de se iniciar o processo de criopreservação. São as análises macroscópicas o aspecto, cor e o volume da amostra, são as microscópicas o turbilhonamento, a motilidade, o vigor e a concentração espermática. Estas análises são indispensáveis para o cálculo do número de doses para cada amostra. Além disso, todo material utilizado para estas análises, inclusive solução diluidora, eram mantidos em platina aquecida ou em banho-maria com temperatura entre de 37 e 40°C, a fim de evitar choque térmico nos espermatozóides.

##### **4.4.1 Características macroscópicas**

###### **4.4.1.1 Aspecto**

O aspecto foi o primeiro critério a ser avaliado, uma vez que um aspecto ruim já é suficiente para descartar a amostra. Na avaliação do aspecto se observava da possível presença de matérias anormais no ejaculado, como por exemplo, sangue, pus, pêlos, poeira ou, ainda,

outros contaminantes. Além disso, nos ruminantes, à simples vista se pode efetuar a valorização do ejaculado, de forma empírica, quanto à sua riqueza de espermatozóides. O aspecto cremoso (ou *marmóreo*) deve-se à grande concentração de células espermáticas, que aparecem no sêmen normal em movimentação ativa (MIES FILHO, 1987). Por outro lado, amostras translúcidas contêm poucos espermatozóides. De acordo com o aspecto, as amostras de sêmen coletadas foram classificadas em cremoso, leitoso ou aquoso. Só foram aproveitadas amostras com aspecto cremoso ou leitoso.

#### **4.4.1.2 Volume**

Este era facilmente avaliado, pois após o animal ter ejaculado, o sêmen era drenado para o tubo coletor graduado ainda na vagina artificial. Desta forma, bastava-se a observação no tubo.

O volume do ejaculado pode variar em virtude de vários fatores, como por exemplo: espécie animal, indivíduo, raça, número de ejaculações sucessivas, da alimentação que se submete o animal etc. Para touros, os limites em mililitros variam desde 0,5 até 14,0, sendo o mais comum entre 5,0 e 6,0. O volume era avaliado para ser utilizado no cálculo do número de doses.

#### **4.4.2 Características microscópicas**

Para a realização destas avaliações, foi necessário o uso de microscópio óptico de até 100X.

##### **4.4.2.1 Turbilhonamento**

O turbilhonamento dos espermatozóides é uma das principais características que devem ser levadas em conta no exame de um sêmen, para avaliação de sua capacidade fecundante. O sêmen bovino, quando examinado ao microscópio, mostra as ondas de espermatozóides formando verdadeiras cristas, que aparecem como linhas mais escuras, nos pontos em que encontram com as outras. São verdadeiros movimentos de massa que são avaliados de acordo com a velocidade ou intensidade de movimento. Essa avaliação era medida de 0 a 5, sendo zero quando não apresentava qualquer movimento e cinco quando o movimento era máximo. Não foram utilizadas amostras com turbilhonamento igual a 0.

O exame era realizado sobre lâmina em gota pendente, à temperatura de 37 a 40°C, uma vez que temperaturas mais baixas influenciam negativamente a atividade espermática.

#### **4.4.2.2 Motilidade e vigor**

Tanto motilidade total quanto vigor eram avaliados ao mesmo tempo. Era utilizada uma gota do diluidor (TRIS-gema ou Citrato-Gema) sobre lâmina. Sobre a gota era feito um risco em traço de sêmen com uma ponteira de pipeta previamente mergulhada no sêmen. Em seguida, uma lamínula cobria a mistura. A avaliação era realizada em temperatura entre 37 e 40°C.

A motilidade é caracterizada pelo número de espermatozóides que apresentam motilidade, ou seja, o número de células vivas, variando de 0 a 100%, de forma que com 0% não existiam células vivas e com 100% todas as células estavam vivas.

O vigor é caracterizado pela intensidade do batimento da cauda dos espermatozóides. Essa intensidade é avaliada de 0 a 5, era dito zero quando os espermatozóides não apresentavam qualquer batimento de cauda e cinco quando o batimento era máximo.

#### **4.4.2.3 Concentração espermática**

A concentração é uma determinação acurada do número de espermatozóides no ejaculado. Esta era determinada lançando-se mão de uma câmara de Neubauer, que é uma lâmina microscópica com câmaras traçadas com precisão. O número de espermatozóides por câmara era contado manualmente.

Antes de se preencher a câmara de Neubauer, era feita uma pré-diluição sendo retirados 20 µL de sêmen puro e diluídos em 4 mL de água (proporção de 1:200). Após a mistura, a câmara de Neubauer era então preenchida com o diluído, estando pronta para a contagem. Foram contados 5 quadrados da câmara de Neubauer, sendo que a somatória dos espermatozóides encontrados nestas 5 regiões, foi multiplicada por 5 (ajuste do número total de quadrados da câmara), por 10 (ajuste da altura da câmara) e finalmente por 200 (ajuste da pré-diluição). O número obtido representava o número de espermatozóides por milímetro cúbico (mm<sup>3</sup>) do ejaculado. Para transformar a concentração espermática em “número de espermatozóides por mililitros (sptz/mL)” tal valor era multiplicado ainda por 1000.



#### **4.4.3 Cálculo do número de doses**

Inicialmente, foi estipulado que se congelassem vinte doses de cada tratamento. Mas o cálculo do número de doses se fazia ainda necessário para que se tivesse a mesma concentração de células espermáticas em todas as palhetas de todas as amostras.

O cálculo era realizado da seguinte forma: o valor encontrado para concentração espermática na câmara de Neubauer foi convertido para número de espermatozóides por mililitros (sptz/mL). Em seguida, este valor era multiplicado pelo volume de sêmen obtido no momento da coleta, obtendo-se dessa forma o número total de células espermáticas no ejaculado (tanto células vivas quanto mortas). Posteriormente, este valor era reajustado a partir do percentual para motilidade (que representa o número de células vivas), encontrando-se então o número total de células vivas no ejaculado. Considerando uma média de morte de 50% das células após o processo de congelação e descongelação, esse novo valor era dividido por dois, de modo a ter um valor médio de células vivas após o processamento. Finalmente, este último valor era dividido por  $12 \times 10^6$ , pois é o número mínimo de espermatozóides por palheta que se foi estipulado pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), o que nos permitia ter o número de doses.

A partir do número de doses, se calculava a quantidade de diluidor necessário para que se tivesse o mesmo número de células em todas as palhetas. Para tal, levava-se em consideração que em cada palheta cabem 0,5ml. Dessa forma, o número de doses era multiplicado por 0,5. Era assim obtido o volume final (sêmen + diluidor).

#### **4.5 Técnicas de Congelamento**

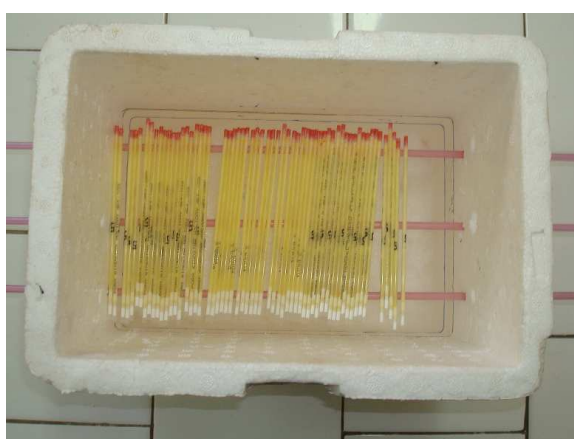
##### **4.5.1 Congelamento Manual**

Durante o processamento da técnica manual foram utilizados duas frações de diluidor. Uma é a chamada fração 'A', composta por sêmen adicionado de solução diluente, e outra é a fração 'B' composta por crioprotetor intracelular adicionado de solução diluente. A concentração de Glicerol foi considerada de 7% na solução final (após a mistura da fração 'A' com a fração 'B').

O Glicerol pode ser ligeiramente tóxico aos espermatozóides mesmo na concentração de 4% (FISER; FAIRFULL, 1984) e seu efeito prejudicial é menor quando sua adição é feita a temperaturas próximas a 0°C. Por esta razão que, durante o método convencional, se foi

necessário a existência de duas frações de diluidor para que o crioprotetor fosse adicionado ao sêmen a temperaturas mais baixas, de modo que tal mistura era realizada dentro de um refrigerador à aproximadamente 5°C após as duas frações terem permanecido dentro geladeira pelo período de uma hora. As amostras ficavam em fracos plásticos, fechados com tampa e eram mantidos sobre grades de metal no centro do refrigerador. A fração “B” era então dividida em três partes para ser adicionada gradualmente com intervalo de cinco minutos na fração “A”, evitando um choque osmótico às células espermáticas pela concentração do glicerol. Juntavam-se as frações, gota a gota, enquanto que, com um delicado movimento de rotação, auxiliava-se mais intimamente a mistura dos dois líquidos. Após completa esta etapa do processo, se aguardava quatro horas para o período conhecido como tempo de glicerolização (tempo para que o glicerol possa agir nos espermatozóides) e só então era realizado o envase das doses nas palhetas ainda dentro do refrigerador. Tinha se então concluído a etapa de resfriamento.

Iniciando o processo de congelação, as palhetas eram postas a cinco centímetros de altura do nível de nitrogênio líquido em caixa de isopor de modo a terem contato com o vapor de nitrogênio líquido (figura 1). As palhetas permaneciam nessa condição por vinte e cinco minutos. Posteriormente, quando concluído este tempo, as palhetas eram mergulhadas no nitrogênio líquido atingindo a temperatura final de -196°C. Por final, as palhetas eram organizadas em raques para serem armazenadas em canecos no botijão de nitrogênio líquido.



**Figura 1:** palhetas em contato com o vapor de nitrogênio líquido.

#### 4.5.2 Congelação automatizada

A técnica automatizada era realizada pelo aparelho programável modelo Cryogen® (figura 2) da empresa Neovet e exigia a adição de crioprotetor ao sêmen ainda à temperatura ambiente. Isso ocorria porque era o aparelho que realizava todas as curvas de resfriamento e congelamento, sendo necessário introduzir as doses já envasadas em palhetas na máquina desde o início. Dessa forma, não mais existiam duas frações de diluidor e sim apenas uma. O envase em palhetas era realizado na bancada devidamente higienizada e à temperatura ambiente.



**Figura 2:** Aparelho programável de congelação Cryogen®.

O aparelho programável realizava toda a curva de resfriamento de forma padronizada. Foi utilizado o protocolo “SX bovino 1” para a criopreservação das amostras. A temperatura inicial na máquina era de +32°C com uma taxa de refrigeração de -0,25°C/min até que fosse atingida a temperatura de +5°C. O tempo da estabilização da refrigeração (tempo de glicerolização) era de 240 minutos. Quando completo esse período, o aparelho emitia sinal sonoro indicando o momento de adicionar nitrogênio líquido em seu recipiente, iniciando a curva de congelação. A temperatura mínima atingida era de -135°C na máquina, sendo necessário mergulhar as palhetas em nitrogênio líquido ao se atingir tal temperatura. Isto para que as palhetas atingissem a temperatura final de -196°C. Por final, as palhetas eram organizadas em raques para serem armazenadas em botijão de nitrogênio líquido.

#### **4.6 Descongelamento das Amostras**

Duas palhetas de cada animal e de cada tratamento foram descongeladas em banho-maria a 37°C; depois de 30 segundos, removiam-se as duas palhetas que eram secadas em papel-toalha, porque a água poderia ser prejudicial aos espermatozoides. A extremidade de cada palheta era cortada com tesoura e o conteúdo de cada palheta era forçado a depositar-se uma gota da amostra sobre lâmina aquecida em 37°C e coberta por lamínula em mesma temperatura. Por final, eram avaliados vigor e motilidade em microscópio.

#### **4.7 Teste de termoresistência Rápido (TTR)**

O teste de termoresistência rápido consistia em manter as amostras a uma temperatura elevada após processo de congelação e descongelação. Eram avaliados o vigor e a motilidade após a descongelação em banho-maria por 30 segundos a 37°C. Posteriormente, as amostras eram postas em banho-maria a 45°C por 30 minutos e então avaliados o vigor e motilidade novamente.

#### **4.8 Análise Estatística**

Foram realizadas doze repetições, sendo seis partidas para cada diluidor. Foram criopreservadas vinte palhetas de cada tratamento para cada touro.

Os resultados das médias e seus respectivos erros padrão foram apresentados em tabelas. Foram testados os efeitos das técnicas de congelação e variação individual de cada animal frente a criopreservação sobre a motilidade e vigor espermáticos mediante análises de variância (ANOVA). O teste realizado foi o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Quando o principal efeito foi significativo, os valores foram comparados pelo teste de Dunn. A hipótese testada foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

## **5 RESULTADOS**

---

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Sêmen Fresco

Os resultados obtidos para as médias e erros padrão de motilidade e vigor espermático do sêmen fresco, da primeira até a sexta repetição, podem ser observados na tabela 1.

**Tabela 1:** Valores médios de motilidade (%) e vigor espermáticos (escores de 0 a 5) e erros padrão para sêmen bovino fresco, da primeira até a sexta repetição.

Tratamento	Até a sexta repetição			
	Motilidade	n	Vigor	n
Touro 1	78,33±1,66	6	3,83±0,16	6
Touro 2	76,67±2,10	6	3,83±0,16	6
Touro 3	70,00±2,58	6	3,42±0,20	6

Os resultados obtidos para as médias e erros padrão de motilidade e vigor espermático do sêmen fresco, da sétima até a décima segunda repetição, se apresentam na tabela 2.

**Tabela 2:** Valores médios de motilidade (%) e vigor espermáticos (escores de 0 a 5) e erros padrão para sêmen bovino fresco, da sétima até a última repetição.

Tratamento	Da sétima a décima segunda repetição			
	Motilidade	n	Vigor	n
Touro 1	80,00±0,00	6	4,00±0,00	6
Touro 2	65,00±2,24	6	2,67±0,21	6
Touro 3	70,00±0,00	6	3,00±0,26	6

## 5.2 Tris-gema

Os resultados encontrados para o diluidor Tris-gema estão apresentados na tabela 3. Comparando-se as técnicas manual e automatizada, foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) para motilidade e vigor espermático, tanto pós-congelamento (PC) quanto após a realização do teste de Termo-resistência Rápido (TTR). As melhores médias para motilidade e vigor ( $\pm$  erros padrão) foram encontradas na técnica automatizada pós-congelação ( $46,67 \pm 7,56$  e  $2,96 \pm 0,60$  para motilidade e vigor, respectivamente).

**Tabela 3:** Valores médios de motilidade (%) e vigor espermáticos (escores de 0 a 5) e erros padrão para sêmen bovino criopreservado utilizando-se as técnicas de congelação automatizada (Máquina) e manual (Geladeira) em diluidor Tris-gema.

Tratamento	TRIS-GEMA			
	Motilidade	n	Vigor	n
Maquina-PC	$46,67 \pm 7,56^a$	36	$2,96 \pm 0,60^a$	36
Geladeira-PC	$35,00 \pm 10,00^b$	36	$2,47 \pm 0,43^b$	36
Maquina-TTR	$18,08 \pm 10,25^c$	36	$1,79 \pm 0,57^c$	36
Geladeira-TTR	$9,92 \pm 8,68^d$	36	$1,28 \pm 0,74^d$	36

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

PC: pós-congelação

TTR: teste de termorresistência rápido

## 5.3 - Citrato-gema

Os resultados encontrados para o diluidor Tris-gema estão apresentados na tabela 4. Comparando-se as técnicas manual e automatizada, foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) para motilidade espermática, tanto no PC quanto após a realização do TTR. Por outro lado, vigor espermático apresentou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) apenas após realização do TTR, sendo não significativo ( $p > 0,05$ ) no PC. As melhores médias para motilidade e vigor ( $\pm$  erros padrão) foram encontradas na técnica

automatizada pós-congelação ( $43,33\pm 14,93$  e  $2,31\pm 0,62$  para motilidade e vigor, respectivamente).

**Tabela 4:** Valores médios de motilidade (%) e vigor espermáticos (escores de 0 a 5) e erros padrão para sêmen bovino criopreservado utilizando-se as técnicas de congelação automatizada (Máquina) e manual (Geladeira) em diluidor Citrato-gema.

Tratamento	CITRATO-GEMA			
	Motilidade	n	Vigor	n
Maquina-PC	$43,33\pm 14,93^a$	36	$2,31\pm 0,62^a$	36
Geladeira-PC	$31,53\pm 12,97^b$	36	$2,06\pm 0,58^a$	36
Maquina-TTR	$26,72\pm 12,47^c$	36	$1,83\pm 0,51^b$	36
Geladeira-TTR	$8,86\pm 0,08^d$	36	$1,11\pm 0,40^c$	36

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ( $p<0,05$ ).

PC: pós-congelação

TTR: teste de termorresistência rápido

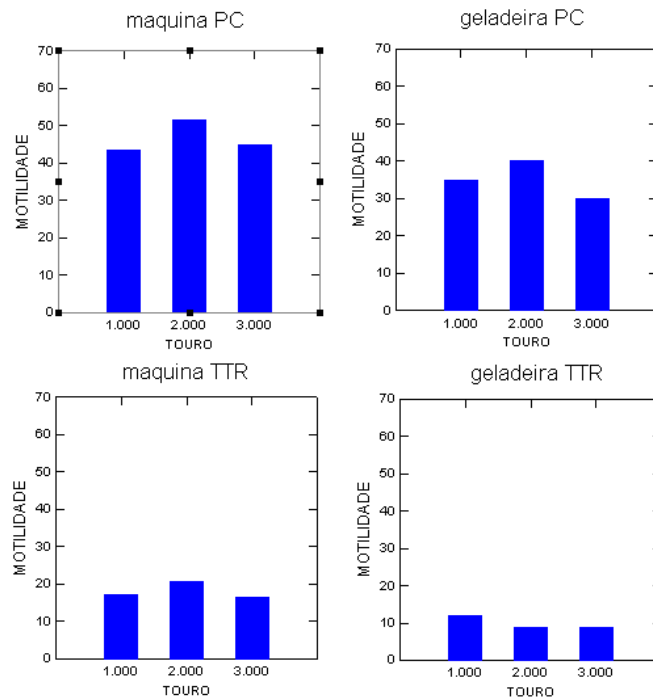
## 5.4 Touros

Avaliando os resultados que comparam as amostras de sêmen fresco dos touros entre si, foi possível observar que a partir da primeira repetição até a sexta (amostras usadas no processamento das duas técnicas de congelação com o diluidor Tris-gema) não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os valores de motilidade e vigor espermáticos entre os animais. Em contrapartida, comparando os resultados de motilidade e vigor do sêmen fresco dos três animais a partir da sétima até a última repetição (amostras que também foram utilizadas para as duas técnicas, porém utilizando o diluidor Citrato-gema) pode-se observar que houve diferença significativa ( $p<0,05$ ) em motilidade espermática entre touro 1 e touro 2 e entre touro 1 e touro 3.

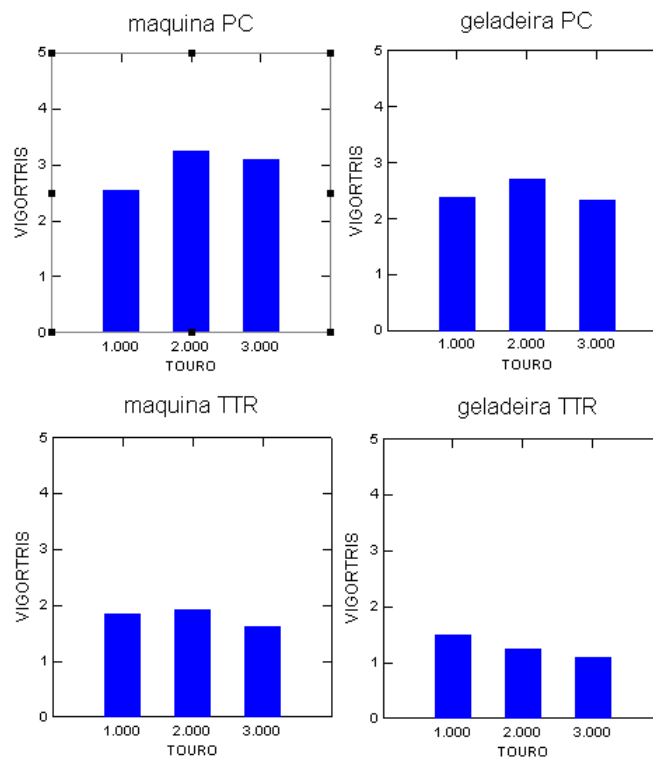
Os resultados médios para motilidade e vigor espermáticos encontrados por cada touro, nas seis primeiras repetições do experimento, nos quais foram utilizado o diluidor Tris-gema, pode ser observado nos gráficos 1 e 2. Não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os touros para qualquer tratamento com Tris-gema.



**Gráfico 1:** Valores médios para motilidade (%) de cada touro em cada tratamento quando utilizado o diluidor Tris-gema.

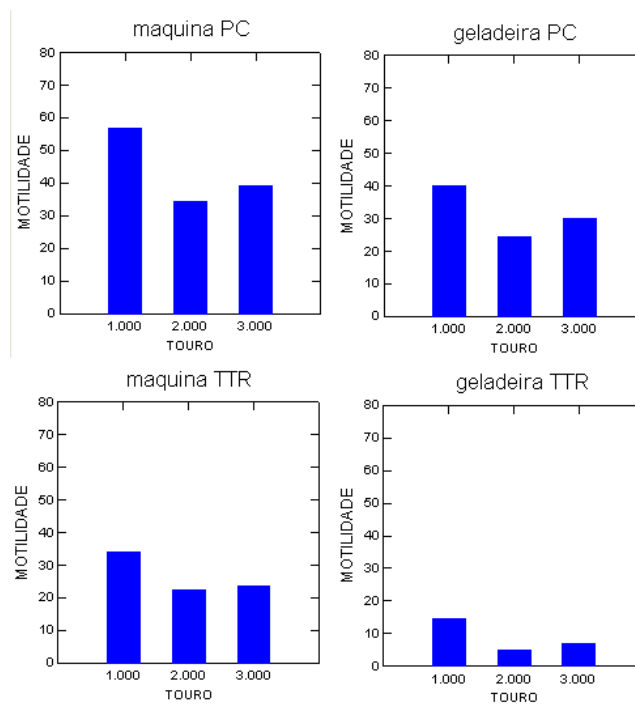


**Gráfico 2:** Valores médios para vigor (escores de 1 a 5) de cada touro em cada tratamento quando utilizado o diluidor Tris-gema.

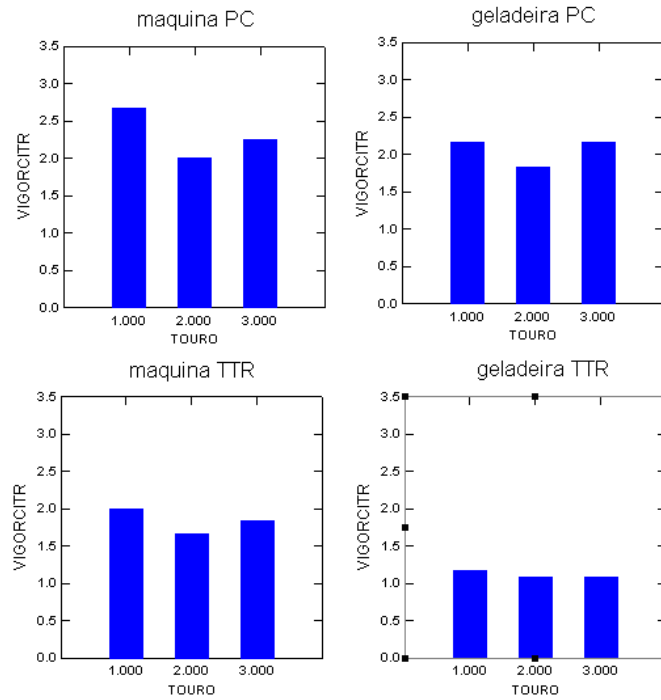


Os resultados para motilidade e vigor espermáticos encontrados por cada touro, a partir da sétima repetição, nas quais foram utilizados o diluidor Citrato-gema, podem ser observado nos gráficos 3 e 4. Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre a motilidade do sêmen fresco entre os touros, colaborando para uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ainda para motilidade no PC e motilidade no TTR, ambos com Citrato-gema. No entanto, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os valores encontrados para vigor fresco entre os três touros, nem mesmo no vigor após os tratamentos.

**Gráfico 3:** Valores médios para motilidade (%) de cada touro em cada tratamento quando utilizado o diluidor Citrato-gema.



**Gráfico 4:** Valores médios para vigor (escores de 1 a 5) de cada touro em cada tratamento quando utilizado o diluidor Citrato-gema.



## **6 DISCUSSÃO**

---

## 6 DISCUSSÃO

Com o surgimento da técnica automatizada para o congelamento de sêmen, surgiram questões em relação a sua eficácia. Nesse contexto, é possível encontrar literaturas que expressem seus resultados para diversas questões avaliando diferentes espécies animais. Mas se por um lado, existem muitos estudos levando em consideração diferentes crioprotetores, diluidores e até mesmo diferentes curvas de resfriamento e descongelação para a nova técnica, por outro, não são muitos os experimentos que comparam as técnicas de congelamento automatizada e manual entre elas.

Os resultados apresentados no presente estudo mostram que a qualidade do sêmen criopreservado pela técnica automatizada pode ser melhor que a obtida pela técnica manual. Observando os resultados, é possível perceber que as melhores médias para motilidade e vigor pós-congelamento neste experimento foram 46,67% e 2,96 respectivamente, para a técnica automatizada. Pode-se destacar ainda que além de bons resultados obtidos devido à padronização das curvas de resfriamento e congelamento, a praticidade de se ter todas as etapas controladas por um aparelho se constitui outra vantagem.

Gonzales (2004), estudando o efeito da criopreservação usando as técnicas manual e automatizada para sêmen bovino, não encontrou diferenças significativas entre as técnicas para os valores de motilidade e vigor espermático. Seus resultados provavelmente se diferem do presente estudo devido à diferença na metodologia entre ambos. A princípio, três fatores que se diferem podem ter contribuído para essa diferença de resultados, que são aparelhos programáveis diferentes, a raça e o número de animais que foram testados.

Levantando hipóteses, um aparelho mais recente, pode ser mais tecnologicamente desenvolvido de forma a apresentar melhores resultados. Em contrapartida, ao utilizar um maior número de animais, se obtém resultados mais ricos e que podem mudar a média de uma população para valores que podem ser mais reais.

Deve-se ainda ressaltar a importância do procedimento e o material utilizado para o desenvolver da técnica manual. Visto que durante esta técnica uma padronização da curva de resfriamento e congelamento é difícil, uma vez que depende da qualidade do material utilizado e habilidade do operador, resultados inferiores podem ser obtidos frente a uma vasta possibilidade de erros. Seguindo por este raciocínio, problemas como, por exemplo, vedação da geladeira e suas condições internas, e ainda a possível ocorrência de falha humana entre

outros, podem ter levado a um aumento na diferença das médias para motilidade e vigor dos espermatozoides de forma a tornar estas diferenças estatisticamente significativas.

Além do momento da adição de crioprotetor aos espermatozoides, a forma de adição também diferenciou nas duas técnicas. Na técnica manual, após a amostra atingir a temperatura de 5°C, a fração “B”, que continha o glicerol, era adicionada à fração “A” (diluidor + sêmen) em três etapas com intervalos de cinco minutos. De forma totalmente diferente, na técnica automatizada, não existiam duas frações do diluidor, mas apenas uma que já continha glicerol previamente diluído. Dessa maneira, na técnica automatizada, além do crioprotetor ser adicionado à temperatura ambiente, era adicionado também de uma só vez. Frente aos resultados apresentados, a adição de crioprotetor de forma direta ou fracionada parece não ter efeito sobre a qualidade do sêmen criopreservado.

Esses resultados concordam com os apresentados por Foote (1970), que utilizando o diluidor Tris-gema, constatou que não existe diferença em motilidade ou fertilidade quando o glicerol, previamente diluído no diluidor, era adicionado ao ejaculado em uma única etapa ou quando este era adicionado lentamente em quatro etapas à amostra quando esta atingia a temperatura de 5°C. O mesmo ocorreu para citrato-gema (FOOTE, 1970).

Loomis & Grahamb (2007) iniciam citando em seu estudo que crioprotetores agem na membrana plasmática alterando sua permeabilidade, de forma que à temperatura ambiente, facilitam a entrada de líquido para o interior da célula, a qual aumenta de volume causando danos as suas estruturas e organelas. A partir desses fatos, os autores decidiram testar dois diferentes protocolos em equinos. O primeiro, muito semelhante ao utilizado neste experimento para execução da técnica manual, só se diferenciava na execução de centrifugação da amostra à 4°C após o período de glicerolização, por se tratar de sêmen equino. O outro protocolo se difere pelo diluidor à base de leite (e não gema de ovo) e feito uma prévia redução da temperatura até 22°C e só então a adição de diluidor com crioprotetor à amostra, seguido por um período de 75 minutos para a glicerolização à 4°C antes de se iniciar a congelamento. Os resultados que Loomis & Grahamb (2007) obtiveram para a segunda técnica foi bem melhor, permitindo que 90% de 344 animais testados apresentassem amostras com um padrão aceitável para a IA comercial. Esses resultados sugerem que o crioprotetor não deve ser necessariamente adicionado a temperaturas mais baixas como 5 ou 4°C, sendo possível obter ótimos resultados mesmo quando essa adição é feita à temperaturas mais elevadas. Associando este resultado com os resultados aqui apresentados, pode-se imaginar que o tempo que as células espermáticas são submetidas ao contato com o crioprotetor, à

temperatura ambiente, quando não muito prolongado, pode não influenciar tão significativamente quando se tem outros fatores ao seu favor.

Em resumo, os resultados deste estudo salientam que embora existisse o inconveniente da toxicidade do crioprotetor à temperatura ambiente durante o processamento da técnica automatizada, uma padronização da curva de resfriamento e de congelamento pareceu ser uma vantagem sobre a outra técnica.

Outro fator que deve ser observado é a disposição das palhetas dentro do mecanismo de controle da congelação. Almquist & Wiggins (1973), Landa & Almquist (1979) e Gonzáles (2004) não encontraram diferenças para o parâmetro de motilidade quando da colocação das palhetas na posição vertical ou horizontal nas diferentes técnicas de congelação. De acordo com esses resultados, no presente estudo, o fato das palhetas terem sido postas na posição vertical durante a técnica automatizada parece não ter afetado a qualidade do sêmen congelado quando comparado com a técnica convencional em que as doses eram mantidas na posição horizontal, contrariamente à observação feita por Vishwanath & Shannon (2000).

## **6.1 Diluidores**

Foote (1970) estudando a motilidade espermática das amostras diluídas com Tris-gema e Citrato-gema após processo de congelação e descongelação, observou que os resultados para Tris-gema foram ligeiramente superior do que nas amostras que foram diluídas em Citrato-gema, mas não houve diferença na fertilidade. (FOOTE, 1970)

Frente às dificuldades, não foi possível testar para a mesma amostra os dois diluidores diferentes. Uma vez que uma possível sobrecarga de tarefas em laboratório, como por exemplo: preparo e manipulação de dois diluidores e duas técnicas para três touros ao mesmo tempo, poderiam comprometer a qualidade das amostras, que devem ser processadas o mais rápido possível após sua coleta. Dessa forma, foi acordado trabalhar com um diluidor por vez. Por esta razão, primeiramente foi avaliado o Tris-gema e só depois o Citrato-gema. A partir do exposto, uma comparação estatística de uma possível interferência dos diferentes diluidores nos parâmetros avaliados torna-se imprópria. Essa impossibilidade de comparação está relacionada ao fato das amostras para Tris-gema não serem as mesmas para Citrato-gema, uma vez que as amostras foram obtidas em repetições (ou partidas) diferentes. Evidenciando ainda mais esta dificuldade de comparação, pode-se citar que devido à diferença na época dos experimentos, para os dois diferentes diluidores, num segundo momento houve queda na

qualidade do ejaculado de dois touros decorrentes à alimentação com pastagem de qualidade inferior frente à estação do ano que estava instalada.

## **6.2 Touros**

Darin-Bennett e White (1977) citam que em diferentes espécies, a taxa de sobrevivência de espermatozoides após a criopreservação varia. Entretanto, essa variação ocorre ainda entre indivíduos da mesma espécie. Essa diferença na qualidade do material pós-processamento está relacionada com a bioquímica e o metabolismo espermático individual de cada animal. Pelo menos parte do motivo para esta susceptibilidade ligada à espécie é devido à composição lipídica das membranas espermáticas. (Darin-Bennett and White, 1977).

Por esta razão, neste experimento, os resultados de cada touro também foram avaliados individualmente. Os resultados obtidos durante a primeira parte do experimento, utilizando-se Tris-gema como diluidor, sugerem que os três animais respondem bem ao processo de criopreservação. Já num outro momento, quando se iniciou o uso do diluidor Citrato-gema, os resultados parecem não ser mais homogêneos. Mas estes valores se observam antes mesmo das amostras serem submetidas as diferentes técnicas de criopreservação. Dessa forma, a baixa qualidade do sêmen fresco para dois touros parece ter influenciado os resultados obtidos nessa segunda parte do experimento. Dessa forma, associar a queda na qualidade do sêmen criopreservado ao uso do diluidor Citrato-gema se constituiria um erro. Em resumo, estes resultados insatisfatórios para dois touros, podem estar associados, por exemplo, à baixa qualidade do capim frente à modificação da estação do ano ou algum outro tipo de estresse que os animais podem ter sido submetidos, e não ao uso de um diluidor diferente ou por uma característica individual própria do animal de baixa qualidade do sêmen após a criopreservação.

## **6.3 Teste de Termoresistência (TTR) Rápido**

Siqueira et al (2007) avaliou a relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática, como o TTR, e concluiu que não existe correlação entre eles, de modo que o presente teste nem sempre expressa na prática os valores obtidos. Dessa forma, os resultados do presente estudo apenas sugerem que as amostras provenientes da técnica automatizada apresentaram maior potencial de fertilidade por apresentarem melhores resultados para vigor e motilidade mesmo após o TTR.



## **7 CONCLUSÕES**

---

## 7 CONCLUSÕES

Frente aos resultados obtidos no presente estudo, pode se concluir que:

- A criopreservação de sêmen bovino pela técnica automatizada apresenta melhores resultados para motilidade e vigor após criopreservação e teste de termo-resistência rápido.
- Por esta razão, a técnica automatizada apresenta-se vantajosa e prática além de padronizar as curvas de refrigeração e de congelamento.

## **8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 8 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.

AGUIAR, P. R. L.; MORAES, J. B.; MALSCHITZKY, E.; SILVA, A. C. Criopreservação de sêmen bovino utilizando diluente à base de PBS com três diferentes percentuais de gema de ovo. **Veterinária em Foco**, Canoas, v. 5, n. 1, p. 44-50, 2007.

AIRES, V.A.; HINSCH, K.D.; SCHLOESSER, F.M. 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, p.269-279, 2003.

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. Principals of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa, **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-173, 1987.

AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GERARD, O. COURTENS, L.J.; ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl<sup>®</sup>, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, v. 61, p.895-907, 2004.

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

ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; PERES, K. R.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E. C. C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do

sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.1, p.8-16, jan./mar. 2007.

ARRUDA, R. P.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; LIU, I. K. M. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomo de espermatozóides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p.226- 227, 2003.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozóides bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p.230-231, 2003.

ASBIA (Associação Brasileira de Inseminação Artificial). Disponível em <[HTTP://www.asbia.org.br/](http://www.asbia.org.br/)>. Acesso em 7 de Julho de 2009.

ASHWOOD-SMITH, M.J. Mechanisms of cryoprotectant action. In: BOWLER, K., FULLER, B.J. **Temperature and animal cels**. Cambridge: The Co. of Biologists Ltd. P.395-406, 1986.

BALL, B. A. Na introduction to the use and implication of cryopreserved equine semen. In: EQUINE ASSISTED REPRODUCTIVE TECNOLOGY WORKSHOP, Davis, CA, 1998. **Proceedings**. Davis: School of Veterinary Medicine University of California, 1998. p. 25-43.

BARROS, P. M. H. Estresse oxidativo e integridade do DNA em sêmen resfriado de gato-domato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775). **Tese (doutorado) – Universidade de São Paulo**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. 120 f. 2007

BECKER, W.C., SENGER, P.L., AALSETH, E.P. Influence of glycerol levels, diluent and post-thaw temperature on motility and acrossomal maintenance in bovine semen frozen in plastic straws. **Journal of Animal Science**, v.44, p.1067-1071, 1977.

BUCAK, M.N, ATESSAHIN, A., YÜCE, A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. **Small Ruminant Research**, v.75, p.128-134, 2008.

CASEY, P. J.; HILLMAN, R. B.; ROBERTSON, K. R.; YUDIN, A. I.; LIU, I. K. M.; DROBINS, E. Z. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **Journal of Andrology**, v.14, p.289-297, 1993.

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

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) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A.F.C.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J. Simultaneous evaluation of the plasmatic, acrosomal and mitochondrial membranes in equine spermatozoa. **In: International Congress of Animal Reproduction**, 15, 2004, Porto Seguro. *Abstract ...* Belo Horizonte: CBRA, 2004. p.511. Resumo.

CHERNOS, J.E.; MARTIN, R.H. A cytogenetic investigation of the effects of cryopreservation on human sperm. **American Journal of Humam Genetics**, v. 45, p. 766–777, 1989.

CONCANNON, P.W., BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. IN: KIRK. **Current veterinary therapy – Small animal practice**, X. Philadelphia : Saunders, 1989. p.1247-1289.

CROSS, N. L.; MORALES, P.; OVERSTREET, J. W.; HANSON, F. W. Two simple methods for detecting acrosome – reacted human sperm . **Gamete Research**, v.15, p.213-226, 1986.

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

DARIN-BENNETT, A., WHITE, I.G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. **Cryobiology**, v.14, p.466–470, 1977.

De LEEW, F. E.; CHEN, H. C.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A. J. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boarsperm plasma membranes. **Cryobiology**, v. 27, p. 171-183, 1990.

De LEEW, F. E.; De LEEW, A. M.; DEN DAAS, J. H. G.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A.J. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. **Cryobiology**, v. 30, p. 32-44, 1993.

DIMITROPOULOS R. La signification du test de la thermorésistance dans l'appréciation de la valeur fécondant du sperma congelé. **Animal Medicin Veterinary**, v.4, p.215-24, 1967.

ENGLAND, J.; SCARLETT, J.; MEYERS-VALEN et al. Computer-assisted sperm analysis of canine spermatozoa motility measurements. **Theriogenology**, v. 40, p.725-733, 1993.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Salamon's. Artificial insemination of sheep and goats. **Butterworth**, Sydney 1987.

EVENSON, D.P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M.R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, v. 210, p.1131-1133, 1980.

EVENSON, D.P.; JOST, L. Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. **Methods Cell Biol**, v. 42, p. 159-175, 1994.

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

FARLIN, M. E.; JASKO, D. J.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Assessment of *Pisum sativum* agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction Development**, v.32, p.23-27, 1992.

FISER, P. S.; FAIRFULL, R. W. The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. **Cryobiology**, v. 21, p. 542-551, 1984.

FOOTE, R. H.; L. C. GRAY; YOUNG, D. C.; DUNN, H. O. Fertility of bull semen stored up to four days at 5°C in 20% egg yolk extenders. **Journal of Dairy Science**, v. 43, n. 9, p. 1330-1334, 1960.

FOOTE, R. H. Influence of extender, extension rate, and glycerolating technique on fertility of frozen bull semen. **Journal Dairy Science**, v. 53, p. 1478-1482, 1970.

FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, MT. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v. 71, p.13-23, 2002.

GARNER D. L.; JOHNSON L. A. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. **Biology of Reproduction**, v.53, p.276-284, 1995.

GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; GRAVANCE, C. G. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. **Theriogenology**, v. 56, p.31-40, 2001.

GARNER, D. L.; THOMAS, A. C.; GRAVANCE, C. G. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. **Reproduction of Domestic Animals**, v.34, p.399-404, 1999.

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

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, p.55-64, 1990.

GRAVES, W. M. Improving Artificial Insemination Techniques. Bulletin 1325, University of Georgia, Cooperative Extension. p.1-6, 2007.



GUTHRIE, H.D.; LIU, J.; CRITSER, J. K. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1811-1816, 2002.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. Editora Manole. 7ªed. p. 381-470. 2004.

HALANGK, W.; FRANK, K., BOHNENSACK, R. Zur bestimmung der menge intakter spermien in bullenejakulaten. *Arch Exp Vet Med*, v.38, p.105-114, 1984.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol. **Cryobiology**, v.29, p. 26-38, 1992.

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, p.343-352, 1990.

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

JEYENDRAN, R.S., GRAHAM, E.F. An evaluation of cryoprotective compounds on bovine spermatozoa. **Cryobiology**, v.17, p.458-464, 1980.

KARABINUS, D.S., EVENSON, D.P., KAPROTH, M.T. Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull sperm. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3836-48, 1991.

KOZUMPLÍK J., SOSNOVÁ J. The thermoresistance test of spermatozoa and fertility in bulls. **Veterinární Medicína**, v.30, p.385-92, 1985.

KUMAR, S.; MILLAR, J.D.; WATSON, P.F. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. **Cryobiology**, v.46, p.24-53, 2003.

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 acrossomal retention. **Journal of Animal Science**, v. 49, n. 5, p. 1190-1194, 1979.

LIMA, V.H. Como e quando a sexagem de espermatozoides faz a diferença. **DBO Genética – A revista de negócio da pecuária**. p. 38-40, Setembro, 2005.

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

LOOMIS, P. R., GRAHAM, J. K. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. **Animal Reproduction Science**, v.105, p.119–128, 2008.

LOVE, C. C. The sperm chromatin structure assay: A review of clinical applications. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.39-45, 2005.

MATTIOLI, M.; BARBONI, B.; LUCIDI, P.; SEREN, E. Identification of capacitation in boar spermatozoa by chortetracycline staining. **Theriogenology**, v.45, p.373-381, 1996.

MAXWELL, W.M.; EVANS, G.; HOLLINSHEAD, F.K.; BATHGATE, R.; DE GRAAF, S.P.; ERIKSSON, B.M.; et al. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. **Animal Reproduction Science**. v.82-83, p.79–95, 2004.

MAXWELL, W. M. C.; WELCH, G. R.; JOHNSON, L. A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction, Fertility and Development**, v.8, p.1165-1178, 1997.

MAZUR, P. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. In: **International Congress on Animal Reproduction and AI**. v.2, 99-114, 1980.

MAZUR, P. Basic concepts in freezing cells. In: **International Conference on Deep Freezing of Boar Semen**. Uppsala, p. 25-27, 1985.

MEDEIROS, A.S.L., CARMO, M.T., GOMES, G.M.; et al. Criopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**. V.58, p.273-276, 2002.

MEIRELLES, C.; FARIA, V.R.; SOUZA, A.B.; WEISS, R.R.; SEGUI, M.S.; KOZICKI, L.E. Eficiência da inseminação artificial com sêmen sexado bovino: Aspectos de viabilidade reprodutiva e econômica. **Archives of Veterinary Science**, v.13, n.2, p.98-103, 2008.

MENDOZA, C.; CARRERAS, A.; MOOS, J.; TESARIK, J. Distinction between true acrossome reaction and degenerative acrossome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.95, p.755-763, 1992.

MENEZES, E. S. B.; CAVALCANTE, J. M. M.; BRASIL, O. O.; SOUZA, D. F. R.; ASSIS NETO, E. T.; SILVA JÚNIOR, J. B.; SALGUEIRO, C. C. M. ; NUNES, J. F. Uso da N-acetilcisteína na conservação de sêmen ovino a 4oC: resultados preliminares. **In: 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, 2008, Gramado-RS. Anais do 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2008.

MIES FILHO, A. **Inseminação Artificial**. Editora Sulina. 6ª ed., v. 2, p. 750, Porto Alegre, 1987.

MIRAGLIA, F.; MORAIS, Z. M.; CORTEZ, A.; MELVILLE, P. A.; MARVULLO, M. F. V.; RICHTZENHAIN, L. J.; VISINTIN, J. A.; VASCONCELLOS, S. A. Comparison of four antibiotics for inactivating leptospores in bull semen diluted in egg yolk extender and experimentally inoculated with *Leptospira santarosai* serovar Guaricura. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 147-151, 2003.

MOCÉ, E.; GRAHAM, J.K.; SCHENK, J.L. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrossome reaction. **Theriogenology**, v.66, p.929-936, 2006.

NAGASE, H. Scientific and technological Background on pelet freezing of bull semen. **Riproduzione Animale e Fecodazione Artificiale**. Edagricole, p. 189-205, 1972.

NASH, T. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. In: MERYMAN, H.T., **Cryobiology**, New York: Academic Press. P.179-210, 1966.

NIMBULKAR, M.V.; CHAUHAN, V.P.; HONMONDE, J. Preservation of goat semen at ambient temperatures.. In: **International Conference on Goats**, 1982. Tuckson. Proceedings. Tuckson: Dairy Goat Journal Publication, p.285, 1982.

OLIVEIRA, K. M. Efeito do processo de sexagem de sêmen por citometria de fluxo e criopreservação sobre a morfometria da cabeça de espermatozoides e estabilidade de cromatina. 2007. 58f. **Tese (mestrado). Faculdade de Medicina veterinária, Universidade Federal de Uberlândia**, Uberlândia, 2007.

PAPA, F.O., ZAHN, F.S., DELL'AQUA Jr., et al. Utilização do diluente MP50 para criopreservação de sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. V. 26, p. 184-191, 2002.

PAPAIOANNOU K. Z.; MURPHY R. P.; MONKS R. S.; HYNES N.; RYAN M. P.; BOLAND M.P.; ROCHE J. F. Assessment of viability and mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining and flow cytometry. **Theriogenology**, v.48, p.299-312, 1997.

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

PEÑA, A. L.; JOHANNISSON, A.; LINDE-FORSBERG, C. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. **Theriogenology**, v.52, p.965-980, 1999.

PEÑA, A. L.; QUINTELA, L. A.; HERRADÓN, P. G. Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. **Theriogenology**, v.50, p.1211-1220, 1998.

PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L.; MACKINNON, A. O. Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination. Fort Collins, CO: Colorado State University, Animal Reproduction Laboratory, 1987.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKERS, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature** (London), v.164,p.666, 1949.

ROYERE, D.; BARTHELEMY, C.; HAMAMAH, S.; LANSAC J. Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review. **Human Reproduction Update**, v. 2, n. 6 p. 553–559, 1996.

SAHNI, K.L. Practical aspect of artificial insemination of goats in India. In: **International Conference on Goats**, 4, 1987. Brasília. Proceedings. Brasília: EMBRAPA-DTC, p.549-569, 1987.

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, p. 1-36, 1995.

SIQUEIRA, J. B., GUIMARÃES, J. D., COSTA, E. P., HENRY, M., TORRES, C. A. A., SILVA, M. V. G. B., SILVEIRA, T. S. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.2, p.387-395, 2007.

SOUZA, N. L. Avaliação de técnicas para determinar a viabilidade e a integridade do acrossomo de espermatozoides criopreservados eqüinos. 2001. 76p. **Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2001.

SUAREZ, S.S. The oviductal sperm reservoir mammals; mechanisms of formation. **Biology of Reproduction**, v.58, p.1105-1107, 1998.

SZELL, S.; SHELTON, J.N. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.78, p.699-703, 1986.

TESARIK, J.; MENDOZA, C, CARRERAS, A. Fast acrosome reaction measure: a highly sensitive method for evaluating stimulus-induced acrosome reaction. **Fertility and Sterility**, v.9, p.424-430, 1993.

THOMAS, C. A.; GANER, D. L.; DEJARNETE, J. M.; MARSHALL, C. E. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v.58, 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, p.1087-94, 2002.

VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M. A.; PÉREZ, L.; MOSES, D.F.; BALDASSARRE, H. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.41, p.483-89, 1994.

VALCARCEL, A., HERAS, M.A., MOSES, D.F. et al. Comparison between Sephadex G-10 and percoll for preparation of normospermic, asthenospermic and frozen/thawed ran semen. **Animal Reproduction Science**, v.41, p.215-224, 1996.

VIANA, A. K. D. S. Avaliação *in vitro* do sêmen caprino resfriado a 4°C em dois métodos e dois tipos de diluidores. 2003. 34p. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Tropical)** - Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2003.

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

WATSON, P.F. The preservation of sêmen in mammals. In: FINN, C.A. Oxford reviews of reproductive biology. **New York: Oxford University Press**. 1, 283-330, 1979.

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

WATSON , P.F. Cooling of spermatozoa and fertility capacity. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, p. 135-140,1999.

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

WOELDERS, H., MATHIJS, A., ENGEL, B. Effects of trehalose, and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intractness of sperm after freezing and thawing. **Cryobiology**, v.35, p.93-105, 1997.





## ANEXOS

**Solução Mãe para Tris-gema**

Tris	9,01g
Ac. Cítrico	5,6g
Frutose	3,72g
Água destilada	250ml

**Tris-gema: Fração 'A' do diluidor para geladeira**

Solução Mãe	40ml
Antibiótico (estreptomicina)	0,03g
gema	10ml

**Tris-gema: Fração 'B' do diluidor para geladeira**

Solução Mãe	33,6ml
Glicerol	6,4ml
Antibiótico (estreptomicina)	0,03g
gema	10ml

**Tris-gema: para máquina**

Solução Mãe	73,6ml
Glicerol	6,4g
Antibiótico (estreptomicina)	0,06g
Gema	20ml

**Solução Citrato de Sódio 2,94%**

Água destilada	150ml
Citrato de sódio	4,41g

**Citrato-gema: Fração 'A' para geladeira**

Solução Citrato de Sódio 2,94%	120ml
Gema	30ml

**Citrato-gema: Fração 'B' para geladeira**

Fração 'A' do Citrato-gema	44ml
Glicerol	6ml

**Citrato-gema: para máquina**

Fração 'A' do Citrato-gema	47ml
Glicerol	3ml