

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**VALIDAÇÃO DE SISTEMA AUTOMATIZADO DE
REFRIGERAÇÃO E CONGELAÇÃO DE SÊMEN
OVINO**

LEANDRO RODELLO

BOTUCATU – SP

Junho 2006

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**VALIDAÇÃO DE SISTEMA AUTOMATIZADO DE
REFRIGERAÇÃO E CONGELAÇÃO DE SÊMEN
OVINO**

LEANDRO RODELLO

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Estadual Paulista – UNESP,
Campus de Botucatu, para obtenção do
título de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Reprodução Animal

Orientador: Prof. Adj. Sony Dimas Bicudo

BOTUCATU – SP

Junho 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Rodello, Leandro.

Validação de sistema automatizado de refrigeração e congelamento de sêmen ovino / Leandro Rodello. – Botucatu: [s.n.], 2006.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2006.

Orientador: Prof. Adj. Sony Dimas Bicudo.

Assunto CAPES: 50504002

1. Espermatozóide. 2. Ovino – Recursos do germoplasma – Criopreservação. 3. Sêmen.

CDD 579

Palavras chave: Criopreservação; Sêmen ovino; Sistema automatizado; Espermatozóide.

Esta dissertação é dedicada ...

A DEUS.

A vocês, queridos pais e querida Dindinha, que por amor dedicaram da vida os melhores momentos, para tornarem possível mais este passo de minha vida.

E como foram importantes suas palavras de estímulo, frente por vezes, ao nosso desânimo pelo esforço diário!

As suas preocupações com o nosso cansaço, a nossa alegria se refletiam em sua face que estampava um sorriso maravilhoso.

Vocês foram à força que me impulsionou, fazendo acreditar que a realização do sonho era possível. A vocês pertence boa parte dessa vitória. Minha eterna gratidão.

A você, Priscilla, minha adorada esposa que sabe minha maneira única de te amar. A tua presença, tua companhia, teu sorriso, e as tuas palavras, foram expressão de profundo amor.

Muito obrigado a você que encheu de ternura meu coração, fizeste-me entender que o amor é irmão gêmeo da dor, pois o teu estímulo e carinho foram às armas desta vitória. A você minha amada... Eu te amo!!!!

Aos meus irmãos Beto e Neliane, que compartilharam das alegrias e dificuldades e sempre incentivando o desenvolvimento desta dissertação. Meu muito obrigado amo vocês.

Ao meu avô Roque que sempre preocupado, compartilhava de sua aposentadoria para proporcionar conforto para que a dissertação fosse elaborada. A avó Margarida (*in memoriam*) está sempre comigo.

À minha sogra Olga e meu sogro Gerson, pelo carinho, incentivo e apoio na realização deste experimento.

Ao meu querido filho João Vitor que chegou para encher meu coração de alegria. Eu te amo.

Ao meu orientador Prof. Sony Dimas Bicudo que acreditou em mim, mostrando a sua confiança para a elaboração deste trabalho. Mostrou-se amigo e preocupado com meus interesses. Sua simplicidade e sabedoria tornaram-se um exemplo a seguir, meu respeito e eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao curso de Pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ-RARV UNESP-Botucatu-SP pela oportunidade oferecida para realização deste experimento.

À seção de Pós-graduação FMVZ-UNESP-Botucatu-SP, Denise, Maria e Regina pela simpatia com que sempre me atenderam.

À Professora Lídia Raquel de Carvalho do Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências, UNESP-Botucatu-SP, pelas orientações e análises estatísticas.

Ao Médico Veterinário e criador de ovinos Santa Inês André Camargo Assumpção pela gentileza em ceder seus animais para a realização deste trabalho.

Ao Engenheiro Carlos Carvalho Motta que gentilmente ceder-nos a máquina de congelação, sem o qual este experimento não teria sido idealizado e realizado.

À Médica Veterinária e criadora de ovinos da raça Santa Inês Carmen Cecilia Sicherle e seu marido Francesco Sicherle por disponibilizarem os reprodutores a cada pedido.

Ao amigo e orientador do curso de Residência Professor Carlos Antonio de Miranda Bomfim por ter dado a oportunidade em conhecer o Prof. Sony e pelo companheirismo desde da residência da UNESP de Araçatuba até os dias de hoje.

Ao Professor Carlos Roberto Teixeira pela gentileza de ceder os reprodutores para a realização deste experimento.

Ao amigo e companheiro de pós-graduação Hymerson da Costa Azevedo pela imensa ajuda nos momentos de colheita e processamento dos ejaculados e pelos momentos de conversa e troca de idéias.

Ao Professor Frederico Ozanam Papa pelas trocas de informações e orientações na utilização dos equipamentos do CERAN.

Aos amigos André e José Luis pelos momentos de diversão e apoio durante o convívio na república.

Ao amigo Daniel Bartoli de Sousa pelos ensinamentos e orientações no uso da Análise Computadorizada e na técnica do preparo do meio diluidor e pelas longas conversas e troca de experiência.

As amigas e companheiros de Laboratório Carmen Cecília Sicherle, Marciane Maia Silva, Renata Elisa Green e Sylvia Bonci de Oliveira pela amizade, convívio e colaboração na execução deste trabalho.

Aos estagiários João Brotos, Ana Karine, Daniela, Marina e Rafael que passaram pelo Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, pela ajuda na execução do trabalho.

Aos colegas de pós-graduação Edmilson (Edão), João, Adriano, Victor (Vitão), Marilú, Karina, Edson (Edinho), Juliana, Carla Moya, Gustavo, Alexandre, Viviane Chirinéia, Fabiana, Maria Isabel (Bel), Cristiane (Cris Baiana), Ana Izabel, Cristiane (Purguenta), Braz, Jorge, Cely, Yan, Luciana Leal, Danilas, Rafael Satrapa, Antonio Silvio (Coruja), Márcio, José Dell'aqua, Camila, Cláudia e Cássia pelos momentos de descontração e apoio durante o período de realização do experimento.

Aos docentes do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, professoras Maria Denise Lopes, Eunice Oba, Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga e professores Cezinande de Meira, João Carlos Pinheiro Ferreira, Nereu

Carlos Prestes e Marco Antonio Alvarenga pelos incentivos, confiança e ensinamentos durante o período de mestrado.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária Maria Cristina Paganini L. Rosa, Edílson de Souza Freire, Marcos Antonio Fumis Pellici, Valter Osvaldo Fabris, Márcio José Figueira, José Maria Pimentel (Tico) e Miguel Alves da Silva pela ajuda durante o experimento.

A todas as pessoas de forma direta ou indireta que contribuíram para a execução desta dissertação.

MUITO OBRIGADO !!!!

“Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida e viver com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia,
pois o triunfo pertence a quem se atreve...
E a vida é muito para ser insignificante”

Charles Chaplin

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO.....	4
3. HIPÓTESE.....	4
4. REVISÃO DE LITERATURA	5
4.1. Refrigeração do sêmen.....	5
4.2. Congelação do sêmen.....	6
4.3. Efeitos da criopreservação.....	9
4.4. Avaliação do sêmen.....	14
4.5. Sistema automatizado de refrigeração e congelação.....	19
4.5.1. Princípio de funcionamento.....	19
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
5.1. Local do experimento.....	20
5.2. Carneiros.....	20
5.3. Colheita do sêmen.....	21
5.4. Avaliação do sêmen.....	21
5.5. Processamento do sêmen.....	23
5.5.1. Sistema geladeira/vapor de nitrogênio líquido.....	24
5.5.2. Sistema automatizado.....	25
5.6. Descongelação do sêmen.....	25
5.7. Teste de exaustão.....	26

5.8. Delineamento experimental.....	26
5.9. Monitoramento das curvas de refrigeração e congelação.....	29
5.10. Análise estatística.....	29
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
7. CONCLUSÕES.....	52
8. REFERÊNCIAS.....	54
9. ANEXO I.....	65
9.1. Meio para congelação do sêmen Glicina-Gema-Leite (GONZALEZ, 1996)	65
9.2. Sondas fluorescentes (HARRISON & VICKERS, 1990, adaptado por ZÚCCARI, 1998).....	66
9.3. Solução de formol-salina (HANCOCK, 1957).....	67
9.4. “ Hamilton setup for IVOS-10”.....	68
ABSTRACT.....	69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Fluxograma experimental do processamento do sêmen submetido aos sistemas de congelação geladeira/vapor de nitrogênio líquido (SGV) e automatizado (SA) utilizando métodos de refrigeração em geladeira (RG), ou com controle automatizado (RA) e congelação em vapor de nitrogênio líquido (CV) ou com controle automatizado (CA).. 28
- Figura 2: Curvas de refrigeração do sêmen ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$) determinadas para refrigeração em geladeira com bolsas de água (RG), refrigeração em geladeira sem bolsas de água(RGSB) e refrigeração com controle automatizado (RA). 32
- Figura 3: Curvas de congelação do sêmen ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$) determinadas para congelação em vapor de nitrogênio líquido (CV) e congelação com controle automatizado (CA). 35

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Tratamentos experimentais segundo os métodos de refrigeração e congelamento do sêmen ovino, diluído em meio Glicina-Gema-Leite (GONZALEZ, 1996) e envasado em palhetas francesa de 0,25 mL. 27
- Tabela 2: Resumo da análise de variância dos parâmetros espermáticos do sêmen ovino refrigerado, tendo como causas de variação os sistemas de refrigeração (RG ou RA), o momento do período de incubação no teste de exaustão e a interação de ambos (Sistema x Momento). 38
- Tabela 3: Média e desvio padrão dos parâmetros espermáticos relativos às análises subjetiva, computadorizada, da morfologia espermática e da integridade total de membranas espermáticas (IMB) do sêmen ovino refrigerado nos Sistema em geladeira (RG) ou com controle automatizado (RA) e submetido ao teste de exaustão à 37°C. 41
- Tabela 4: Resumo da análise de variância da taxa de degradação das motilidades subjetiva (Mot) e computadorizada (MT) e integridade total de membranas espermáticas (IMB), no sêmen ovino refrigerado tendo como causas de variação o sistema de refrigeração (RG ou RA), momento do período de incubação no teste de exaustão e interação de ambos (Sistema x Momento). 42
- Tabela 5: Taxa de degradação média e desvio padrão das motilidades subjetiva (Mot) e computadorizada (MT) e integridade total de membranas espermáticas (IMB) durante o teste de exaustão à 37°C do sêmen ovino refrigerado nos Sistema de refrigeração em geladeira (RG) ou com controle automatizado (RA). 43
- Tabela 6: Resumo da análise de variância dos parâmetros espermáticos do sêmen ovino, tendo como causas de variação o sistema de congelamento em vapor de nitrogênio (CV) ou com controle automatizado (CA), momento do período de incubação no teste de exaustão e interação de ambos (Sistema x Momento). 45

- Tabela 7: Média e desvio padrão dos parâmetros espermáticos quanto às análises subjetiva e computadorizada do sêmen ovino congelado nos Sistema em vapor de nitrogênio (CV) ou com controle automatizado (CA) submetido ao teste de exaustão a 37°C. 47
- Tabela 8: Média e desvio padrão dos parâmetros espermáticos quanto à morfologia espermática e integridade total de membranas espermáticas (IMB) do sêmen ovino congelado nos Sistema de congelação em vapor de nitrogênio (CV) ou com controle automatizado (CA) e submetido ao teste de exaustão a 37°C. 49
- Tabela 9: Resumo da análise de variância da taxa de degradação das motilidades subjetiva (Mot) e computadorizada (MT) e integridade total de membranas espermáticas (IMB), no sêmen ovino tendo como causas de variação o sistema de congelação em vapor de nitrogênio (CV) ou com controle automatizado (CA), momento do período de incubação no teste de exaustão a 37°C e interação de ambos (Sistema x Momento). 50
- Tabela 10: Taxa de degradação média e desvio padrão das motilidades subjetiva (Mot) e computadorizada (MT) e integridade total de membranas espermáticas (IMB) durante o teste de exaustão à 37°C do sêmen ovino nos Sistemas de congelação em vapor de nitrogênio (CV) ou com controle automatizado (CA). 51

RESUMO

RODELLO, L. Validação de sistema automatizado de refrigeração e congelação de sêmen ovino. Botucatu, 2006. 70p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Objetivou-se avaliar e validar o sistema automatizado de refrigeração e congelação de fabricação nacional *TK 3000*[®], comparativamente ao sistema de refrigeração e de congelação pelo método geladeira/vapor de nitrogênio líquido. Foram utilizados dez carneiros da raça Santa Inês sendo colhidos, por meio de vagina artificial, três ejaculados de cada reprodutor. Após as avaliações do ejaculado, o sêmen foi diluído em meio para congelação Glicina-Gema-Leite e envasado em palhetas de 0,25 mL com 100×10^6 espermatozóides totais/doses, sob temperatura de 32°C. As amostras foram refrigeradas em geladeira e/ou com controle automatizado e posteriormente congeladas em vapor de nitrogênio líquido e/ou com controle automatizado. Na refrigeração em geladeira utilizou-se o refrigerador *Minitüb*[®] 518C, onde as palhetas foram dispostas entre bolsas plásticas contendo água, a fim de controlar o resfriamento gradativo de 32 a 5°C, totalizando 90 minutos. Para a congelação em vapor as palhetas foram transferidas para uma caixa de isopor com capacidade de 37 litros com dimensões internas de 32 cm de altura, 31 cm de largura e 40 cm de comprimento, contendo 5,5 litros de nitrogênio líquido e dispostas de forma horizontal a três centímetros da superfície líquida por 20 minutos. Para a refrigeração e congelação com controle automatizado, utilizou-se equipamento de fabricação nacional *TK 3000*[®], com o programa "P3.S2" estabelecido pelo fabricante para executar uma queda de 0,5°C/min na refrigeração, iniciando em 32°C até 5°C, com um tempo total de refrigeração de 90 minutos e em seguida, submetido à congelação em duas fases: de 5°C positivos até 80°C negativos com um ritmo de 15°C/min e de 80°C negativos até 120°C negativos com queda de 10°C/min. Ao final da refrigeração em geladeira e com controle automatizado, realizou-se trocas de palhetas entre os sistemas derivando quatro combinações de congelação. Ao término as palhetas foram mantidas em botijão criogênico e descongeladas em banho maria (40°C/20 seg) para avaliação subjetiva da motilidade (%) e vigor (0 a 5)

espermático, avaliação computadorizada das motilidades total (MT) e progressiva (MP), da velocidade de deslocamento real dos espermatozoides (VCL) e da linearidade (LIN), análises da integridade total das membranas espermáticas pelo método de fluorescência utilizando o iodeto de propídio (IP) e diacetato de carboxifluoresceína (DIC), integridade de acrossomo (Acros) e cauda dobrada (cauda) em microscopia óptica de contraste de fase e teste de exaustão (37°C/240 minutos). Os resultados foram similares ($P < 0,05$) entre a refrigeração em geladeira e a refrigeração com controle automatizados em todos os parâmetros avaliados pós-descongelamento e ao final do teste de exaustão, o mesmo observou-se entre a refrigeração em geladeira e congelamento em vapor de nitrogênio líquido e refrigeração e congelamento com controle automatizado e as combinações refrigeração em geladeira e congelamento com controle automatizado e refrigeração com controle automatizado e congelamento em vapor de nitrogênio líquido. Concluiu-se que o sistema automatizado *TK 3000*[®] é adequado a criopreservação do sêmen ovino, com qualidade equivalente àquela processada no sistema geladeira/vapor de nitrogênio líquido.

Palavras chave: Criopreservação; Sêmen ovino; Sistema automatizado; Espermatozoide.

1. INTRODUÇÃO

O ejaculado é constituído por uma população heterogênea de espermatozóides, na qual adquire capacidade fertilizante durante a passagem ao longo do epidídimo e subsequente no genital da fêmea (CURRY, 2000). A heterogeneidade é importante para o sucesso da fertilização após a monta natural, mas tem sido um fator significativo no processo de congelação para a inseminação artificial (CURRY, 2000), onde uma subpopulação de espermatozóides não estão adaptados para o processo de criopreservação, devido à variabilidade da resposta durante as etapas de refrigeração, congelação e descongelação (OLLERO et al., 1998), selecionando células crio-sensíveis das crio-resistentes, as quais necessariamente não são viáveis para a fertilização.

Para manter a heterogeneidade do ejaculado é necessário o conhecimento das causas de crio-injúrias como o efeito da temperatura, velocidade de congelação, modificações da atividade respiratória, do estresse osmótico (CURRY & WATSON, 1994) e oxidativo nas membranas espermáticas (CURRY, 2000) que causam lesões nas membranas plasmáticas, acrossomática, mitocôndrias, citoesqueleto e núcleo (VALCARCEL, 1997), induzindo a capacitação e reação acrossomal (WATSON, 1995; BRENER et al., 2003), fatores determinantes no estatus da viabilidade do espermatozóide, influenciando a fertilização *in vivo* e *in vitro* (BYRNE et al., 2000).

Considerando a importância da criopreservação, visando o melhoramento do potencial produtivo e reprodutivo das biotécnicas como a inseminação artificial, transferência de embriões e fertilização *in vitro*, os efeitos dos ritmos de refrigeração e congelação, define o grau de desidratação e a formação de cristais de gelo

intracelular e extracelular, influenciando na sobrevivência dos espermatozoides (MAZUR, 1984), onde tem-se conseguido preservar de 40 a 60% de motilidade e somente 20 a 30% mantem-se com as membranas espermáticas íntegras (SALAMON & MAXWELL, 1995; SALAMON & MAXWELL, 2000).

No resfriamento rápido, com quedas acima de 1°C/min (DOUGLAS-HAMILTON et al., 1984), os espermatozoides submetidos à variação brusca de temperatura, principalmente entre 30 e 0°C (WATSON, 2000), sofrem uma perda prematura da motilidade, redução da produção de energia, aumento da permeabilidade da membrana e perda de íons e moléculas intracelulares, induzindo ao choque térmico (MEDEIROS et al., 2002).

A utilização da refrigeração com taxas relativamente lentas com quedas abaixo de 0,33°C/min (DOUGLAS-HAMILTON et al., 1984) e homogêneas possibilita uma desidratação adequada, evitando a formação de cristais intracelulares (WATSON, 2000), minimizando as lesões de membranas, prevenindo a indução prematura da capacitação e da reação acrossomal.

Na congelação, a velocidade, a viscosidade e o volume do meio diluidor, são responsáveis pela cristalização ou vitrificação da água extracelular. As curvas de congelação variam com quedas de 0,5 a 100°C/min (ARAV et al., 2002). A curva de congelação muito lenta pode causar desidratação severa na célula e colapso das membranas devido à exposição prolongada a condições hiperosmóticas (HOLT, 2000).

Os métodos utilizados para a criopreservação do sêmen fora de Centros de Processamento de Material Genético e até mesmo em laboratórios de pesquisa são sistemas de criopreservação em geladeira/vapor de nitrogênio líquido. Esta técnica tem se mostrado viável, porém, de difícil padronização dos ritmos de

refrigeração e de congelação, uma vez que diversos fatores contribuem para induzir a variações no processamento do ejaculado a cada partida. Entre as variações estão; qualidade do material a ser processado, marca e modelo da geladeira, tipo da caixa isotérmica de poliestireno (isopor), nível de nitrogênio líquido, meio diluidor e a falta de repetibilidade do especialista.

2. OBJETIVO

- Avaliar e validar o sistema automatizado de refrigeração e congelação, de fabricação nacional, na criopreservação do sêmen de ovino, comparativamente ao sistema de refrigeração e de congelação pelo método geladeira/vapor de nitrogênio líquido.

3. HIPÓTESE

O sistema automatizado de refrigeração e congelação, de fabricação nacional *TK 3000*^{®1}, é um equipamento adequado para realizar a criopreservação do sêmen, refletindo em incremento qualitativo do material a ser preservado.

¹ TK Tecnologia em congelação Ltda, Uberaba, Minas Gerais

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN

A refrigeração do sêmen diluído partem de temperaturas próximas a 37°C para temperaturas entre 5 e 0°C, período este de adaptação do espermatozóide para a redução de seu metabolismo (MAZUR, 1984). Tradicionalmente, nos métodos que utilizam a diluição em um estágio, o período de equilíbrio tem sido considerado o tempo total que permanece o espermatozóide em contato com o crioprotetor e outros componentes do meio diluidor antes da congelação, estabelecendo um balanço entre o meio intracelular e extracelular (SALAMON & MAXWELL, 2000).

Na rápida refrigeração, os espermatozóides submetidos à variação brusca de temperatura, principalmente entre 30 e 0°C, sofrem uma perda prematura da motilidade, redução da produção de energia, aumento da permeabilidade da membrana e perda de íons e moléculas intracelulares, induzindo ao choque térmico (WATSON, 2000; MEDEIROS et al., 2002).

No processo de criopreservação do sêmen ovino, no período de refrigeração não se tem uma preocupação efetiva quanto à taxa de refrigeração, intervalo de temperatura e ao limite de temperatura, mas ainda em muitos casos utilizam-se de uma hora (PAULENZ et al., 2002), uma hora e meia (GONZALEZ, 1996), de duas horas (BAG et al., 2002; GIL et al., 2003), de quatro horas (MATHUR, 1991) e de 14 horas (EL-ALAMY & FOOTE, 2001) para realizar o tempo de equilíbrio a 5°C, utilizando-se geladeiras, câmaras frias e caixas com cubos de gelo.

Segundo Evans & Maxwell (1987) para o método de diluição em um estágio com meio glicerolizado é recomendado 90 a 120 minutos de refrigeração a 5°C antes de iniciar a congelação.

Anel et al., (2003), compararam três metodologias de congelação para sêmen ovino, utilizando técnicas de glicerolização em uma e duas etapas, com congelador programável e vapor de nitrogênio. No método um, foi realizado na refrigeração uma queda de 0,3°C/min adicionando o glicerol a 4% à 5°C, no método dois a queda na taxa de refrigeração foi de 0,2°C/min, com a adição do glicerol a 3% à 35°C e no método três, o ritmo de queda foi de 0,25°C/min adicionando 2% de glicerol à 35°C e à 5°C, totalizando 4%. Os métodos um e dois após atingirem 5°C realizaram 120 minutos de estabilização e o método três permaneceu estabilizado por 60 minutos e em todos os métodos o período de refrigeração foi entre 35 a 5°C. Após o período de refrigeração e estabilização, o método três ($89,1 \pm 8,0$; $P < 0,05$) preservou melhor a motilidade espermática em relação aos métodos 1 ($84 \pm 8,2$; $P < 0,05$) e 2 ($87,6 \pm 7,6$; $P < 0,05$).

4.2. CONGELAÇÃO DO SÊMEN

O processo de criopreservação é conhecido por causar danos as organelas espermáticas, em particular nas membranas e induzir mudanças semelhantes à capacitação espermática e reação acrossomal na população sobrevivente (BAILEY et al., 2000).

Durante a mudança de temperatura de 5°C positivos a 50°C negativos, a curva de congelação determina se as células espermáticas permanecerão em

equilíbrio com seu meio extracelular ou progredir para uma supercongelação com o possível aumento de gelo intracelular (WATSON, 2000).

Com os protocolos usuais de criopreservação, os espermatozóides são suspensos em meio com crioprotetor e após envasados em palhetas são congelados em vapor de nitrogênio líquido (SALAMON & MAXWELL, 2000).

O'Neil (1998) apud Byrne et al. (2000) observou que a congelação rápida de 5°C positivos para 25°C negativos com descenso de 5°C/min, teve melhor viabilidade, melhor atividade mitocondrial e integridade acrossomal do que com congelação lenta (-0,5°C/min).

Byrne et al. (2000) estudando o efeito do ritmo de congelação de espermatozóide ovino na fertilização *in vivo* e *in vitro*, utilizaram congelação automatizada, dividindo em dois tratamentos, com equilíbrio em geladeira por 90 minutos a 5°C. No primeiro tratamento foi utilizado uma curva lenta partindo de 5°C para -25°C com -0,5°C/min e no segundo tratamento uma curva rápida com queda 5°C/min e uma segunda etapa para ambos os tratamentos com a curva partindo de 25°C negativos até 130°C negativos com descenso de -50°C/min. Observaram na produção *in vitro* de embriões que a taxa de clivagem utilizando o sêmen congelado com a curva rápida foi maior do que com a curva lenta (57% e 26%, respectivamente; P<0,001) e não obtiveram diferença significativa entre a curva lenta e rápida na viabilidade espermática pós-descongelação. Na taxa de fertilidade *in vivo*, o sêmen processado com ritmo de congelação rápida e com inseminação uterina foi melhor com 60% (P<0,001), em relação ao ritmo de congelação lenta com inseminação uterina com 40% (P<0,001), ritmo de congelação rápida com inseminação cervical com 13% (P<0,001) e ritmo de congelação lenta com inseminação cervical 0% (P<0,001).

Kumar et al. (2003), compararam a eficiência de duas máquinas, um congelador comercial Kryo 10² e um congelador construído no laboratório para realizar a criopreservação de sêmen de bovino, ovino e suíno, com várias curvas de congelação. A refrigeração foi realizada de 22°C para 5°C em um período de 90 minutos, em um congelador comercial com taxa controlada ou em um banho gelado com taxa controlada, ambos com queda de 0,2°C/min. De 5°C positivos até 5°C negativos foi realizado uma queda de 5°C/min e de 5°C negativos até 50°C negativos foram utilizados três taxas de queda; 1, 30 e 50°C/min. As características do sêmen ovino pós-descongelação, foram melhores na máquina construída no laboratório com descenso de congelação de 30°C/min.

Anel et al. (2003), comparam três metodologias de congelação para sêmen ovino, utilizando técnicas de glicerolização em uma e duas etapas, com biofreezer programável Kryo 10 e vapor de nitrogênio. No método um, foi realizado na refrigeração uma queda de 0,3°C/min adicionando o glicerol a 4% à 5°C e congelando em um biofreezer programável com queda de 20°C/min, no método dois, a queda na taxa de refrigeração foi de 0,2°C/min, com a adição do glicerol a 3% à 35°C e congelação em vapor de nitrogênio líquido a 5cm do nitrogênio por 10 minutos e no método três, o ritmo de queda foi de 0,25°C/min adicionando 2% de glicerol a 35°C e a 5°C, totalizando 4% e congelação no biofreezer programável com queda de 20°C/min. O método três obteve melhor motilidade progressiva (55,1±6,7%; P<0,05) em comparação aos métodos um(45,9±9,2; P<0,05) e dois (45,4±10,5; P<0,05) . Na viabilidade espermática e reação acrossomal os métodos um (46,5±4,5), dois (47,9±4,9) e 3 (50,7±9,2) não obtiveram diferenças (P<0,05).

² series III, Planer, UK

Bag et al. (2002) estudaram o efeito da temperatura inicial de congelação sobre a motilidade e integridade acrossomal. As amostras de sêmen após refrigeração à 5°C positivos foram congeladas a 25, 75 e 125°C negativos utilizando um congelador programável R-204^{®3} com queda de 25°C/min. A percentagem de motilidade pós-descongelação quando o sêmen foi congelado inicialmente a 125°C negativos (58,4%; P<0,05) foi melhor do que a 75°C negativos (53,3%; P<0,05) e 25°C negativos (49,0%; P<0,05). A percentagem de acrossomos normais foi melhor a 125°C negativos (51,6%; P<0,05) em relação à 75°C negativos (49,4%; P<0,05) e 25°C negativos (46,0%; P<0,05), indicando que a temperatura inicial de congelação tem um efeito significativo sobre a motilidade e a integridade acrossomal.

Arav et al. (2002), desenvolveram uma nova técnica para congelação e vitrificação de espermatozóides, oócitos e embriões. A tecnologia de congelação é baseada no “Multi-Thermal-Gradient” (MTG[®]), que permite a vitrificação sem risco do efeito soluto ou cristalização. O método utiliza baixas concentrações de crioprotetores e caracterizado por uma estabilidade do equilíbrio termodinâmico. A percentagem de motilidade espermática pós-descongelação para aves, ovinos, bovinos, eqüinos, suínos e humanos foram 45, 57, 65, 50, 45 e 65, respectivamente. Concluíram que esta técnica apresenta uma variação entre diferentes espécies.

4.3. EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO

O processamento para a criopreservação dos espermatozóides de muitas espécies, leva a uma série de alterações que resultam em uma marcante redução da fertilidade quando comparado ao sêmen a fresco. Entre essas modificações, as

³ Planer Biomed, UK

lesões nas membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial foram indicadas como as principais causas de danos estruturais e de perda funcional (VALCARCEL, 1997).

Segundo Salamon & Maxwell (1995) apesar de 40 a 60% dos espermatozóides de carneiros apresentarem motilidade pós-descongelação, somente 20 a 30% deles permanecem biologicamente inalterados. Os danos básicos que os espermatozóides sofrem durante o processo de congelação podem ser ultra-estruturais ou físicos, bioquímicos ou funcionais. Os espermatozóides podem estar móveis, mas danificados, de tal maneira que a penetração e fertilização sejam improváveis.

Na congelação e descongelação dos espermatozóides ovinos, mudanças severas em estrutura e função, foram responsabilizadas pela baixa capacidade de fertilização e taxas reduzidas de concepção após a inseminação artificial cervical (PÉREZ et al., 1996).

Segundo Singer & Nicholson (1972), o modelo estrutural básico da membrana espermática é igual ao modelo biológico organizados em um mosaico fluído, formado por duas camadas de fosfolípidios, não sendo uma estrutura contínua, seria interrompida por numerosas proteínas integrais, as quais estariam intercaladas em vários graus dentro desta estrutura. Na maior parte da membrana, a organização de lipídios, glicolipídios, proteínas e glicoproteínas apresentam de maneira assimétrica com relação à distribuição de moléculas específicas nas faces externa e interna. Quando as proteínas e glicoproteínas compreendidas na membrana celular, estas seriam dispostas de forma heterogênea e poderia ocorrer divisão funcional em duas classes distintas: integrais ou intrínsecas e periféricas ou extrínsecas.

Watson & Martin (1972) concluíram que os espermatozóides de carneiros são mais sensíveis a criopreservação que de touros e Holt & North (1985), observaram entre carneiros diferenças nas membranas da célula espermática.

As membranas espermáticas apresentam-se em um estado de fluidez, sendo esta característica um pré-requisito para o desempenho de suas funções. Os principais fatores que afetam esta fluidez são sua composição relativa entre fosfolipídios e colesterol e a temperatura à qual a membrana é exposta. Os lipídios e as proteínas de membrana que permanecem em um estado de fluidez, permitindo assim, a movimentação livre dos componentes na membrana sofrem com a contínua queda de temperatura durante a congelação, mudanças que produzem alterações físicas da membrana a qual passa do estado líquido ao de gel, produzindo uma estrutura rígida, tornando estas áreas fracas e susceptíveis a rupturas (HAMMERSTED et al., 1990).

Holt & North (1984) relataram que as alterações morfológicas das membranas dos espermatozóides ovino definem pela desorganização dos lipídeos durante a fase de transição da refrigeração de 30 a 5°C. Holt & North (1986) relataram que as alterações críticas resultantes da transição do estado cristalino líquido para a forma de gel e vice-versa, após mudança de temperatura no meio de suspensão da célula espermática, estariam associadas às mudanças na permeabilidade e indução de danos as membranas.

Alterações na motilidade e na estrutura dos espermatozóides ocorrem simultaneamente nas diferentes etapas de congelação e descongelação. É bem conhecido que o resfriamento rápido do sêmen de 30 para 0°C (WATSON, 2000), ou até mesmo a redução da temperatura de 37°C para 5°C (LÓPEZ et al., 1999), induz a um estresse letal para algumas células, que é proporcional à taxa de resfriamento,

intervalo de temperatura e ao limite de temperatura. Este processo é conhecido como choque térmico (WATSON, 2000). O efeito deste processo é manifestado no espermatozóide com movimentos em círculos ou retrógrado, presença de peças intermediárias dobradas, e muitos destes processos são considerados irreversíveis.

No choque térmico as alterações incluem o decréscimo da glicólise, da frutólise e conseqüentemente, da respiração celular, o aumento da degeneração do ácido desoxirribonucléico (DNA) e liberação para o meio extracelular de enzimas e lipídios a partir dos espermatozoides. As lesões estruturais iniciam-se na membrana plasmática atingindo posteriormente a membrana acrossomal e por último as membranas mitocondriais (WATSON, 2000).

Segundo Amann & Pickett (1987) a utilização de adequada taxa de refrigeração no sêmen diluído é um dos fatores para uma menor depleção da fonte energética devido à manutenção do metabolismo espermático reduzido, permitindo uma melhor qualidade do sêmen ao final do processo de refrigeração, evitando alterações na forma das moléculas de fosfolipídeos das membranas, em virtude da mudança de fase do estado líquido para gel. Possivelmente, a redução da temperatura altera o funcionamento de várias bombas adenosina trifosfato (ATP) dependentes, dentre elas a de sódio/potássio (Na^+/K^+), provocando despolarização parcial da membrana, com conseqüência abertura dos canais de cálcio, tornando as membranas acrossomal e mitocondrial permeáveis ao cálcio (Ca^{++}) a 5°C, primeiramente induzindo a vesiculação prematura da membrana acrossomal e depois danificando a membrana mitocondrial que está associada com motilidade.

À medida que a água congela e ocorre a formação de cristais de gelo, aproximadamente a 0°C, os espermatozoides ficam encarcerados em canais do solvente, que permanece na forma líquida, resultando em um aumento da

concentração dos solutos no meio que permanece descongelado. Iniciando a congelação de forma progressiva, é gerado um gradiente osmótico que força a água a sair do espermatozóide, desidratando-o e aumentando a concentração dos eletrólitos intracelulares. Conforme a solubilidade destes eletrólitos é ultrapassada, os solutos se precipitam até que o ponto eutético seja alcançado e a precipitação seja restrita, denominado de efeito solução (MAZUR, 1984).

No caso do espermatozóide ovino, a maioria das lesões na congelação ocorre entre -10°C e -25°C ; período de cristalização do gelo (SALAMON E MAXWELL, 1995).

Segundo Curry & Watson (1994) durante a congelação o estresse osmótico é um importante fator de injúria às células espermáticas, devido à exposição em condições hiperosmótica, associado com a adição e remoção de crioprotetores permeáveis, como o glicerol. Estas mudanças osmóticas ocorrem gradualmente ou rapidamente, dependendo do ritmo de congelação ou do método de adição do crioprotetor.

A velocidade de congelação influencia na desidratação celular e na formação de gelo intracelular. Geralmente, a congelação lenta resulta em lesões a partir da desidratação celular excessiva e do efeito do soluto, enquanto que a congelação rápida com queda entre 15 a $60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (WATSON, 2000) promove lesão pela formação de gelo intracelular, não tendo tempo suficiente para permitir a saída da água intracelular (MAZUR, 1984; WATSON, 1995).

Os elementos do citoesqueleto são termo-sensíveis. A congelação das células resulta em uma despolimerização dos filamentos de actina. Segundo Spungin et al. (1995) a despolimerização da F-actina do citoesqueleto é uma etapa importante da capacitação e da reação acrossomal, permitindo a aproximação das

membranas plasmáticas e acrossomal promovendo a exocitose acrossomal, então a criopreservação contribui para a desorganização das membranas antecipando o processo de capacitação e reação acrossomal (BRENER et al., 2003).

Os efeitos da criopreservação na função espermática são semelhantes a da capacitação espermática, devido ao aumento da permeabilidade das membranas e no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MEDEIROS et al., 2002). Estas moléculas são formadas da redução incompleta da molécula de oxigênio e são tóxicas para os espermatozóides, devido a sua alta reatividade. A toxicidade da ROS provoca ionização e subsequente inativação de proteínas, danos ao DNA e peroxidação de lipídios insaturados. Os espermatozóides são susceptíveis a oxidação por causa da inabilidade de resintetizar os fosfolipídios polinsaturados presentes na membrana plasmática e a ineficiência do sistema anti-oxidante (HAMMERSTEDT et al., 1990). A peroxidação lipídica modifica a membrana plasmática, levando a célula a morte, tentando superar a peroxidação durante a criopreservação tem-se processado o sêmen sob condições anaeróbicas, realizando a adição de antioxidantes e inclusão de agentes quelantes (AITKEN, 1995).

4.4. AVALIAÇÃO DO SÊMEN

As características seminais como motilidade, vigor e morfologia espermática são considerados critérios importantes na avaliação da fertilidade do sêmen (HAFEZ, 1995).

A morfologia espermática é classificada basicamente em duas categorias: defeitos maiores e menores, onde os defeitos maiores estão associados ao baixo

potencial de fertilidade do macho, enquanto os defeitos menores têm pouco efeito sobre a fertilidade (BLOM, 1973).

É pouco improvável que a criopreservação induza a defeitos maiores no espermatozóide, entretanto a utilização de técnicas inadequadas de refrigeração e congelação induzem a mudanças irreversíveis como lesões de acrossomo e cauda dobrada (GRAHAM, 1996).

A avaliação do ejaculado é uma parte importante do exame físico de um macho, devendo ser rápida e eficiente de modo que as amostras cuidadosamente coletadas possam ser processadas preservando a qualidade inicial (HAFEZ, 1995).

A motilidade é essencial para predizer o potencial de um macho, embora uma característica essencial, não é necessariamente indicativa de capacidade fecundante, uma vez que os espermatozoides normais perdem sua capacidade fertilizante antes de perder a motilidade (HAFEZ, 1995).

A análise subjetiva da motilidade espermática propicia de maneira simples, rápida e barata a proporção de espermatozoides com movimento da amostra de sêmen, mas tem como desvantagem, diferenças de até 60% entre examinadores e laboratórios (MALMGREN, 1997).

Na visualização microscópica, tende-se a subestimar a porcentagem de espermatozoides móveis, principalmente em lâminas com alta concentração de espermatozoides (MIES FILHO, 1987). Há pouco tempo, os sistemas computadorizados de avaliação do movimento espermático (CASA), vêm substituindo a técnica de análise subjetiva em laboratório de pesquisa, de andrologia e de centros de processamento de sêmen, com uma demanda muito alta de análise (TULI et al., 1992).

O uso do analisador computadorizado, já sendo utilizado para determinar as características seminais de ovino (SOUSA et al., 1998) e de várias espécies.

A técnica computadorizada permite a identificação precisa das células móveis e imóveis de uma amostra de sêmen e o registro das trajetórias espermáticas individuais. Após o registro das trajetórias, são calculados os valores individuais e médios das variáveis do movimento espermático, dentre as quais destacam-se as seguintes: motilidade total da amostra (%), motilidade progressiva (%), velocidade espermática ao longo da trajetória real (VCL - $\mu\text{m/s}$), velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP - $\mu\text{m/s}$), velocidade espermática considerando-se uma trajetória retilínea com origem no primeiro ponto analisado e final no último (VSL - $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN - %), índice retilíneo (IR - %), deslocamento lateral da cabeça (DLC - μm), frequência dos batimentos flagelares (FBF - Hz) e concentração espermática ($\times 10^6/\text{mL}$) (FERREIRA, 2000).

Além destes, também são analisados e expressos os valores referentes à área, tamanho e alongamento da cabeça dos espermatozóides (FERREIRA, 2000).

Apesar do seu alto custo, o CASA oferece automatização, rapidez e repetibilidade nas avaliações, possibilitando detalhar melhor a qualidade do sêmen analisado (FERREIRA, 2000).

A integridade da membrana espermática é essencial para o funcionamento celular, exercendo uma função importante na sobrevivência do espermatozóide no aparelho genital da fêmea (SALAMON & MAXWELL, 2000) e mantendo o processo de fertilização (MALMGREN, 1997; NEILD et al., 1999).

Holt & North (1984), Ollero et al. (1998) e Watson (2000) referiram que as alterações morfológicas da membrana dos espermatozóides ovinos são provocadas pela desorganização dos lipídeos que ocorre durante a fase de refrigeração entre as

temperaturas de 30°C e 0°C, estando associadas às mudanças na permeabilidade e na indução da fusão da membrana (HOLT & NORTH, 1986), podendo prejudicar a função das proteínas de membrana que são necessárias à integridade estrutural celular ou ao metabolismo iônico, resultando em uma baixa viabilidade espermática (OEHNINGER et al., 2000).

As técnicas de coloração têm fornecido novas maneiras de se avaliar a capacidade funcional dos espermatozóides. Nem todos os corantes supravitais, também conhecidos como coloração de vivos e mortos, são eficientes para a avaliação das amostras de sêmen congelado diminuindo a acurácia do resultado (GARNER et al., 1986). Com o avanço das pesquisas, o emprego de sondas fluorescentes foi estudado para a avaliação da funcionalidade das organelas dos espermatozóides e seus compartimentos, principalmente da integridade das membranas espermáticas (MALMGREN, 1997; NEILD et al., 1999).

Garner et al. (1986) utilizaram a combinação duas sondas fluorescentes como método de avaliação da célula espermática; o diacetato de carboxifluoresceína (DIC), que possui baixo peso molecular, que possibilita sua passagem pela membrana plasmática celular, é hidrolisado por esterases, resultando em carboxifluoresceína livre, permanecendo retida no interior da célula quando a membrana plasmática está íntegra, fluorescendo em verde; combinação com o iodeto de propídio (IP), sonda fluorescente de alta intensidade, que na membrana plasmática íntegra é impermeável e na membrana lesada a sonda liga-se ao DNA do espermatozóide, fluorescendo o núcleo de vermelho. A avaliação quantitativa foi realizada através de citômetro de fluxo.

Harrison & Vickers (1990) utilizaram a microscopia de epifluorescência para realizar a avaliação da integridade da membrana em espermatozóides de

ovinos e suínos com as sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína e de iodeto de propídio em preparação úmida com baixas concentrações de formaldeído. Para cada 100 espermatozóides de suínos contados, $76,5 \pm 5,5$ foram classificados como intactos pela utilização do DIC isoladamente, $80,3 \pm 5,7$ foram tidos como intactos utilizando apenas IP e $78,3 \pm 4,6$ pelo uso das duas sondas em associação. O mesmo foi realizado com amostras de espermatozóides de ovinos, com resultados semelhantes, indicando a repetibilidade da técnica. Propondo duas classificações, como espermatozóides íntegros (coradas com DIC e não coradas IP) e lesados (parcialmente ou não coradas com DIC e coradas com IP).

Sousa (2002) empregando as sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína e de iodeto de propídio em sêmen ovino refrigerado, obteve 71,8% e 76,0% ($P < 0,05$) de membranas espermáticas íntegras com os meios diluidores Glicose Leite (CORTEEL, 1973) e Glicina Gema Leite, respectivamente, refrigerados por 24 horas e 71,5% e 75,0% ($P < 0,05$) de membranas espermáticas íntegras com os meios diluidores Glicose Leite e Glicina Gema Leite, respectivamente, refrigerados por 48 horas.

A membrana mitocondrial é um elemento importante por estar relacionado com o estágio energético celular e motilidade e tem sido correlacionado com a fertilidade (MARTINEZ-PASTOR et al., 2004). A rodamina 123 inicialmente era usada para determinar a função mitocondrial espermática, mas, recentemente a fluorescência com JC-1 está sendo utilizada para estimar o potencial da membrana mitocondrial do espermatozóide com microscopia de fluorescência em citometria de fluxo (GARNER, et al., 1997).

O desenvolvimento dos métodos empregando o uso de sondas fluorescentes de forma isolada ou em combinação aumentou a possibilidade de determinar a integridade e a viabilidade espermática (GARNER et al., 1999).

4.5. SISTEMA AUTOMATIZADO DE REFRIGERAÇÃO E CONGELAÇÃO

4.5.1 PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

O princípio de funcionamento da máquina de congelação de sêmen, modelo *TK 3000*[®], inicia-se o processo numa temperatura ambiente com controle eletrônico determinando a taxa de resfriamento (°C/min) de acordo com o programa selecionado. O resfriamento do porta palhetas é realizado sem usar nitrogênio líquido, utiliza-se para esta função o módulo eletrônico (Efeito Peltier) para executar o resfriamento, sendo este módulo controlado pelo sistema computadorizado da máquina, proporcionando uma taxa de variação (°C/min) precisa e uniforme desde a temperatura ambiente até 4 ou 5°C positivos (MOTTA, 2006)⁴.

Após a refrigeração o operador retira o porta palheta do sistema de refrigeração e mergulha no nitrogênio contido no recipiente e o controle eletrônico passa a controlar a taxa de temperatura (°C/min) de congelação de acordo com a curva selecionada. O controle atua sobre o porta palhetas contrapondo ao frio proporcionado pelo nitrogênio líquido. O equilíbrio entre o frio do nitrogênio líquido e o aquecimento proporcionado pela eletrônica define a taxa de congelação (°C/min) programada de 5°C positivos até 140°C negativos (MOTTA, 2006).

⁴ Motta, C.C. (TK Tecnologia em congelação Ltda, Uberaba, Minas Gerais). Comunicação pessoal, 2006.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. LOCAL DO EXPERIMENTO

Os procedimentos *in vitro*, foram conduzidos no Laboratório de Estudos em Biotecnologia Aplicada à Reprodução de Ovinos e Caprinos e no Laboratório do Centro de Diagnóstico e Biotecnologia em Reprodução Animal, instalações do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) situados no município de Botucatu, Estado de São Paulo (latitude 22° 53'S, longitude 48° 29' W).

5.2. CARNEIROS

Foram utilizados, dez carneiros da raça Santa Inês após exame clínico-andrológico conforme proposto por Fonseca et al. (1992), com idade entre 9 a 36 meses, com pesos entre 80 a 140kg, oriundos de três diferentes propriedades da região de Botucatu, Estado de São Paulo. Durante o período experimental de julho a outubro de 2004, os reprodutores foram mantidos em baias individuais nas dependências Laboratório de Estudos em Biotecnologia Aplicada à Reprodução de Ovinos e Caprinos, com alimentação a base de feno de “coast-cross”, concentrado para a manutenção de reprodutores ovino com 16% de proteína bruta (PB) e 85% de nutrientes digestíveis totais (NDT) e livre acesso à água e sal mineral.

5.3. COLHEITA DO SÊMEN

O sêmen foi colhido pelo método vagina artificial a temperatura de 42°C com copo coletor graduado pré-aquecido à 37°C, com auxílio de uma fêmea contida. De cada reprodutor, foi colhido um ejaculado por dia, três vezes em uma semana, totalizando 30 colheitas.

5.4. AVALIAÇÃO DO SÊMEN

Após cada colheita o sêmen foi avaliado quanto ao aspecto e o volume através da graduação do copo coletor e mantido em banho-maria a 32°C. Dez microlitros (μL) foram diluídos em quatro mililitros (mL) de água destilada com taxa de diluição 1:400, para a realização da concentração espermática em câmara de Neubauer.

Em seguida, no momento um (M_1), uma alíquota de 10 μL de sêmen foi diluída em 500 μL da fração um (não glicerolizada) do meio Glicina-Gema-Leite – GGL (GONZALEZ, 1996) e submetida à análise subjetiva da motilidade (**MOT**, %) e **vigor** (0-5) espermático em microscopia de contraste de fase⁵ em aumento de 200x em lâmina e lamínula aquecidas, bem como análise computadorizada da cinética espermática⁶, em câmara de Makler⁷ aquecida a 37°C, onde foram avaliados, em três campos aleatoriamente, dando-se ênfase aos seguintes parâmetros (SOUSA et al., 1999):

- **MT** - motilidade total (%)
- **MP** - motilidade progresssiva (%);

⁵ Olympus BX-40, Tokyo, Japan

⁶ Hamilton Thorn Motility Analyser - HTMA – IVOS 10 – Hamilton Research – Beverly, MA, USAountin

⁷ Makler Counting Chamber – Sefi-Medical, Haifa, Israel

- **VCL** - velocidade de deslocamento real dos espermatozóides ($\mu\text{m/s}$)
- **LIN** - linearidade (%)

Para a análise de integridade total das membranas espermáticas (IMB) uma alíquota de $10\mu\text{L}$ do sêmen diluído em GGL foi acrescentada a $40\mu\text{L}$ de uma solução preparada com a combinação de $20\mu\text{L}$ de formol salina tamponada, $20\mu\text{L}$ de diacetato de carboxifluoresceína (DIC) e $10\mu\text{L}$ de iodeto de propídio (IP) para cada um mililitro de citrato de sódio a 2,94%. Depois de incubado por no mínimo 15 minutos à temperatura ambiente, $10\mu\text{L}$ dessa suspensão era depositado entre lâmina e lamínula (HARRISON & VICKERS, 1990 adaptado por ZÚCCARI, 1998) e observado em microscópio de epifluorescência⁸ com filtro de excitação (BP) 450-490nm, espelho dicromático 510nm e filtro de supressão (LP) 515nm, onde 200 células/lâmina foram distribuídas percentualmente (%) nas seguintes classificações:

- **Classe 1** - acúmulo de DIC (fluorescência verde) ao longo da cabeça e flagelo, sem acúmulo de IP (fluorescência vermelha);
- **Classe 2** - acúmulo de IP ao longo da cabeça e flagelo, sem acúmulo de DIC;
- **Classe 3** - acúmulo de DIC na peça intermediária e acúmulo de IP na cabeça unicamente;
- **Classe 4** - acúmulo de fluorescência amarelada na região acrossomal, de IP na cabeça e de DIC na peça intermediária.

Para a análise estatística, os espermatozóides da **classe 1** foram considerados íntegros e aqueles das **classes 2, 3 e 4**, foram considerados lesados. Sendo os resultados apresentados em função dos espermatozóides com IMB.

⁸ Leica DM LB, Germany

Para a análise da morfologia espermática (%), 10 μ L de sêmen foram diluídos em 500 μ L de solução de formol salina aquecida à 37°C (HANCOCK, 1957). O sêmen foram acondicionados em microtubos de fundo cônico de polipropileno⁹ de 1,5 mL e estocados à temperatura entre 4 a 5°C para posterior leitura. Para a análise foi utilizada a microscopia de contraste de fase em aumento de 1000x sob imersão através de preparações úmidas, colocando uma gota entre lâmina e lamínula e classificando 200 células por preparação, de acordo com Blom (1973). Nas análises dos dados, enfocaram-se espermatozóides com integridade de acrossomo (Acros, %) e aqueles com cauda dobrada (Cauda, %).

Análises da taxa de degradação (TD - %) das motilidades subjetiva (Mot) e computadorizada (MT) e integridade total das membranas espermáticas (IMB) do sêmen:

$$\text{TD} = [(\text{motilidade inicial} - \text{motilidade final}) \times \text{motilidade inicial}^{-1}] \times 100$$

$$\text{TD} = [(\text{espermatozóides íntegros inicial} - \text{espermatozóides íntegros final}) \times \text{espermatozóides íntegros inicial}^{-1}] \times 100$$

5.5. PROCESSAMENTO DO SÊMEN

Após as avaliações do ejaculado, o sêmen foi diluído com o meio de congelação GGL (GONZALEZ, 1996) em duas etapas em temperatura de 32°C: primeiramente a fração um (não glicerolizada) e em seguida a fração dois (glicerolizada). O sêmen diluído foi envasado em 22 palhetas¹⁰ de 0,25 mL na concentração final de 100 x 10⁶ espermatozóides totais/doses. As palhetas foram refrigeradas distribuindo-as de acordo com a técnica de refrigeração (em geladeira -

⁹ Axygen Scientific, Union City, USA

¹⁰ IMV, France

RG ou com controle automatizado - RA) e posteriormente a técnica de congelação (em vapor de N₂L – CV ou com controle automatizado - CA) (FIG.1).

5.5.1 SISTEMA GELADEIRA/VAPOR DE NITROGÊNIO LÍQUIDO

Na refrigeração em geladeira (RG) foi utilizado o refrigerador *Minitüb*[®] 518C¹¹, na qual as palhetas foram dispostas horizontalmente entre bolsas plásticas contendo água, confeccionadas artesanalmente com sacos plásticos com medidas de 37 cm de comprimento por 15 cm de largura, seguindo as dimensões do suporte de palhetas. Para o processo de refrigeração foram utilizados duas bolsas com volume de 200mL de água e uma bolsa de 400mL de água, dispostas e retiradas em tempos determinados da seguinte maneira: após as bolsas estarem aquecidas à 32°C, a bolsa de 400mL ficava em baixo do suporte e as outras duas em cima, após 35 minutos de refrigeração a primeira bolsa de 200mL era retirada, aos 50 minutos de refrigeração a segunda bolsa de 200mL era sacada e por fim a bolsa de 400 mL era removida com 60 minutos de refrigeração, completando 90 minutos. Para CV as palhetas foram transferidas para uma caixa de poliestireno (isopor) com capacidade para 37 litros com dimensões internas de 32 cm de altura, 31 cm de largura e 40 cm de comprimento, contendo 5,5 litros de nitrogênio líquido, onde foram expostas a três centímetros do vapor de nitrogênio líquido, na posição horizontal por 20 minutos, em seguidas submersas no nitrogênio líquido e depois acondicionada em raques e armazenada em botijão criogênico para as análises conforme itens 5.4. e 5.7.

¹¹ Minitüb do Brasil Ltda

5.5.2. SISTEMA AUTOMATIZADO

Para o Sistema automatizado de refrigeração (RA) e congelação (CA), foi utilizado equipamento programável de fabricação nacional modelo *TK 3000*[®], composto pela unidade de refrigeração, o porta-palhetas e a caixa térmica plástica, recipiente para o nitrogênio líquido. Para a refrigeração com controle automatizado (RA), foi selecionado o programa “P3.S2”, com característica de queda na temperatura na razão de 0,5°C/minuto. O porta-palhetas, previamente aquecido a 32°C, após ser preenchido era acoplado à unidade de resfriamento, ficando na posição vertical por 90 minutos até a temperatura final de 5°C. Após este período, para a congelação com controle automatizado (CA), o porta-palhetas foi transferido para a caixa térmica plástica com dois litros nitrogênio líquido, dando continuidade ao programa “P3.S2” para congelação que consistia na queda de temperatura em duas fases, a primeira na razão de 15°C/min de 5°C positivos até 80°C negativos e a segunda a 10°C/min de 80°C negativos até atingir-se 120°C negativos, com cerca de nove minutos e 30 segundos de processamento. Com o fim da congelação, as palhetas eram retiradas do porta-palhetas e submersas em nitrogênio líquido, acondicionadas em raques e armazenadas em botijão criogênico para as análises conforme itens 5.4. e 5.7..

5.6. DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN

Duas palhetas de cada tratamento de ambos os sistemas de criopreservação foram descongeladas em banho-maria a 40°C por 20 segundos, o conteúdo das palhetas foi transferido para os microtubos de fundo cônico mantidos

aquecido a 37°C, sendo as amostras utilizadas para a realização dos testes *in vitro*, momento três (M₃), descritos nos itens 5.4. e 5.7..

5.7. TESTE DE EXAUSTÃO

Depois de ter realizado o processo de refrigeração em geladeira (RG) e/ou a refrigeração com controle automatizado (RA), a congelação em vapor de nitrogênio líquido (CV) e/ou a congelação com controle automatizado (CA) e a descongelação, as palhetas eram esvaziadas em microtubos de fundo cônico de polipropileno de 1,5 mL e submetidas ao teste de exaustão a 37°C durante 240 minutos (PAGANINI FILHO, 1999), não sendo acrescentado em nenhum momento meio de congelação. As análises foram repetidas conforme item 5.4. aos 120 e 240 minutos de incubação.

5.8. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O sêmen foi submetido a quatro tratamentos, a saber: **RG/CV**, **RA/CV**, **RA/CA** e **RG/CA** (TAB 1 e FIG 1), derivados da combinação entre dois métodos de refrigeração e dos dois de congelação, referentes aos sistemas geladeira/vapor de nitrogênio líquido (**SGV**) e automatizado (**SA**) como metodologia descrita nos itens 5.5.1. e 5.5.2..

Tabela 1: Tratamentos experimentais segundo os métodos de refrigeração e congelamento do sêmen ovino, diluído em meio Glicina-Gema-Leite (GONZALEZ, 1996) e envasado em palhetas francesa de 0,25 mL.

MÉTODOS	Congelamento		
	Em vapor de N ₂ (CV)	Com controle automatizado (CA)	
Refrigeração	Em geladeira (RG)	RG/CV	RG/CA
	Com controle automatizado (RA)	RA/CV	RA/CA

Quatro palhetas do RG e quatro do RA foram utilizadas no cruzamento entre os sistemas antes de iniciar o processo de congelamento: nove palhetas de cada técnica de refrigeração (RG e RA) foram submetidas à CV e a CA constituindo-se quatro tratamentos experimentais como descrito na Tabela 1 e Figura 1. Além disso, duas palhetas de cada técnica de refrigeração (RG e RA) foram removidas e submetidas ao teste de exaustão (PAGANINI FILHO, 1999) nos momentos zero (0), 120 e 240 minutos de incubação a 37°C, sendo avaliadas os parâmetros espermáticos da análise subjetiva de motilidade e vigor, análise computadorizada da cinética, IMB e morfologia como descrito no item 5.4., momento 2 (M₂).

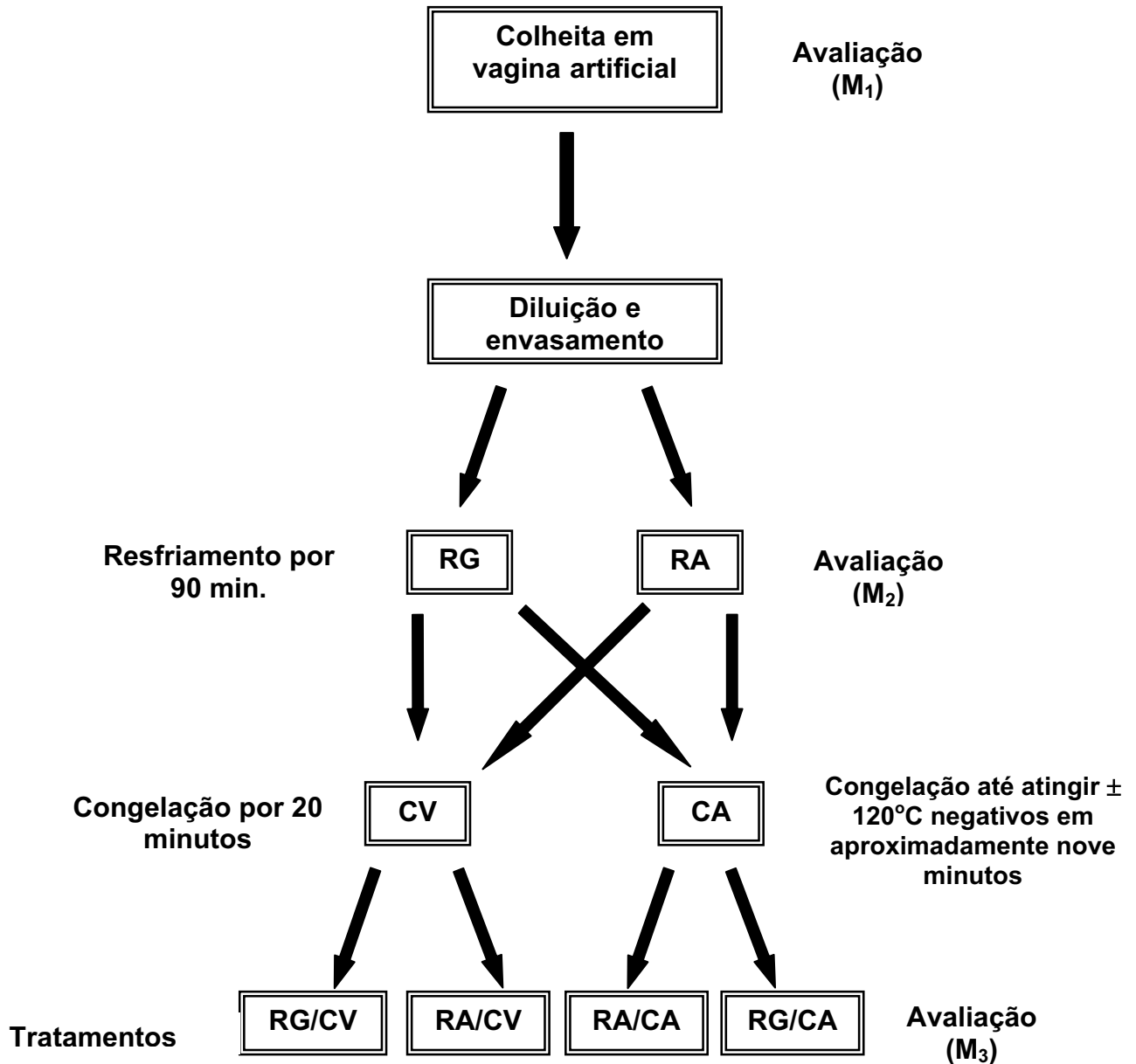


Figura 1: Fluxograma experimental do processamento do sêmen submetido aos sistemas de congelação geladeira/vapor de nitrogênio líquido (SGV) e automatizado (SA) utilizando métodos de refrigeração em geladeira (RG), ou com controle automatizado (RA) e congelação em vapor de nitrogênio líquido (CV) ou com controle automatizado (CA).

5.9. MONITORAMENTO DAS CURVAS DE REFRIGERAÇÃO E CONGELAÇÃO

As temperaturas das curvas de refrigeração e de congelação dos sistemas geladeira/vapor de nitrogênio líquido e automatizado foram aferidas com o uso de termômetro digital Digi-Sense^{®12}, cujo sensor de temperatura foi inserido dentro da palheta contendo sêmen e as duas frações do meio de congelação Glicina-Gema-Leite (GGL).

5.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Como havia interesse em se comparar momentos e grupos e as variáveis apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias, foi utilizado a análise de perfil, seguida do método de Tukey. O nível de significância utilizado foi de 5% (FISHER & BELLE, 1993).

¹² Digi-Sense[®] Thermocouple Type K, Coleparmer, USA

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O êxito da refrigeração do sêmen depende da diluição adequada, taxas de refrigeração relativamente lentas e manutenção a uma temperatura específica (SALAMON & MAXWELL, 2000; WATSON, 2000). Esses fatores deverão reduzir o metabolismo espermático, minimizar as lesões de membrana, evitando a capacitação e a reação acrossomal de forma prematura (SALAMON & MAXWELL, 2000).

Ao analisar-se o sistema de refrigeração e congelação em geladeira/vapor de nitrogênio líquido e o sistema de refrigeração e congelação com controle automatizado são importantes comparar os ritmos de queda realizados em um dos processos, para determinar as possíveis diferenças entre elas.

No presente trabalho, os ritmos de refrigeração em geladeira com bolsas de água e automatizado, apresentaram queda de temperatura gradativa, com média de 0,5°C/min de 32°C até 5°C. O ritmo de refrigeração com controle automatizado teve a sua queda de maneira homogênea sem apresentar estabilizações ou até mesmas elevações de temperatura. Gonzalez (2004) utilizando a técnica automatizada na criopreservação de sêmen bovino também constatou homogeneidade no descenso de temperatura com ritmo de resfriamento de 0,25°C/min. Observou-se homologia entre as temperaturas registrado no mostrador do equipamento e a aferição no interior da palheta. O ritmo de refrigeração em geladeira com bolsas de água, que apresentou pontos de estabilização de temperatura momentos antes das retiradas das bolsas, devido ao equilíbrio térmico estabelecido entre bolsas e interior da geladeira impedindo a penetração do frio até

as palhetas, apesar das pequenas variações de temperatura não influenciou na qualidade do sêmen (FIG. 2).

No período de refrigeração existem grandes variações na forma de se resfriar o sêmen com o uso de diferentes tipos equipamentos como geladeiras e câmaras frias ou até mesmo de forma mais simples com caixa de isopor com cubos de gelo.

A julgar pela diversidade metodológica encontrada na literatura consultada, pouca atenção tem sido destinada ao ritmo de resfriamento do sêmen a ser criopreservado. Para realizar o descenso e o tempo de equilíbrio a 5°C, o resfriamento é realizado em uma hora (PAULENZ et al., 2002), uma hora e meia (GONZALEZ, 1996), duas horas (BAG et al., 2002; GIL et al., 2003), quatro horas (MATHUR, 1991) e 14 horas (EL-ALAMY & FOOTE, 2001).

Holt & North (1984) relataram que as alterações morfológicas das membranas dos espermatozóides ovino definem pela desorganização dos lipídeos durante a fase de transição da refrigeração de 30 a 5°C. A faixa crítica para Salamon & Maxwell (2000) é de 20 a 5°C e para Watson (2000) é de 30 a 0°C. Período este de transição do estado cristalino líquido para a forma de gel, que produz uma estrutura rígida, tornando estas áreas fracas e susceptíveis a rupturas (HAMMERSTED et al., 1990) e estariam associadas às mudanças na permeabilidade e indução de danos às membranas (HOLT & NORTH, 1986).

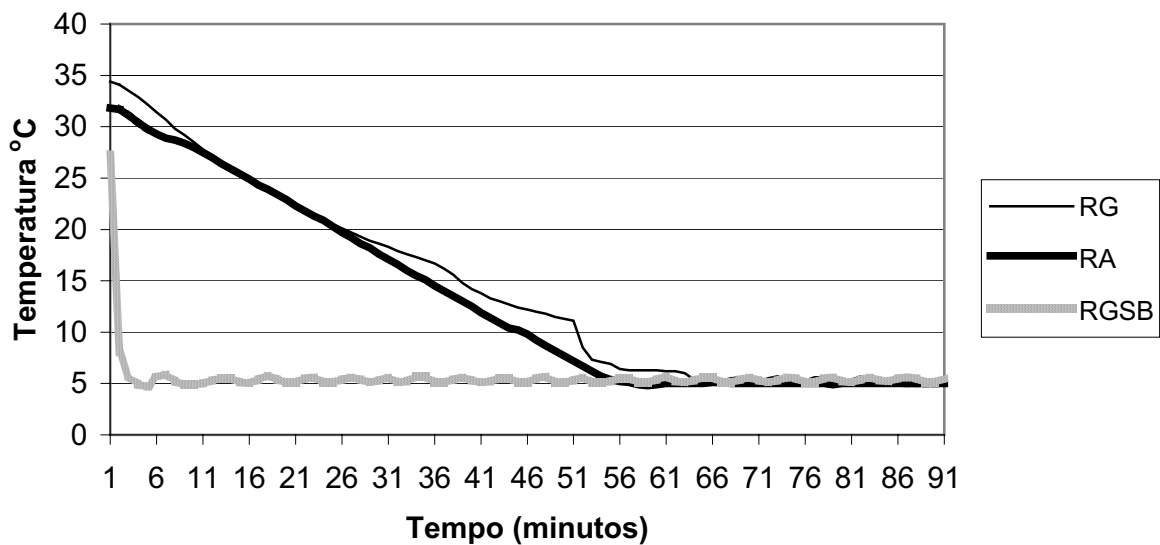


Figura 2: Curvas de refrigeração do sêmen ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$) determinadas para refrigeração em geladeira com bolsas de água (RG), refrigeração em geladeira sem bolsas de água (RGSB) e refrigeração com controle automatizado (RA).

Ao se avaliar o ritmo de refrigeração em geladeira sem bolsas de água (FIG 2), observa-se uma queda brusca partindo de 32°C até 5°C , com a queda de temperatura média no primeiro minuto foi $19,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$, estabilizando em 5°C . O resfriamento rápido do sêmen de 30 para 0°C (WATSON, 2000), ou até mesmo a redução da temperatura de 37°C para 5°C , induz a um estresse letal para algumas células, conhecido como choque térmico, na qual incluem o decréscimo da glicólise, da frutólise e conseqüentemente da respiração celular, o aumento da degeneração do DNA e a liberação para o meio extracelular de enzimas e lipídios a partir dos espermatozóides (LÓPEZ et al., 1999). White (1993) relata que a proporção de ácidos graxos insaturados/saturados nos fosfolipídeos e uma taxa de colesterol

baixa, gera membrana espermática instável, quando os espermatozóides são sensíveis ao choque térmico no período da refrigeração.

As lesões estruturais iniciam-se na membrana plasmática atingindo posteriormente a membrana acrossomal e por último as membranas mitocondriais e é manifestado no espermatozóide com movimentos em círculos ou retrógrado e presença de peças intermediárias dobradas, e muitos destes processos são considerados irreversíveis (WATSON, 2000). Assim, a utilização de queda de temperatura gradativa e homogênea é importante durante a faixa de ocorrência do choque térmico, para minimizar as lesões das membranas, possibilitando tempo para reestruturação e estabilização para os fosfolípidos da membrana plasmática, que necessita de equilíbrio entre o meio extracelular e intracelular, evitando a capacitação e a reação acrossomal de forma prematura (WATSON, 2000; SALAMON & MAXWELL, 2000).

Os ritmos de congelação em vapor de nitrogênio líquido e com controle automatizado, foram mensuradas, sendo os valores médios para cada ritmo, apresentados na Figura 3. A congelação em vapor de nitrogênio líquido apresentou uma curva em formato de parábola, observando que no primeiro minuto de exposição ao vapor de nitrogênio líquido a temperatura foi acima de 80 graus negativos, enquanto que a curva de congelação com controle automatizado exibiu uma forma linear de diminuição de temperatura, terminando a congelação em média por volta de 116 graus negativos. O ritmo de descenso da temperatura realizado pelo aparelho foi em média de 12,7°C/min. Não foi possível determinar os ritmos de queda de temperatura na congelação, segundo as especificações do fabricante, na qual numa primeira fase o aparelho realizaria uma queda de 15°C/min até 80 graus negativos e numa segunda fase uma queda de 10°C/min até 120 graus negativos.

A mais importante consequência química e física da congelação é a remoção da água do meio intracelular para o meio extracelular para a formação de gelo aumentando a concentração de soluto intracelular (WATSON, 2000). No descenso da congelação com controle automatizado (FIG.3), observou-se entre quatro e cinco minutos estabilização de temperatura, esta fase se atribui ao ponto de cristalização ou ponto de liberação de calor é requerido para a formação de gelo, ocorrendo aumento de temperatura num certo ponto no processo de congelação, devido à elevação do choque entre as partículas de água liberando de calor. Este fenômeno está correlacionado a continua mudança entre os ingredientes da solução de congelação para que ocorra o ponto eutético (MAZUR, 1984; WATSON, 2000), o mesmo não aconteceu na congelação em vapor de nitrogênio líquido.

A observação do ponto de cristalização no controle automatizado atribui-se ao ritmo de congelação neste momento de ocorrência ($-15^{\circ}\text{C}/\text{min}$), considerada lenta segundo a literatura (WATSON, 2000), não sendo suficiente para anular este fenômeno, diferentemente da congelação em vapor de nitrogênio líquido que no primeiro minuto de exposição ao vapor a temperatura ficou acima de 80 graus negativos, impossibilitando de ser registrado pelo termômetro a cristalização.

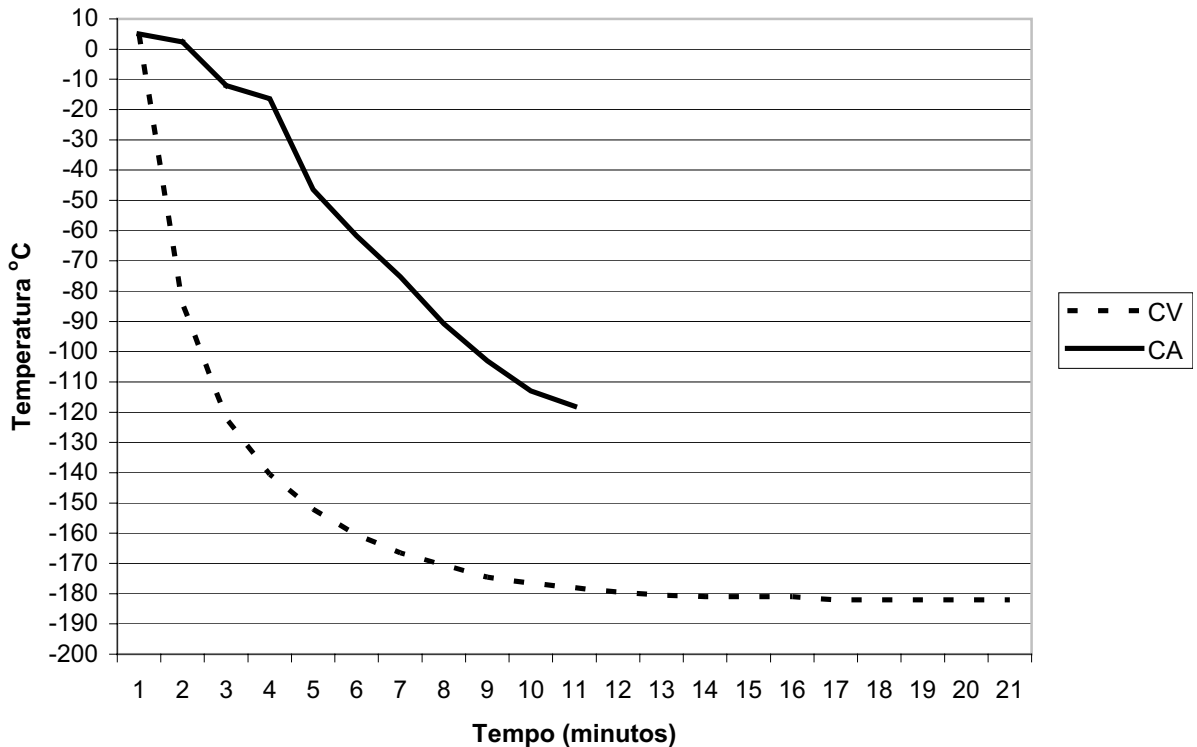


Figura 3: Curvas de congelamento do sêmen ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$) determinadas para congelamento em vapor de nitrogênio líquido (CV) e congelamento com controle automatizado (CA).

Segundo Curry & Watson (1994) durante a congelamento o estresse osmótico é um importante fator de injúria às células espermáticas, devido à exposição em condições hiperosmótica. Estas mudanças osmóticas ocorrem gradualmente ou rapidamente, dependendo do ritmo de congelamento ou do método de adição do crioprotetor.

A velocidade de congelamento influencia na desidratação celular e na formação de gelo intracelular. Num ritmo de congelamento lenta (abaixo de $-15^{\circ}\text{C}/\text{min}$) a água se difunde para o exterior da célula para atingir o equilíbrio devido à alta concentração de solutos no meio extracelular, resultando em lesões a partir da

desidratação celular excessiva (WATSON, 2000). Por outro lado, num ritmo de congelação rápida, entre $-15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$, não há tempo suficiente para permitir a saída da água intracelular, em algum ponto abaixo de -10°C , a célula sofrerá o congelamento interno. A extensão dos danos causados pelo gelo intracelular depende do grau de formação de gelo e do tamanho dos cristais (MAZUR, 1984; WATSON, 1995).

Para Spungin et al. (1995) e Brener et al. (2003), a criopreservação contribui para a desorganização das membranas espermáticas antecipando o processo de capacitação e reação acrossomal, devido à despolimerização dos filamentos de actina.

Após o sêmen a fresco e ter-se feito a diluição, foi iniciada o processo de criopreservação nos sistemas geladeira/vapor de nitrogênio líquido e com controle automatizado.

Os resultados da refrigeração do sêmen ovino em geladeira (RG) e com controle automatizado (RA) e do teste de exaustão a 37°C durante 240 minutos são apresentados nas Tabelas 2 a 5.

Comparando-se os sistemas de refrigeração em geladeira e com controle automatizado após 1 hora e 30 minutos, não se observou diferenças significativas ($P>0,05$) entre os sistemas para os parâmetros avaliados no tempo inicial (Tempo de incubação zero), apesar dos sistemas apresentarem diferenças físicas evidentes nos componentes que realizam o processo de refrigeração, foi observada perda muito pequena em relação ao sêmen a fresco (TAB 5).

A utilização de adequada taxa de refrigeração no sêmen diluído é um dos fatores para uma menor depleção da fonte energética devido à manutenção do metabolismo espermático reduzido, permitindo uma melhor qualidade do sêmen ao

final do processo de refrigeração (AMANN & PICKETT, 1987). Evitando alterações na forma das moléculas de fosfolípidos das membranas, em virtude da mudança de fase do estado líquido para gel. Possivelmente, a redução da temperatura altera o funcionamento de várias bombas ATP dependentes, dentre elas a de Na^+/K^+ , provocando despolarização parcial da membrana, com consequência abertura dos canais de cálcio, tornando as membranas acrossomal e mitocondrial permeáveis ao Ca^{++} a 5°C , primeiramente induzindo a vesiculação prematura da membrana acrossomal e depois danificando a membrana mitocondrial que está associada com motilidade (AMANN & PICKETT, 1987).

Anel et al. (2003) estudando quedas de 0,30; 0,20 e $0,25^\circ\text{C}/\text{min}$ na refrigeração com controle automatizado, obtiveram motilidade total através da análise computadorizada de $84,3\pm 8,2$; $87,6\pm 7,6$ e $89,1\pm 8,0\%$; respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados utilizando queda de $0,50^\circ\text{C}/\text{min}$ na refrigeração com controle automatizado (MT = $88,4\pm 4,7\%$).

O Teste de exaustão, proposto por Paganini Filho (1999), tem como objetivo desafiar a célula espermática num período de 240 minutos, na qual são adicionados 30% de meio no momento pós-descongelamento e mais 10% aos 120 minutos de incubação.

Tabela 2: Resumo da análise de variância dos parâmetros espermáticos do sêmen ovino refrigerado, tendo como causas de variação os sistemas de refrigeração (RG ou RA), o momento do período de incubação no teste de exaustão e a interação de ambos (Sistema x Momento).

Parâmetro	Causas de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Valor de P
Mot (%)	Sistema	1	97,0282	0,98	0,3343
	Momento	2	14234,9238	80,44	0,0000
	Sistema x Momento	2	29,5012	0,17	0,8471
Vigor (0-5)	Sistema	1	0,1127	1,26	0,2765
	Momento	2	6,9065	45,70	0,0000
	Sistema x Momento	2	0,0402	0,27	0,7681
MT (%)	Sistema	1	44,7782	0,32	0,5769
	Momento	2	16893,1621	97,36	0,0000
	Sistema x Momento	2	3,2866	0,02	0,9812
MP (%)	Sistema	1	4,5375	0,09	0,7691
	Momento	2	12224,3291	152,43	0,0000
	Sistema x Momento	2	11,0514	0,14	0,8717
VCL ($\mu\text{m/s}$)	Sistema	1	94,4695	0,98	0,3360
	Momento	2	6605,3511	25,49	0,0000
	Sistema x Momento	2	20,2900	0,08	0,9249
LIN (%)	Grupo	1	9,9507	0,09	0,7682
	Momento	2	477,4297	9,69	0,0005
	Grupo x Momento	2	17,9976	0,37	0,6969
Acros (%)	Sistema	1	7,8882	0,29	0,5981
	Momento	2	1,5114	1,81	0,1803
	Sistema x Momento	2	0,9469	1,13	0,3347
Cauda (%)	Sistema	1	3,4341	0,26	0,6204
	Momento	2	1,4226	0,43	0,6557
	Sistema x Momento	2	2,5604	0,77	0,4716
IMB (%)	Sistema	1	110,6560	0,37	0,5495
	Momento	2	8493,4902	79,15	0,0000
	Sistema x Momento	2	11,3249	0,11	0,9002

- **Análise subjetiva** – **Mot.** – motilidade e **Vigor**.
- **Análise computadorizada** – **MT** – Percentual de motilidade total; **MP** – Percentual de motilidade progressiva; **VCL** – Velocidade de deslocamento real dos espermatozoides; **LIN** – Linearidade.
- **Morfologia espermática** – **Acros** – acrossomos íntegros e **Cauda** – caudas dobradas.
- **IMB** – integridade total das membranas espermáticas em microscopia epifluorescente.

A análise do teste de exaustão permite evidenciar que o sêmen refrigerado nos sistemas geladeira e com controle automatizado apresentaram redução na maioria de seus parâmetros (Mot, vigor, MT, MP e IMB) já em 120 minutos, o que

não ocorreu com os parâmetros VCL e LIN que apresentaram redução aos 240 minutos de incubação. As porcentagens de acrossomos íntegros e caudas dobradas não sofreram alterações no decorrer do período da exaustão em ambos os sistemas.

Ao final de 240 minutos de incubação a 37°C, observou-se queda nos parâmetros de Mot, Vigor, MT, MP, VCL, LIN e IMB. Para Vishwanath & Shannon (2000), há redução do metabolismo quando o sêmen é refrigerado a 5°C, mas algumas mudanças ocorrem durante o decréscimo da temperatura, não sendo benéficas aos espermatozoides, sendo a redução da atividade das bombas de Na^+/K^+ , mesmo a 5°C permitem a difusão de íons através das membranas celulares, levando a efeitos deletérios à sobrevivência do espermatozoide.

Controlando a queda de temperatura e mantendo um padrão no momento da refrigeração, o metabolismo estaria mais reduzido, não desgastando as fontes energéticas dos espermatozoides durante o processo de refrigeração.

A redução na motilidade durante a incubação está ligado na diminuição gradual da habilidade do espermatozoide em produzir ATP através da respiração mitocondrial como consequência de danos ao metabolismo energético (VISHWANATH & SHANNON, 1997) e do efeito tóxico através da deaminação oxidativa de aminoácidos aromáticos pela ligação do aminoácido aromático oxidase (AAAO) à membrana (VISHWANATH & SHANNON, 2000).

A produção de radicais livres tem sido apontada como a principal causa de diminuição da sobrevivência e integridade espermática, formando as espécies reativas de oxigênio (ROS). Devido ao fato de que um volume de 500 µL de sêmen ter sido mantido em microtubos de fundo cônico de polipropileno de 1,5 mL, um espaço foi formado entre a tampa do microtubo e a superfície do sêmen, contendo oxigênio com a possibilidade do estabelecimento do metabolismo aeróbico ou

parcialmente aeróbico e possivelmente a formação da ROS. O ânion superóxido (O_2^-), Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical livre hidroxil (OH), são os radicais livres mais ativos principalmente com o aumento da temperatura e com o tempo de armazenamento (LAMIRANDE et al., 1997; BAG et al., 2004).

Para Maxwell & Watson (1996), a incubação do sêmen ovino a $37^{\circ}C$ durante seis horas levaria a estes processos, assim como um decréscimo significativo da fertilidade tanto do sêmen a fresco como do congelado.

Verificou-se que o parâmetro velocidade real de deslocamento (VCL), apresentou queda significativa aos 240 minutos de incubação, pelo fato de não estar correlacionada com as mudanças aeróbicas em sêmen bovino (KRZYZOSIAK et al., 1999), mas com a glicina presente no meio diluidor Glicina-Gema-Leite, possivelmente forneça uma maior quantidade de substratos energéticos para a movimentação, por atuar na via glicolítica e no processo de oxidação celular (AISEN et al., 1990).

Tabela 3: Média e desvio padrão dos parâmetros espermáticos relativos às análises subjetiva, computadorizada, da morfologia espermática e da integridade total de membranas espermáticas (IMB) do sêmen ovino refrigerado nos Sistema em geladeira (RG) ou com controle automatizado (RA) e submetido ao teste de exaustão à 37°C.

Parâmetro	Sistema	Tempo de Incubação (minuto)		
		0	120	240
Mot (%)	RG	85,3±5,8 ^a	72,6±7,6 ^b	32,0±18,4 ^c
	RA	86,3±4,2 ^a	73,9±6,8 ^b	37,3±20,1 ^c
Vigor (0-5)	RG	2,9±0,1 ^a	2,5±0,3 ^b	1,6±0,5 ^c
	RA	2,9±0,1 ^a	2,6±0,3 ^b	1,7±0,3 ^c
MT (%)	RG	87,6±4,9 ^a	71,1±9,8 ^b	30,8±19,4 ^c
	RA	88,4±4,7 ^a	73,6±8,5 ^b	29,0±18,0 ^c
MP (%)	RG	64,8±7,1 ^a	48,7±7,2 ^b	14,9±9,4 ^c
	RA	63,5±7,3 ^a	49,6±8,7 ^b	15,4±10,2 ^c
VCL (µm/s)	RG	132,5±11,5 ^a	122,7±8,2 ^a	93,7±21,5 ^b
	RA	130,4±11,9 ^a	122,5±9,9 ^a	94,7±16,3 ^b
LIN (%)	RG	76,8±3,8 ^a	75,7±3,2 ^a	65,3±14,0 ^b
	RA	76,4±3,4 ^a	74,9±3,5 ^a	69,7±12,3 ^b
Acros (%)	RG	92,9±3,0 ^a	93,1±3,2 ^a	92,5±2,6 ^a
	RA	93,9±2,9 ^a	93,1±3,6 ^a	92,7±2,9 ^a
Cauda (%)	RG	9,9±2,4 ^a	10,0±2,5 ^a	9,9±2,2 ^a
	RA	8,9±2,5 ^a	9,4±2,2 ^a	8,8±2,1 ^a
IMB (%)	RG	70,9±9,2 ^a	55,7±16,6 ^b	26,5±14,2 ^c
	RA	72,3±9,6 ^a	57,6±14,6 ^b	26,1±9,6 ^c

Letras para o mesmo parâmetro comparam tempos de incubação.

Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente no teste de Tukey (P> 0,05).

▪ **Análise subjetiva – Mot.** – motilidade e **Vigor**.

▪ **Análise computadorizada (CASA) – MT** – Percentual de motilidade total; **MP** – Percentual de motilidade progressiva; **VCL** – Velocidade de deslocamento real dos espermatozoides; **LIN** – Linearidade.

▪ **Morfologia espermática – Acros** – acrossomos íntegros e **Cauda** – caudas dobradas.

▪ **IMB** – integridade total das membranas espermáticas em microscopia epifluorescente.

RG – Refrigeração em geladeira; RA – Refrigeração com controle automatizado.

No teste de exaustão não foi acrescido de 30% do meio diluente à alíquota inicial e nem de 10% do meio diluidor aos 120 e 240 minutos de incubação, conforme os experimentos de Paganini Filho, (1999), ficando assim, sem reposição

de elementos como a glicina e frutose, para a manutenção da sobrevivência espermática nas amostras incubadas.

Tabela 4: Resumo da análise de variância da taxa de degradação das motilidades subjetiva (Mot) e computadorizada (MT) e integridade total de membranas espermáticas (IMB), no sêmen ovino refrigerado tendo como causas de variação o sistema de refrigeração (RG ou RA), momento do período de incubação no teste de exaustão e interação de ambos (Sistema x Momento).

Parâmetro	Causas de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Valor de p
Mot (%)	Sistema	1	134,7002	0,63	0,4372
	Momento	2	18130,53	85,91	0,0000
	Sistema x Momento	2	40,12517	0,19	0,8277
MT (%)	Sistema	1	60,000	0,29	0,5970
	Momento	2	20510,227	102,42	0,0000
	Sistema x Momento	2	4,567	0,02	0,9775
IMB (%)	Sistema	1	212,4402	0,53	0,4761
	Momento	2	15607,24	101,70	0,0000
	Sistema x Momento	2	0,472167	0,00	0,9969

- **Análise subjetiva – Mot.** – motilidade.
- **Análise computadorizada – MT** – Percentual de motilidade total.
- **RG** – Refrigeração em geladeira; **RA** – Refrigeração com controle automatizado.
- **IMB** – integridade total das membranas espermáticas em microscopia epifluorescente.

Segundo Pontbriand et al. (1989) a prolongada incubação dos espermatozóides causa deterioração e mudanças do acrossomo de espermatozóides de ovino. Bag et al. (2004), observaram ao final de 240 minutos de incubação diminuição na porcentagem de acrossomos íntegros (48,9%), no entanto, o presente estudo não apresentou diminuição dos acrossomos íntegros com 92,5±2,6% para a refrigeração em geladeira e 92,7±2,9% para a refrigeração com controle automatizado ao final do período de incubação.

Os meios diluidores com gema de ovo conferem maior porcentagem de espermatozóides com os acrossomos íntegros comparados com meio diluidores que contem leite (SALAMON & MAXWELL, 2000). A gema de ovo contem fosfolipídeos e

lecitina que possibilita proteção a membrana espermática contra o choque térmico (WATSON, 1995) e atua prevenindo mudanças degenerativas do acrossomo (SALAMON & MAXWELL, 2000). Sousa (2002) utilizando o sistema Equitainer^{®13} na refrigeração do sêmen ovino por 24 e 48 horas com o meio diluidor Glicina-Gema-Leite, observou 95,7% ($P>0,05$) de acrossomos íntegros refrigerado por 24 horas e 95,2% ($P>0,05$) de acrossomos íntegros refrigerado por 48 horas.

Tabela 5: Taxa de degradação média (%) e desvio padrão das motilidades subjetiva (Mot) e computadorizada (MT) e integridade total de membranas espermáticas (IMB) durante o teste de exaustão à 37°C do sêmen ovino refrigerado nos Sistema de refrigeração em geladeira (RG) ou com controle automatizado (RA).

Parâmetro	Sistema	Degradação (%)/Tempo de Incubação (minuto)		
		0	120	240
Mot	RG	1,5±3,1 ^a	16,8±7,5 ^b	61,8±24,5 ^c
	RA	1,2±2,6 ^a	14,6±6,9 ^b	61,2±20,9 ^c
MT	RG	2,7±3,5 ^a	21,1±10,3 ^b	65,4±22,2 ^c
	RA	2,1±2,4 ^a	18,4±9,4 ^b	67,4±21,0 ^c
IMB	RG	10,7±10,3 ^a	28,7±18,2 ^b	65,7±18,3 ^c
	RA	7,2±8,7 ^a	26,3±15,9 ^b	66,0±12,6 ^c

Letras para o mesmo parâmetro comparam tempos de incubação.

Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente no teste de Tukey ($P>0,05$).

- **Análise subjetiva – Mot.** – motilidade.
 - **Análise computadorizada – MT** – Percentual de motilidade total.
 - **IMB** – integridade total das membranas espermáticas em microscopia epifluorescente.
- RG – Refrigeração em geladeira; RA – Refrigeração com controle automatizado.

Durante o descenso de temperatura entre 5°C e -50°C, o ritmo de congelação determina se as células espermáticas permanecerão em equilíbrio com seu meio extracelular ou progridem para uma supercongelação com o possível aumento de gelo intracelular.

¹³ Hamilton-Thorne Research, Beverly, MA, USA

Após a refrigeração, realizou-se troca de palhetas entre os sistemas de refrigeração em (RG) e com controle automatizado (RA), formando os sistemas com refrigeração em geladeira e congelação com controle automatizado (RG/CA) e refrigeração com controle automatizado e congelação em vapor de nitrogênio líquido (RA/CV), proporcionando a interação entre os sistemas para retirar o efeito entre a refrigeração e congelação dos sistemas geladeira/vapor de nitrogênio líquido (RG/CV) e com controle automatizado (RA/CA).

Verificou-se que não houve diferenças significativas ($P>0,05$) entre os sistemas em nenhum dos parâmetros avaliados no momento zero, mostrando que as etapas de refrigeração em geladeira e com controle automatizado e a congelação em vapor de nitrogênio líquido e com controle automatizado mantiveram os mesmos padrões durante o processo de criopreservação (TAB. 7 e TAB. 8).

Os resultados da avaliação do sêmen ovino dos sistemas de congelação em vapor de nitrogênio líquido e com controle automatizado são apresentados nas Tabelas 6 a 10.

Os danos básicos que os espermatozoides sofrem durante o processo de congelação podem ser ultra-estruturais ou físicos, bioquímicos ou funcionais (SALAMON & MAXWELL, 1995), restando com motilidade pós-descongelação de 40 a 60% (SALAMON & MAXWELL, 2000).

Os sistemas refrigeração em geladeira e congelação em vapor de nitrogênio líquido, refrigeração em geladeira e congelação com controle automatizado, refrigeração com controle automatizado e congelação em vapor de nitrogênio líquido e refrigeração e congelação com controle automatizado, apresentaram similaridade na motilidade total através da análise computadorizada

com $47,9 \pm 14,0$; $43,5 \pm 10,6$; $49,7 \pm 13,5$; $50,3 \pm 11,7$ ($P > 0,05$), respectivamente pós-descongelação.

Tabela 6: Resumo da análise de variância dos parâmetros espermáticos do sêmen ovino, tendo como causas de variação o sistema de congelação em vapor de nitrogênio líquido (CV) ou com controle automatizado (CA), momento do período de incubação no teste de exaustão e interação de ambos (Sistema x Momento).

Parâmetro	Causas de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Valor de p
Mot (%)	Sistema	3	230,0402	0,43	0,7350
	Momento	2	2917,063	67,90	0,0000
	Sistema x Momento	6	9,753222	0,23	0,9667
Vigor (0-5)	Sistema	3	0,0011	0,01	0,9995
	Momento	2	1,8146	38,48	0,0000
	Sistema x Momento	6	0,0104	0,22	0,9693
MT (%)	Sistema	3	212,9500	0,43	0,7345
	Momento	2	4056,9265	230,17	0,0000
	Sistema x Momento	6	11,1387	0,63	0,7042
MP (%)	Sistema	3	131,8262	0,78	0,5132
	Momento	2	2393,4878	148,41	0,0000
	Sistema x Momento	6	9,4461	0,59	0,7406
VCL ($\mu\text{m/s}$)	Sistema	3	46,6476	0,30	0,8250
	Momento	2	413,8296	14,64	0,0000
	Sistema x Momento	6	19,7060	0,70	0,6527
LIN (%)	Sistema	3	10,0843	0,14	0,9333
	Momento	2	240,0583	15,79	0,0000
	Sistema x Momento	6	6,1889	0,41	0,8720
Acros (%)	Sistema	3	1,2883	0,09	0,9644
	Momento	2	0,8043	0,47	0,6245
	Sistema x Momento	6	0,2812	0,17	0,9851
Cauda (%)	Sistema	3	3,5736	0,32	0,8080
	Momento	2	1,4470	0,88	0,4176
	Sistema x Momento	6	0,6066	0,37	0,8954
IMB (%)	Sistema	3	94,6033	0,48	0,6994
	Momento	2	266,4247	61,82	0,0000
	Sistema x Momento	6	1,3698	0,32	0,9257

- **Análise subjetiva** – **Mot.** – motilidade e **Vigor**.
- **Análise computadorizada** – **MT** – Percentual de motilidade total; **MP** – Percentual de motilidade progressiva; **VCL** – Velocidade de deslocamento real dos espermatozoides; **LIN** – Linearidade.
- **Morfologia espermática** – **Acros** – acrossomos íntegros e **Cauda** – caudas dobradas.
- **IMB** – integridade total das membranas espermáticas em microscopia epifluorescente.

Gonzalez (2004) utilizando os crioprotetores glicerol, dimetilformamida e etilenoglicol com as técnicas convencional e automatizada na criopreservação de sêmen bovino, obteve as melhores médias de motilidade espermática pós-descongelação com o uso do glicerol, com 30,6% para a técnica convencional e 30,5% com a técnica automatizada.

A análise dos resultados do teste de exaustão permite evidenciar que o sêmen congelado em todos os sistemas apresentou redução de qualidade na maioria de seus parâmetros (Mot, Vigor, MT, MP, LIN e IMB) já aos 120 minutos. O VCL apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) aos 240 minutos de incubação. Já os parâmetros acrossomos íntegros (Acros) e caudas dobradas (Cauda), não sofreram alterações no decorrer do período do teste de exaustão para todos os sistemas estudados. Bag et al. (2004) analisando o efeito da incubação na cinética espermática de espermatozóide ovino criopreservado, também obtiveram queda significativa na motilidade espermática ao final de 240 minutos de incubação a 37°C.

O comportamento dos espermatozoides nos parâmetros avaliados foi semelhante no teste de exaustão após a refrigeração e/ou congelação, porém em patamares diferentes.

As quedas da motilidade, a diminuição da sobrevivência e da integridade espermática na congelação, foram descritos anteriormente segundo os autores Vishwanath & Shannon (1997); Lamirande et al. (1997); Vishwanath & Shannon (2000) e Bag et al. (2004).

Tabela 7: Média e desvio padrão dos parâmetros espermáticos quanto às análises subjetiva e computadorizada do sêmen ovino congelado nos Sistema em vapor de nitrogênio líquido (CV) ou com controle automatizado (CA) submetido ao teste de exaustão a 37°C.

Parâmetro	Sistema	Tempo de Incubação (minuto)		
		0	120	240
Mot (%)	RG/CV	50,1±9,9 ^a	40,1±15,0 ^b	32,1±17,1 ^c
	RG/CA	42,1±8,1 ^a	35,1±16,3 ^b	27,8±14,9 ^c
	RA/CV	46,8±10,4 ^a	37,6±16,8 ^b	29,1±17,2 ^c
	RA/CA	50,3±10,7 ^a	40,0±15,3 ^b	32,1±16,8 ^c
Vigor (0-5)	RG/CV	2,2±0,3 ^a	2,0±0,2 ^b	1,8±0,3 ^c
	RG/CA	2,3±0,3 ^a	2,0±0,2 ^b	1,8±0,3 ^c
	RA/CV	2,2±0,3 ^a	2,1±0,3 ^b	1,8±0,2 ^c
	RA/CA	2,2±0,3 ^a	2,0±0,2 ^b	1,8±0,2 ^c
MT (%)	RG/CV	47,9±14,0 ^a	39,0±15,3 ^b	28,0±13,7 ^c
	RG/CA	43,5±10,6 ^a	33,7±11,8 ^b	25,0±12,1 ^c
	RA/CV	49,7±13,5 ^a	38,3±16,8 ^b	27,9±14,4 ^c
	RA/CA	50,3±11,7 ^a	40,4±13,7 ^b	30,3±11,5 ^c
MP (%)	RG/CV	29,3±9,5 ^a	21,5±9,6 ^b	14,5±8,6 ^c
	RG/CA	25,3±7,3 ^a	17,9±7,5 ^b	10,9±6,3 ^c
	RA/CV	29,9±9,3 ^a	22,5±10,9 ^b	12,9±7,0 ^c
	RA/CA	29,1±8,8 ^a	21,1±7,4 ^b	13,3±5,4 ^c
VCL (µm/s)	RG/CV	106,3±8,0 ^a	105,4±8,2 ^a	101,1±9,7 ^b
	RG/CA	105,6±6,4 ^a	104,6±7,6 ^a	99,4±11,4 ^b
	RA/CV	108,3±8,8 ^a	107,9±8,1 ^a	101,0±6,9 ^b
	RA/CA	105,2±8,6 ^a	103,8±7,7 ^a	99,1±6,7 ^b
LIN (%)	RG/CV	81,3±3,7 ^a	76,5±3,4 ^b	76,0±4,4 ^b
	RG/CA	78,9±3,9 ^a	76,2±6,4 ^b	73,6±6,6 ^b
	RA/CV	78,1±7,3 ^a	75,5±6,4 ^b	74,8±4,9 ^b
	RA/CA	80,0±4,4 ^a	77,0±9,4 ^b	74,2±5,6 ^b

Letras para o mesmo parâmetro comparam tempos de incubação.

Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente no teste de Tukey (P> 0,05).

▪ **Análise subjetiva – Mot.** – motilidade e **Vigor**.

▪ **Análise computadorizada (CASA) – MT** – Percentual de motilidade total; **MP** – Percentual de motilidade progressiva;

VCL – Velocidade de deslocamento real dos espermatozoides; **LIN** – Linearidade.

RG/CV – Refrigeração em geladeira e congelamento em vapor de N₂L; **RG/CA** - Refrigeração em geladeira e congelamento com controle automatizado; **RA/CV** – Refrigeração com controle automatizado e congelamento em vapor de N₂L; **RA/CA** - Refrigeração e congelamento com controle automatizado

Durante o teste de exaustão, os acrossomos íntegros não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos e os momentos de incubação. A gema de ovo estaria possivelmente atuando de maneira semelhante durante a refrigeração (SALAMON & MAXWELL, 2000).

Na refrigeração em geladeira e congelação em vapor de nitrogênio líquido, refrigeração em geladeira e congelação com controle automatizado, refrigeração com controle automatizado e congelação em vapor de nitrogênio líquido e refrigeração e congelação com controle automatizado a integridade das membranas espermática pós-descongelação foram de $27,2 \pm 8,1$; $23,3 \pm 8,1$; $25,5 \pm 7,1$ e $27,4 \pm 7,5$ ($P > 0,05$), respectivamente, onde Salamon & Maxwell (2000) relatam que somente 20 a 30% dos espermatozóides mantem-se com as membranas íntegras após a criopreservação.

A ocorrência de fluorescência verde e fluorescência vermelha nos espermatozóides indica que suas membranas permaneceram íntegras ou danificadas, respectivamente, conforme o processo de criopreservação, confirmada com as citações de Garner et al. (1986) e Harrison & Vickers (1990) quando descreveram o mecanismo de ação das sondas fluorescentes do Diacetato de carboxifluoresceína (DIC) e do Iodeto de propídio (IP). Holt & North (1986), descreveram que danos às membranas espermáticas durante as fases de refrigeração e congelação, nas quais os espermatozóides são expostos e a membrana espermática sofre alterações na forma das moléculas de fosfolipídios resultando em aumento da permeabilidade, o que podemos confirmar em neste estudo com a utilização das sondas fluorescentes no sêmen pós-descongelação.

Tabela 8: Média e desvio padrão dos parâmetros espermáticos quanto à morfologia espermática e integridade total de membranas espermáticas (IMB) do sêmen ovino congelado nos Sistema de congelação em vapor de nitrogênio líquido (CV) ou com controle automatizado (CA) e submetido ao teste de exaustão a 37°C.

Parâmetro	Sistema	Tempo de Incubação (minuto)		
		0	120	240
Acros (%)	RG/CV	89,4±3,0 ^a	88,8±2,1 ^a	88,7±2,0 ^a
	RG/CA	89,2±2,6 ^a	89,4±2,1 ^a	89,2±1,4 ^a
	RA/CV	89,5±3,0 ^a	89,2±1,7 ^a	89,3±2,2 ^a
	RA/CA	89,4±3,5 ^a	89,4±2,3 ^a	89,3±2,1 ^a
Cauda (%)	RG/CV	9,6±1,3 ^a	8,9±1,1 ^a	9,6±1,7 ^a
	RG/CA	9,4±1,9 ^a	9,2±2,1 ^a	9,7±2,1 ^a
	RA/CV	9,8±1,6 ^a	9,8±1,4 ^a	9,4±1,7 ^a
	RA/CA	9,6±1,1 ^a	9,3±1,3 ^a	9,3±2,0 ^a
IMB (%)	RG/CV	27,2±8,1 ^a	24,3±8,8 ^b	21,7±8,7 ^c
	RG/CA	23,3±8,1 ^a	21,0±7,9 ^b	19,0±8,2 ^c
	RA/CV	25,5±7,1 ^a	23,0±9,1 ^b	19,4±9,4 ^c
	RA/CA	27,4±7,5 ^a	25,7±8,0 ^b	23,1±8,7 ^c

Letras para o mesmo parâmetro comparam tempos de incubação.

Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente no teste de Tukey ($P > 0,05$).

▪ **Morfologia espermática** – Acros – acrossomos íntegros e Cauda – caudas dobradas.

▪ **IMB** – integridade total das membranas espermáticas em microscopia epifluorescente.

RG/CV – Refrigeração em geladeira e congelação em vapor de N₂L; **RG/CA** - Refrigeração em geladeira e congelação com controle automatizado; **RA/CV** – Refrigeração com controle automatizado e congelação em vapor de N₂L; **RA/CA** - Refrigeração e congelação com controle automatizado

Segundo Valcárcel et al. (1994), a determinação da integridade das membranas espermáticas após a congelação do sêmen, utilizando as sondas fluorescentes, representa um método eficaz para avaliação da viabilidade espermática.

Tabela 9: Resumo da análise de variância da taxa de degradação das motilidades subjetiva (Mot) e computadorizada (MT) e integridade total de membranas espermáticas (IMB), no sêmen ovino tendo como causas de variação o sistema de congelação em vapor de nitrogênio líquido (CV) ou com controle automatizado (CA), momento do período de incubação no teste de exaustão a 37°C e interação de ambos (Sistema x Momento).

Parâmetro	Causas de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Valor de p
Mot (%)	Sistema	3	307,4417	0,52	0,6741
	Momento	2	3955,081	64,91	0,0000
	Sistema x Momento	6	11,92689	0,20	0,9770
MT (%)	Sistema	3	260,063	0,49	0,6936
	Momento	2	5049,049	217,01	0,0000
	Sistema x Momento	6	14,26756	0,61	0,7190
IMB (%)	Sistema	3	160,813	0,63	0,6017
	Momento	2	448,9011	61,62	0,0000
	Sistema x Momento	6	2,624972	0,36	0,9016

- **Análise subjetiva – Mot.** – motilidade.
- **Análise computadorizada – MT** – Percentual de motilidade total.
- **IMB** – integridade total das membranas espermáticas em microscopia epifluorescente.

Num processo de criopreservação a motilidade pós-descongelação varia de 40 a 60% e somente 20 a 30% mantem-se com as membranas espermáticas íntegras (SALAMON & MAXWELL, 2000). Dessa forma, os resultados do presente estudo mostraram que a conduta de criopreservação de sêmen em todos os sistemas foi eficiente para a manutenção da funcionalidade pós-descongelação dos espermatozóides (TAB. 7 e TAB. 8), com isso pode-se traçar um paralelo entre o sêmen fresco e o congelado demonstrado pela taxa de degradação (TAB. 10).

Tabela 10: Taxa de degradação média (%) e desvio padrão das motilidades subjetiva (Mot) e computadorizada (MT) e integridade total de membranas espermáticas (IMB) durante o teste de exaustão à 37°C do sêmen ovino nos Sistemas de congelamento em vapor de nitrogênio líquido (CV) ou com controle automatizado (CA).

Parâmetro	Sistema	Degradação(%) / Tempo de Incubação (minuto)		
		0	120	240
Mot	RG/CV	43,5±10,3 ^a	55,8±18,3 ^b	64,1±19,1 ^c
	RG/CA	50,9±8,9 ^a	59,3±16,4 ^b	68,6±16,1 ^c
	RA/CV	46,9±10,7 ^a	57,2±18,1 ^b	67,0±18,8 ^c
	RA/CA	42,1±11,4 ^a	52,2±15,6 ^b	60,9±17,2 ^c
MT	RG/CV	47,0±14,3 ^a	56,9±16,1 ^b	69,2±14,5 ^c
	RG/CA	51,8±10,8 ^a	62,7±12,2 ^b	72,5±12,8 ^c
	RA/CV	45,0±13,7 ^a	57,6±18,1 ^b	69,3±15,2 ^c
	RA/CA	44,4±12,1 ^a	55,4±14,3 ^b	66,6±12,0 ^c
IMB	RG/CV	65,0±9,5 ^a	68,9±10,3 ^b	72,1±10,2 ^c
	RG/CA	70,2±9,2 ^a	73,1±9,3 ^b	75,7±9,6 ^c
	RA/CV	67,4±7,4 ^a	70,7±10,4 ^b	75,3±11,0 ^c
	RA/CA	65,1±8,2 ^a	67,2±9,1 ^b	70,6±9,9 ^c

Letras para o mesmo parâmetro comparam tempos de incubação.

Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente no teste de Tukey (P > 0,05).

- **Análise subjetiva – Mot.** – motilidade.
- **Análise computadorizada (CASA) – MT** – Percentual de motilidade total.
- **IMB** – integridade total das membranas espermáticas em microscopia epifluorescente.

RG/CV – Refrigeração em geladeira e congelamento em vapor de N₂L; **RG/CA** - Refrigeração em geladeira e congelamento com controle automatizado; **RA/CV** – Refrigeração com controle automatizado e congelamento em vapor de N₂L; **RA/CA** - Refrigeração e congelamento com controle automatizado

A automação viabiliza a formulação de hipóteses e objetivos mais pontuais e de maior especificidade e conseqüentemente o desenvolvimento de metodologias que esclareçam com maior profundidade os eventos inerentes às células espermáticas ovina durante a criopreservação e a fertilização *in vivo*.

7. CONCLUSÕES

Diante das condições experimentais e com base nos dados obtidos, pode-se concluir:

- O ritmo de refrigeração com controle automatizado teve regularidade no descenso de temperatura, perfazendo com 0,5°C/min.
- A utilização de bolsas plásticas contendo água durante o processo de refrigeração em geladeira controla o descenso no resfriamento, obtendo uma média 0,5°C/min em sua queda.
- As temperaturas registradas no “display” do aparelho e os ritmos de descenso, não demonstraram fidelidade comparada com a temperatura mensurada com termômetro no interior da palheta durante a congelação.
- O sistema automatizado de refrigeração e congelação, de fabricação nacional *TK 3000*[®] fisicamente atendeu as condições inerentes a criopreservação do sêmen ovino.
- A refrigeração e a congelação com controle automatizado mostraram semelhantes à refrigeração em geladeira e congelação em vapor de nitrogênio líquido, na pós-descongelação e durante o período do teste de exaustão à 37°C/240 minutos, quanto aos parâmetros avaliados *in vitro*.

- O sistema automatizado de refrigeração e congelação, de fabricação nacional *TK 3000*[®], é viável para realizar a criopreservação do sêmen ovino, comparativamente ao sistema de refrigeração e de congelação pelo método geladeira/vapor de nitrogênio líquido.

8. REFERÊNCIAS

AISEN, E.G., CISALE, H., FERNANDEZ, H. Criopreservacion de semen ovino. Nueva técnica. **Vet. Argent.**, v.7, p.176-82, 1990.

AITKEN, R.J., PATERSON, M., FISHER, H., BUCKINGHAM, D.W., VAN DU, M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. **J. Cell Sci.**, v.180, p.2017-2025, 1995.

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

ANEL, L., DE PAZ, P., ÁLVAREZ, M., CHAMORRO, C.A., BOIXO, J.C., MANSO, A., GONZÁLEZ, M., KAABI, M., ANEL, E. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. **Theriogenology**, v.60, p.1293-1308, 2003.

ANEL, S., JOSHI, A., NAQVI, S.M.K., RAWAT, P.S., MITTAL, J.P. Effect of freezing temperature, at which straws were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.**, v.72, p.175-83, 2002.

ARAV, A., YAVIN, S., ZERON, Y., NATAN, D., DEKEL, I., GACITUA, H. New trends in gamete's cryopreservation. **Mol. Cel. Endocrin.**, v.187, p.77-81, 2002.

BAG, S., JOSHI, A., NAQVI, S.M.K., RAWAT, P.S., MITTAL, J.P. Effect of freezing temperature, at which straws were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.**, v.72, p.175-183, 2002.

BAG, S., JOSHI, A., NAQVI, S.M.K., MITTAL, J.P. Effect of post-thaw incubation on sperm kinematics and acrosomal integrity of ram spermatozoa cryopreserved in medium-sized french straws. **Theriogenology**, v.62, p.415-24, 2004.

BAILEY, J.L., BILODEAU, J.F., CORMIER, N. Semen, cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **J. Androl.**, v.21, p.1-6, 2000.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nord. Veterinaarmed.**, v.25, p.382-391, 1973.

BRENER, E., RUBINSTEIN, S., COHEN, G., SHTERNALL, K., RIVLIN, J., BREITBART, H. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. **Bio. Reprod.**, v.68, p.837-45, 2003.

BYRNE, G.P., LONERGAN, P., WADE, M., DUFFY, P., DONOVAN, A., HANRAHAN, J.P., BOLAND, M.P. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. **Animal Reproduction Science.**, v.62, p.265-275, 2000.

CORTEEL, J.M. L'Insémination artificielle caprine: bases physiologiques, état actuel et perspectives d'avenir. **World Rev. Anim. Prod.**, v.9, p.73-99, 1973.

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

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

DOULGAS-HAMILTON, D.H., OSOL, R., OSOL,G. A field study of the fertility transported equine semen. **Theriogenology**, v.22, n.3, p.291-304, 1984.

EL-ALAMY, M.A., FOOTE, R.H. Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. **Anim. Reprod. Sci.**, v.65, p.245-254, 2001.

EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. **Inseminación artificial de ovejas y cabras**. Zaragoza, Acribia, 191p, 1990.

FERREIRA, J.C.P. **Avaliação subjetiva e computadorizada do movimento espermático pós-descongelção do sêmen eqüino**. Botucatu, 2000. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

FISHER, L.D.; BELLE, G.V. **Biostatistics A Methodology for the health Sciences**. Wiley-Interscience, New York, 991p, 1993.

FONSECA, V.O., VALE FILHO, V.R., MIES FILHO, A. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1992, 40p.

GARNER, D.L., THOMAS, C.A., GRAVANCE, C.G. The effect of glucerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. **Reprod. of Domest. Anim.**, v.34, p.399-404, 1999.

GARNER, D.L., THOMAS, C.A., JOERG, H.W., DEJARNETTE, J.M., MARSHALL, C.E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v.57, p.1401-1406, 1997.

GARNER, D.L., PINKEL, D., JOHNSON, L.A., PACE, M.M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biol. Reprod.**, v.34, p.127-138, 1986.

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

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**. Pirassununga, 2004. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

GONZALEZ, C.I.M. **Avaliação “in vitro” e “in vivo” de sêmen ovino (*Ovis aries*)**

congelado em palhetas e “pellets” com diferentes diluidores. Botucatu, 1996.

Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

GRAHAM, J.K. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, v.12, p.119-129, 1996.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal.** 6. ed. São Paulo: Manole, 1995, 582p.

HAMMERSTED, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **J. of Andrology**, v.11, n.1, p.73-88, 1990.

HANCOCK, J.L. The morphology of boar spermatozoa. **J. R. Microsc. Soc.**, v.76, p.84-97, 1957.

HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **J. Reprod. Fert.**, v.88, p.343-52, 1990.

HOLT, W.V. Basic aspect of frozen storage of semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.62, p.3-22, 2000.

HOLT, W.V., NORTH, R.D. Thermotropic phase transitions in plasma membrane of ram spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v.78, p.447-457, 1986.

HOLT, W.V., NORTH, R.D. Determination of lipid composition and thermal phase transitions temperature in an enriched plasma membrane fraction from ram spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v.73, p.285-294, 1985.

HOLT, W.V., NORTH, R.D. Partially irreversible cold induce lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze fracture study. **J. Exp. Zool.**, v.230, p.473-483, 1984.

KRYZOSIAK, J., MOLSAN, P., VISWANATH, R. Measurement of bovine sperm velocities under true anaerobic and aerobic conditions. **Anim. Reprod. Sci.**, v.55, p.163-73, 1999.

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.246-253, 2003.

LAMIRANDE, E., JIANG, H., ZINI, A., KODAMA, H., GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **J. Reprod. Fertil.**, v.2, p.48-54, 1997.

LÓPEZ, A., SÖDERQUIST, L., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm viability in ram semen diluted and stored in three different extenders. **Acta Vet. Scand.**, v.40, p.1-9, 1999.

MALMGREM, L. Assessing the quality of raw semen: a review. **Theriogenology**, v.48, p.523-530, 1997.

MARTINEZ-PASTOR, F., JOHANNISSON, A., GIL, J., KAABI, M., ANEL, L., PAZ, P., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.84, p.121-133, 2004.

MATHUR, A.K. Effect of extension rate on the cryosurvival of ram spermatozoa. **Int. J. Anim. Sci.**, v.6, p.82-83, 1991.

MAXWELL, W.M.C., WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.42, p.55-65, 1996.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **Am. Physiol. Soc.**, p.125-142, 1984.

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

MIES FILHO, A. **Inseminação artificial**, 6.ed. Porto Alegre: Sulina, 1987, v.2.

NEILD, D., CHAVES, G., FLORES, M., MORA, N., BECONI, M., AGÜERO, A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.51, p.721-727, 1999.

OEHNINGER, S., DURU, N.K., SRISOMBUT, C., MORSHEDI, M. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.169, p.3-10, 2000.

OLLERO, M., PEREZ-PE, R., MUIÑO-BLANCO, T., CEBRIAN-PEREZ, J.A. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. **Cryobiology**, v.37, p.1-12, 1998.

PAGANINI FILHO, P. **Estudo da viabilidade do sêmen ovino frente a três diluentes em temperatura de 37°C e sob refrigeração.** Botucatu, 1999. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

PAULENZ, H., SÖDERQUIST, L., PÉREZ-PÉ, R., BERG, K.A. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. **Theriogenology**, v.57, p.823-836, 2002.

PÉREZ, L.J., VALCÁRCEL, A., DE LAS HERAS, M.A., MOSES, D.F., BALDASSARRE, H. In vitro capacitation and induction of acrosomal exocytosis in ram spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay. **Theriogenology**, v. 45, p. 1037-1046, 1996.

PONTBRIAND, D., HOWARD, J.G., MAXIMUM, M.C., STUART, L.D., WILDT, D.E. Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. **Cryobiology**, v.26, p.341-54, 1989.

- SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen. Review I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Anim. Reprod. Sci.**, v.37, p.185-249, 1995.
- SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.62, p.77-111, 2000.
- SINGER, S.J., NICHOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v.175, p.720-731, 1972.
- SOUSA, D.B. **Viabilidade do sistema Equitainer[®] na refrigeração do sêmen ovino avaliado pelas análises computadorizada, de microscopia epifluorescente e inseminação artificial.** Botucatu, 2002. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
- SOUSA, D.B., BICUDO, S.D., PAPA, F.O., FERREIRA, J.C.P., MARQUES, M.O. Estudo comparativo de dois métodos de colheita do sêmen ovino (vagina artificial e eletroejaculação) utilizando-se a análise computadorizada HTM-IVOS 10, **In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP**, 10, 1998, Araraquara. *Anais...* Araraquara: PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DA UNESP, 1998, p.375.

SPUNGIN, B., MARGALIT, I., BREITBART, H. Sperm exocytosis reconstructed in a cell free system. Evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. **J. Cell Sci.**, v.108, p.2525-35, 1995.

TULI, R.K., SCHMIDT-BAULAIN, R., HOLTZ, W. Computer-assisted motility assessment of spermatozoa from fresh and frozen-thawed semen of bull, boar and goat. **Theriogenology**, v.38, p.487-490, 1992.

VALCÁRCEL, A., DE LAS HERAS, M.A., PÉREZ, L.J.;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.

VALCÁRCEL, A., DE LAS HERAS, M. A., PÉREZ, L., MOSES, D.F., BALDASSARRE, H. Assessment of acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. **Anim. Reprod. Sci.**, v.45, p.299-309, 1997.

VISHWANATH, R., SHANNON, P. Do sperm cells age? A review of the physiological change in sperm during storage at ambient temperature. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.9, p.321-31, 1997.

VISHWANATH, R., SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Anim. Reprod. Sci.**, v.62, p.23-53, 2000.

WATSON, P.F. The causes of reduce fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-1, p.481-492, 2000

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the preservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.7, p.871-91, 1995.

WATSON, P.F., MARTIN, I.C.A. A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v.28, p.99-101, 1972.

WHITE, I.G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.5, p.639-58, 1993.

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

9. ANEXO I

9.1. MEIO PARA CONGELAÇÃO DO SÊMEN GLICINA-GEMA-LEITE

(GONZALEZ, 1996)

Solução A	
Glicina – Botica ao veado d'ouro	1,4g
Citrato de sódio – Merck KGaA	2,97g
Água destilada	100mL

Solução B	
Frutose - Merck KGaA	3,0g
Água destilada	100mL

Solução A+B	
Penicilina G Potássica – Eurofarma Laboratórios, SP	0,033g
Dihidroestreptomicina – Fort Dodge, Brasil	0,100g

Meio I	
Solução A+B	60mL
Gema de ovo	20mL
Orvus es Paste (OEP) – Procter & Gambler	0,40mL
Leite desnatado 11% - La Serenissima	15mL
Água destilada	4,60mL

Meio II	
Solução A+B	54mL
Gema de ovo	20mL
Orvus es Paste (OEP)	0,40mL
Leite desnatado 11%	15mL
Glicerol – Sigma-Aldrich, USA	10mL

9.2. SONDAS FLUORESCENTES (HARRISON & VICKERS, 1990 adaptado por ZÚCCARI, 1998)

Solução	Constituintes	Quantidade
Solução estoque DIC (Solução I) (Sigma Chemical – P4170, USA)	DIC DMSO	9,2mg 20mL
Solução estoque IP (Solução II) (Sigma Chemical – C5041, USA)	IP Solução fisiológica	10mg 20mL
Solução estoque de formaldeído (Solução III)	Formalina a 40% Solução fisiológica	Diluição 1:80
Solução estoque de citrato de sódio a 3% (Solução IV)	Citrato de sódio Solução fisiológica	3g 100mL
Solução de trabalho	Solução I	20 μ L
	Solução II	10 μ L
	Solução III	10 μ L
	Solução IV	960 μ L
Amostras para avaliação	Sêmen	10 μ L
	Solução trabalho	40 μ L

9.3. SOLUÇÃO FORMOL-SALINA (HANCOCK, 1957)

Solução estoque de NaCl	
NaCl	9,01g
Água destilada	500mL

Solução estoque tampão	
Solução 1	
Na ₂ HPO ₄	21,68g
Água destilada q.s.q	500mL
Solução 2	
KH ₂ PO ₄	11,13g
Água destilada q.s.q	500mL

Solução tampão final	
Adicionar 200mL da solução 1 em 80mL da solução 2	

Solução formol-salina	
Solução estoque de NaCl	150mL
Solução tampão	100mL
Formaldeido 40%	62,5mL
Água destilada	500mL

9.4. "HAMILTON SETUP FOR IVOS-10"

ANALYSES SETUP	
Frame rate	60Hz
Frames acquired	30
Minimum contrast	56
Minimum cell size	5pix
Threshold straightness	70.0%
Medium VAP cut-off	80.0 μ /s
Low VAP cut-off	30.0 μ /s
Low VSL cut-off	20.0 μ /s
Nom-motile head size	3 pix
Nom-motile head intensity	50

MINIMUM		MAXIMUM
0.43	Static size limits	10.0
0.64	Static size limits	1.35
0	Static elongation limits	100.0

CALIBRATION	
Magnification	1.95

VIDEO SOURCE	
frequency	60Hz
Field	Dark

ILUMINATION		
Intensity		3181
Photometer	Low	73
	High	125

ANALYSIS CHAMBER	
Chamber type	Makler
Chamber depth	10.0 μ m
Stage position	14.3mm
Field selection	Automatic
Set stage temperature	37°C

ABSTRACT

RODELLO, L. Validation of freezing and cooling ovine semen using an automatic programmed system. Botucatu, 2006. 70p. Dissertation (Masters in Animal Reproduction) – College of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu Campus, Sao Paulo State University “Julio de Mesquita Filho” – UNESP.

The objectives of the present study were to validate and evaluate a programmed automatic system for freezing and cooling, using a national equipment *TK 3000*[®], compared to a method using refrigerator and liquid nitrogen for the same procedures. Ten rams from Santa Ines breed were submitted to semen collection by artificial vagina, with a total of three ejaculates from each sire. After the ejaculate evaluation, semen was diluted in a freezing extender Egg- Glycine – Milk and stored in a 0.25 mL straws with a total of 100×10^6 sperm per dose at 32°C. The samples were cooled inside a refrigerator and /or utilizing an automatic programmed system, being then frozen in liquid nitrogen vapor and/ or using automatic control. A cooling procedure was performed using a *Minitub*[®] 518C refrigerator, where the straws were disposed between plastic bags containing water to control the gradual cooling from 35°C to 5°C, within a total of 90 minutes and then transferred to a 37 liters isopor box, containing 5 liters of liquid nitrogen for freezing in vapor. The straws were disposed horizontally inside the box, and they were at three cm from the liquid surface during 20 minutes. The cooling and freezing procedures were performed at a national automatic programmed system *TK 3000*[®], using the “P3.S2” program established by the manufactory instructions performing a curve of 0.5°C/ minute for cooling, starting at 32°C and finishing at 5°C, with a total time of 90 minutes. A two step freezing was then initiated: from 5°C to - 80°C at 15°C/ min and from - 80°C to -120 °C dropping 10°C / min. At the end of cooling being yet inside the refrigerator and using an automatic control, the straws were changed among the systems creating four combinations of freezing procedure. At the end, the straws remained inside a cryogenic container and they were thawed in water bath (40 °C during 20 seconds) for subjective evaluation of sperm motility (%) and vigor (0 to5). A

computerized evaluation was done to evaluate total motility (TM), progressive motility (PM), curvilinear velocity (VCL), and linearity (LIN). The total spermatic membrane integrity was determined by fluorescence microscopy using propidium iodine (PI) and carboxifluorescein acetate (DIC). The acrosome integrity (Acros) and presence of band tail (Tail) were evaluated using a phase contrast optic microscopy and resistant test (37 °C / 240 minutes). The results were similar ($P < 0.05$) between samples submitted to cooling using refrigerator and automatic control for all analyzed parameters after thawing and at the end of the resistant test. The same was observed among samples submitted to cooling in refrigerator followed by liquid nitrogen vapor for freezing, samples cooled and frozen both using an automatic control, samples processed by the combinations of cooling in refrigerator followed by freezing with an automatic control, and samples cooled with automatic control followed by freezing in liquid nitrogen vapor. In conclusion, the *TK 3000*[®] is an adequate automatic system for ovine semen cryopreservation and it provides a quality which is equivalent to semen processed in refrigerator/ liquid nitrogen vapor system.

Key words: Cryopreservation, ovine semen, automatic programmed system, spermatozoa.