

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

INOVAÇÕES METODOLÓGICAS NA CONGELAÇÃO DE SÊMEN BOVINO

KARINA ALBERTI

BOTUCATU – SÃO PAULO
FEVEREIRO – 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

INOVAÇÕES METODOLÓGICAS NA CONGELAÇÃO DE SÊMEN BOVINO

KARINA ALBERTI

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Mestre em Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Titular Frederico Ozanam Papa

BOTUCATU – SÃO PAULO
FEVEREIRO – 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Alberti, Karina.

Inovações metodológicas na congelação de sêmen bovino / Karina Alberti. –
Botucatu : [s.n.], 2007

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007.

Orientador: Frederico Ozanam Papa

Assunto CAPES: 50504007

1. Bovino - Reprodução 2. Inseminação artificial

CDD 636.208982

Palavras-chave: Congelabilidade; Fertilidade; Meios diluentes; Plasma
seminal; Touros

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do Autor: Karina Alberti

Título: Inovações Metodológicas na congelação de sêmen bovino.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Mestre em Reprodução Animal.

Data: 23/12/2007

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.: Frederico Ozanam Papa	Intituição: FMVZ-UNESP-Botucatu
Assinatura:	Julgamento:
Prof. Dr.: Rubens Paes de Arruda	Intituição:FMVZ-USP- Pirassununga
Assinatura:	Julgamento:
Prof. Dr.: João Carlos Pinheiro Ferreira	Intituição: FMVZ-UNESP-Botucatu
Assinatura:	Julgamento:
Prof. Dr.: Alicio Martins Junior	Intituição: FOA-UNESP-Araçatuba
Assinatura:	Julgamento:
Profa. Dra.:Maria Denise Lopes	Intituição: FMVZ-UNESP-Botucatu
Assinatura:	Julgamento:

Ao meu pai Lourival (in memoriam) por todos os ensinamentos e lições de vida e, acima de tudo, pelos momentos inesquecíveis... O amor que sinto por ele serviu de incentivo para continuar.

À minha mãe Angelina, que nunca esmoreceu e sempre acalmou e fortaleceu meu coração com seu amor incondicional.

Aos meus irmãos Carlos, Wágner e Danilo por sempre estarem presentes em todos os sentidos, não medindo esforços para que chegasse até aqui.

DEDICO COM TODO AMOR

*Ao meu namorado Edinho,
pela colaboração imensurável na realização deste trabalho e
simplesmente por fazer parte da minha vida,*

Um agradecimento especial

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial **Prof. Titular Frederico Ozanam Papa** pela amizade, apoio e orientação, sem os quais este trabalho não se realizaria.

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP** – Campus de Botucatu e ao **Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária** pelas oportunidades concedidas.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos demais membros da banca examinadora **Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda** e **Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira**, pela atenção e cuidado com que analisaram esta dissertação, e por suas críticas que colaboraram para o enriquecimento deste trabalho.

À **Central Bela Vista Genética Bovina, Fazenda Braido, Fazenda Carretão, Grupo Carlos Massa e Faz. Santa Maria** por ceder seus animais para o experimento, sem os quais este experimento não seria possível.

Ao **Prof. Adj. Francisco Stefano Weschler**, pela assessoria nas intermináveis análises estatísticas.

À **Profa. Adj. Maria Denise Lopes**, pelas sugestões, correções e sobretudo pela amizade em todo esse período de convívio.

Ao **Prof. Adj. Nereu Carlos Prestes**, pelos inúmeros ensinamentos e inestimável amizade que construímos.

Ao **Prof. Titular Edson Ramos de Siqueira**, pelas sugestões e correções dos relatórios; e pelo auxílio e ombro amigo em meus momentos de maiores dificuldades.

As minhas amigas de residência **Camila, Carla e Lindsay**, pelo ano inesquecível de convívio em que construímos uma sólida amizade.

Aos meus colegas integrantes do **Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal- CERAN** – em especial ao **José Antonio Dell’Aqua Jr.**, pelas sugestões e colaboração direta durante todo este trabalho.

À todos os **colegas de pós graduação** pelo convívio e cumplicidade durante todo o período em que estivemos juntos.

As minhas amigas, **Juliana, Marilú, Brunna, Aline, Cristiane** pela “família” que formamos durante nossa estada em Botucatu.

Aos demais **Professores do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária**, pelas oportunidades e pelas experiências compartilhadas desde a residência.

Aos **Funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária** pelos bons momentos de convívio e pela amizade sempre demonstrada.

Ao assessor da diretoria **Neilson Casimiro da Silva** que pacientemente me auxiliou na formatação eletrônica do texto desta dissertação.

As minhas cunhadas **Ana Maria e Claudia** sempre acreditando e torcendo pelo meu sucesso.

Aos meus sobrinhos **Isabella, Luisa, Guilherme e Bruno** pelo infinito carinho.

Enfim, agradeço a todos que de alguma maneira me ajudaram a chegar aonde cheguei como profissional e ser humano.

“A força não provem da capacidade física e sim de uma vontade indomável.”

Mahatma Gandhi

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Esquematização gráfica do processo de congelação.
A- Palhetas alojadas em bandejas de aço telada suportadas a 5cm do nível de N₂. **B-** Palhetas imersas em N₂. 38
- Figura 2 -** Esquema simplificado dos procedimentos experimentais realizado no experimento I. 40
- Figura 3 -** Esquema simplificado dos procedimentos experimentais realizado no experimento II 45
- Figura 4 -** Esquematização do protocolo de sincronização de estro e ovulação utilizado na fazenda Santa Marta. 49
- Figura 5 -** Esquematização do protocolo de sincronização de estro e ovulação utilizado na Agropecuária Café no Bule Ltda. 50
- Figura 6 -** Gráfico das médias das variáveis motilidade espermática total (MT) (%) e motilidade espermática progressiva (MP) (%), obtidas por análise computadorizada dos movimentos do sêmen congelado com M20, Glicina-gema e TRIS-gema 51
- Figura 7 -** Gráfico das médias das variáveis velocidade curvilínea espermática (VCL) (µm/s), retilinearidade espermática (STR) (µm/s), linearidade espermática (LIN)(%), obtidas por análise computadorizada dos movimentos de sêmen congelado com três diferentes meios diluentes do sêmen congelado com M20, Glicina-gema e TRIS-gema. 52
- Figura 8 -** Gráfico das médias das percentagens de espermatozóides com movimentos rápidos (RAP), obtidas por análise computadorizada dos movimentos do sêmen congelado com três diferentes meios diluentes de sêmen congelado com M20, Glicina-gema e TRIS-gema. 53
- Figura 9 -** Gráfico das médias da percentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra, obtidas por análise computadorizada dos movimentos do sêmen congelado com três diferentes meios diluentes de sêmen congelado com M20, Glicina-gema e TRIS-gema. 54
- Figura 10-** Gráfico das médias de motilidade total (%), obtidas por análise computadorizada dos movimentos de sêmen congelado após tempo de estabilização de 60, 120, 180 e 240 minutos. 60

- Figura 11-** Gráfico das médias de motilidade progressiva (%), obtidas por análise computadorizada dos movimentos de sêmen congelado após tempo de estabilização de 60, 120, 180 e 240 minutos. 61
- Figura 12-** Gráfico das médias velocidade curvilínea dos espermatozóides ($\mu\text{m/s}$), obtidas por análise computadorizada dos movimentos de sêmen congelado após tempo de estabilização de 60, 120, 180 e 240 minutos. 62
- Figura 13-** Gráfico das médias de retilinearidade dos movimentos espermáticos ($\mu\text{m/s}$), obtidas por análise computadorizada dos movimentos de sêmen congelado após tempo de estabilização de 60, 120, 180 e 240 minutos. 63
- Figura 14-** Gráfico das médias de linearidade dos movimentos espermáticos ($\mu\text{m/s}$), obtidas por análise computadorizada dos movimentos de sêmen congelado após tempo de estabilização de 60, 120, 180 e 240 minutos. 64
- Figura 15-** Gráfico das médias de espermatozóides com movimentos rápidos (%), obtidas por análise computadorizada dos movimentos de sêmen congelado após tempo de estabilização de 60, 120, 180 e 240 minutos. 65
- Figura 16-** Gráfico das médias de espermatozóides com membrana plasmática íntegra (%), microscopia de epifluorescência com as sondas fluorescentes iodeto de propídio e diacetato de carboxifluoresceína, do sêmen congelado após tempo de estabilização de 60, 120, 180 e 240 minutos. 66
- Figura 17-** Gráfico percentagens de prenhez obtidas em inseminações artificiais com sêmen congelado com M20 com (C) e sem a remoção do plasma seminal (NC) e com TRIS-gema sem a remoção do plasma seminal. 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Médias de MT dos diluidores, com e sem a remoção do plasma seminal (RPS).	55
Tabela 2-	Médias de MP dos diluidores, com e sem a remoção do plasma seminal (RPS).	56
Tabela 3-	Médias de VCL dos diluidores, com e sem a remoção do plasma seminal (RPS).	56
Tabela 4-	Médias de STR ($\mu\text{m/s}$) dos diluidores, com e sem a remoção do plasma seminal (RPS).	57
Tabela 5-	Médias de LIN ($\mu\text{m/s}$) dos diluidores, com e sem a remoção do plasma seminal (RPS).	58
Tabela 6-	Médias de RAP (%) dos diluidores, com e sem a remoção do plasma seminal (RPS).	58
Tabela 7-	Médias de IMP (%) dos diluidores, com e sem a remoção do plasma seminal (RPS).	59
Tabela 8-	Valores médios dos meios diluentes nas percentagens de motilidade espermática total (MT) e motilidade progressiva (MP); velocidade curvilínea espermática (VCL) e retilinearidade espermática (STR), em $\mu\text{m/s}$; e percentagens de linearidade espermática (LIN), percentagem de espermatozóides com movimentos rápidos (RAP) e integridade de membrana plasmática (IMP).	72
Tabela 9-	Valores médios das metodologias, remoção do plasma seminal (C) e sem remoção do plasma seminal (NC), nas percentagens de motilidade espermática total (MT) e motilidade progressiva (MP); velocidade curvilínea espermática (VCL) e retilinearidade espermática (STR), em $\mu\text{m/s}$; e percentagens de linearidade espermática (LIN), percentagem de espermatozóides com movimentos rápidos (RAP) e integridade de membrana plasmática (IMP).	72
Tabela 10-	Análise de regressão logística para os valores de fertilidade.	74
Tabela 11-	Valores de p nos desdobramentos em contrastes ortogonais na comparação entre os tratamentos.	74

LISTA DE ABREVIATURAS

CASA	- Computer Assisted Semen Analysis - Análise Computadorizada de Sêmen
CFDA	- Diacetato de 6 carboxifluoresceína
DMSO	- Dimetil Sulfóxido
EDTA	- Ethylene DiamineTetracetic Acid.- Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FIV	- Fertilização <i>in vitro</i>
GG	- Glicina-gema
IA	- Inseminação Artificial
IATF	- Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IMP	- Integridade da Membrana Plasmática
LDL	- Low Density Lipoprotein – Lipoproteína de Baixa Densidade
LIN	- Linearidade
MP	- Percentual de Motilidade Progressiva
MT	- Percentual de Motilidade Total
OEP	- Orvus es Paste
PI	- Iodeto de propídio
RAP	- Percentual de Espermatozóides com Movimentos Rápidos
RPM	- Rotações por minuto
SAS	- Statistical Analysis System
STR	- Retilinearidade
TG	- TRIS-gema
VCL	- Velocidade Curvilinear

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. HIPÓTESES	5
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
3.1 CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA.....	8
3.2 INTERAÇÕES DOS COMPONENTES DOS DILUENTES COM A CÉLULA ESPERMÁTICA	13
3.2.1. <i>Ação Crioprotetora.....</i>	14
3.2.2. <i>Crioprotetores não penetrantes.....</i>	15
3.2.3 <i>Crioprotetores penetrantes.....</i>	21
3.3 PLASMA SEMINAL	22
3.4 AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA.....	27
3.4.1. <i>Avaliação computadorizada do sêmen.....</i>	28
3.4.2. <i>Análise da integridade de membrana plasmática.....</i>	31
4. OBJETIVOS	35
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
5.1 EXPERIMENTO I: EFEITO DE TRÊS MEIOS DILUENTES, COM OU SEM A REMOÇÃO DO PLASMA SEMINAL.....	38
5.1.1 <i>Local da Pesquisa e Animais.....</i>	38
5.1.2 <i>Colheita do Sêmen.....</i>	39
5.1.3 <i>Avaliações do Sêmen Fresco.....</i>	39
5.1.4 <i>Procedimento Experimental.....</i>	41
5.1.5 <i>Congelação do Sêmen.....</i>	42
5.1.6 <i>Descongelação do Sêmen.....</i>	42
5.1.7 <i>Avaliação Computadorizada do Sêmen.....</i>	43
5.1.8 <i>Avaliação da Integridade da Membrana Plasmática.....</i>	43
5.1.9 <i>Análise Estatística.....</i>	45
5.2 EXPERIMENTO II: INFLUÊNCIA DOS DIFERENTES TEMPOS DE ESTABILIZAÇÃO SOBRE AS VARIÁVEIS ESPERMÁTICAS PÓS-DESCONGELAÇÃO.....	46
5.2.1 <i>Local da Pesquisa e Animais.....</i>	46
5.2.2 <i>Colheita de Sêmen.....</i>	46
5.2.3 <i>Avaliações do Sêmen Fresco.....</i>	46
5.2.4 <i>Procedimentos Experimentais.....</i>	47
5.2.5 <i>Congelação do Sêmen.....</i>	47
5.2.6 <i>Descongelação do Sêmen.....</i>	48
5.2.7 <i>Avaliação do Sêmen Pós - Descongelação.....</i>	48
5.2.8. <i>Análise Estatística.....</i>	50
5.3 EXPERIMENTO III: EFEITO DE DOIS MEIOS DILUENTES E DA CENTRIFUGAÇÃO SOBRE A FERTILIDADE DE VACAS INSEMINADAS EM TEMPO FIXO.....	52
5.3.1 <i>Local da Pesquisa e Animais.....</i>	52
5.3.2 <i>Colheita do Sêmen.....</i>	52
5.3.3 <i>Procedimentos Experimentais.....</i>	52
5.3.4 <i>Análises Estatísticas.....</i>	54
6. RESULTADOS.....	55

6.1. EXPERIMENTO I – EFEITOS DO MEIO DILUENTE E DA REMOÇÃO DO PLASMA SEMINAL NA CONGELABILIDADE DO SÊMEN BOVINO.....	56
6.1.1. <i>Efeito dos meios diluentes</i>	56
6.1.2 <i>Efeito da remoção do plasma seminal</i>	60
6.2. EXPERIMENTO II - INFLUÊNCIA DOS DIFERENTES TEMPOS DE ESTABILIZAÇÃO SOBRE AS VARIÁVEIS ESPERMÁTICAS PÓS-DESCONGELAÇÃO.	65
6.3. EXPERIMENTO III: EFEITO DE DOIS MEIOS DILUENTES E DA CENTRIFUGAÇÃO SOBRE A FERTILIDADE DE VACAS INSEMINADAS EM TEMPO FIXO.....	73
7. DISCUSSÃO	75
7.1. EXPERIMENTO I: EFEITOS DO MEIO DILUENTE E DA REMOÇÃO DO PLASMA SEMINAL NA CONGELABILIDADE DO SÊMEN BOVINO.....	76
7.1.1. <i>Efeito dos meios diluentes</i>	76
7.1.2 <i>Efeito da remoção do plasma seminal</i>	79
7.2. EXPERIMENTO II: INFLUÊNCIA DE DIFERENTES TEMPOS DE ESTABILIZAÇÃO SOBRE AS VARIÁVEIS ESPERMÁTICAS PÓS-DESCONGELAÇÃO.	82
7.3. EXPERIMENTO III: EFEITO DE DOIS MEIOS DILUENTES E DA CENTRIFUGAÇÃO SOBRE A FERTILIDADE DE VACAS INSEMINADAS EM TEMPO FIXO.....	85
8. CONCLUSÕES	87
9. REFERÊNCIAS	89
10. ANEXOS.....	114
10.1 AJUSTE DO HTMA – IVOS – 10 PARA A REALIZAÇÃO DAS ANÁLISES DE SÊMEN BOVINO.	115
10.2 FÓRMULAS DOS DILUENTES UTILIZADOS NA PESQUISA	116
10.3 PREPARO DAS SONDAS FLUORESCENTES	119

RESUMO

Alberti, K. *Inovações metodológicas na congelação de sêmen bovino.* Botucatu, 2007. 120 p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal)- Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Dentre as biotecnologias de reprodução que visam acelerar os ganhos genéticos e econômicos dos rebanhos, a congelação de sêmen desponta como uma das principais. O sêmen congelado bovino é utilizado em larga escala há anos e não houve grandes evoluções nas técnicas de congelação visando minimizar os efeitos deletérios do processo nos espermatozoides, colaborando ativamente para o incremento da fertilidade dos rebanhos. Neste trabalho propôs inovações nas técnicas de congelação utilizando uma nova formulação de meio diluente, a introdução da centrifugação para a remoção do plasma seminal pré-congelação e a determinação do tempo ideal de estabilização do sêmen. Foram realizados três experimentos; o primeiro testou o efeito de três diferentes meios diluentes, com ou sem a remoção do plasma seminal, no ejaculado de 40 touros diferentes. Nos resultados exibidos o diluente M20 foi superior ($p < 0,01$) aos demais diluentes na maioria das variáveis pesquisadas a remoção do plasma seminal melhorou ($p < 0,01$) os índices de congelabilidade do sêmen. Outro experimento foi a verificação dos tempos de 60, 120, 180 e 240 min. de refrigeração do sêmen a 5°C. O tempo de 180 minutos foi o considerado o melhor para a congelabilidade após a verificação dos resultados. No teste de fertilidade foram inseminados 418 vacas e o grupo que foi inseminado com sêmen congelado com M20 sem plasma seminal obteve uma tendência de superioridade ($0,05 < p < 0,10$) aos demais grupos. Com os resultados dos experimentos concluiu-se que as inovações propostas por este estudo incrementam os índices de congelabilidade do sêmen bovino.

Palavras-chave: touros, meios diluentes, plasma seminal, tempos de estabilização, congelabilidade, fertilidade.

ABSTRACT

Alberti, K. Methodological innovations in bovine semen freezing. Botucatu, 2007. 120 p. Dissertation (Master Science in Animal Reproduction) – Paulista State University – UNESP – Botucatu, São Paulo, Brazil – School of Veterinary Medicine and Animal Science

Semen freezing is considered as one of the main reproduction biotechnologies that aim to accelerate genetic and economical gains of herds. Frozen bovine semen has been used in large scale for years and there were not great evolutions in freezing techniques to minimize the deleterious effects of the process in spermatozoa, actively contributing for the increase in herds fertility. Innovations in freezing techniques were proposed in this work by using a new formulation of the extenders, introducing centrifugation for the removal of pre-freezing seminal plasma and determining the appropriate time for semen cooled. Three experiments were carried out: 1) the effect of three different extenders was tested, with or without the removal of seminal plasma, in the ejaculate of 40 different bulls; results showed that the extender M20 was superior ($p < 0,01$) in relation to the other extenders in most of variables studied. The removal of the seminal plasma improved ($P < 0,01$) semen freezability indexes. 2) verification of 60, 120, 180 and 240 min. times for semen cooling at 5°C ; after results, the time of 180 minutes was considered the most appropriate for freezability. 3) fertility test: 418 cows were inseminated and the group with frozen semen with M20 without seminal plasma obtained a superiority tendency ($0,05 < p < 0,10$) in relation to the other groups. The results of the experiments concluded that the innovations proposed in this work increase freezability indexes of bovine semen.

Keywords: bulls, extenders, seminal plasma, cooled rates, freezability, fertility.

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

O agronegócio brasileiro tem se mostrado moderno, eficiente e competitivo, proporcionando uma atividade segura e rentável. Com 388 milhões de hectares de terras férteis agricultáveis, clima diversificado, chuvas regulares, energia solar abundante e disponibilidade de 13% de toda a água doce no planeta, o Brasil se apresenta como um país com vocações naturais para a agropecuária e todos os negócios relacionados à sua cadeia produtiva. A agropecuária é a principal atividade da economia brasileira, sendo responsável por um de cada três reais gerados no país: 33% do Produto Interno Bruto (PIB), 42% do total das exportações e 37% dos empregos brasileiros (MAPA, 2006).

Dentre as muitas vertentes do agronegócio, a pecuária bovina de corte é apontada como uma das principais atividades do setor no país. Com o maior rebanho comercial do mundo (204.513 milhões de cabeças) e a liderança do mercado externo de carne, produziu nos últimos três anos uma média anual de 8 milhões de ton. de carne (IBGE, 2006).

O prestígio mercadológico atingido acelerou a busca por tecnologias para o avanço da atividade, desde as técnicas relativas à melhoria das pastagens, nutrição, genética e controle sanitário, até as biotecnologias de reprodução, auxiliando no aumento da velocidade do melhoramento genético dos rebanhos. A inseminação artificial (IA), técnica de maior abrangência, e a transferência de embriões vêm se aperfeiçoando há anos e, mais recentemente, a fertilização *in vitro* (FIV) tornou-se mais acessível comercialmente aos criatórios. A ferramenta essencial para a realização destas técnicas é o sêmen congelado.

O sêmen congelado bovino é utilizado e comercializado em larga escala há anos. Embora essa biotécnica apresente grande importância no cenário da pecuária mundial, a congelação de sêmen bovino recebeu poucas

inovações nos últimos vinte anos, em função de ter atingido patamares satisfatórios de congelabilidade e de fertilidade. O sucesso na concepção e os benefícios econômicos da IA dependem, entre outros fatores, da viabilidade do sêmen criopreservado para a fecundação do oócito. A expansão do mercado, e a premência do melhoramento genético exigem que todos os campos envolvidos na reprodução avancem juntos. Portanto, faz-se evidente a necessidade da evolução das técnicas de congelamento que diminuam os efeitos deletérios da criopreservação sobre as células espermáticas. A melhora nos índices de congelabilidade e fertilidade contribuirão para melhores resultados das biotécnicas de reprodução, proporcionando melhores resultados e auxílio à expansão da sua aplicação.

O sêmen criopreservado resulta em diminuição do potencial fecundante dos espermatozoides, se comparado com o sêmen fresco. O decréscimo é decorrente de injúrias estruturais, causando perdas na função e/ou morte celular. A finalidade do desenvolvimento de novas tecnologias de criopreservação de espermatozoides é minimizar os efeitos deletérios prejudiciais às células.

O meio diluente utilizado influencia diretamente os resultados da criopreservação. Geralmente, os diluidores para sêmen bovino são formulados à base de gema de ovo ou leite, glicina, ou açúcares como crioprotetores extracelulares. Alternativas de crioprotetores não penetrantes são a lecitina de soja e a lipoproteína de baixa densidade (LDL). Os crioprotetores intracelulares também são fatores que interferem na congelamento. O glicerol, desde sua descoberta por Polge et al. (1949), é utilizado para a congelamento de sêmen de diversas espécies. Outros crioprotetores penetrantes também são utilizados para sêmen bovino, tais como: dimetilsulfoxido, formamida, lactamida, etilenoglicol e dimetilformamida; porém, os índices de congelabilidade obtidos não justificam a substituição do glicerol.

A metodologia de congelamento do sêmen, fator significativo para a diminuição das perdas eminentes à criopreservação, pouco se alterou nos últimos anos. Usualmente, técnicos em campo trabalham com materiais simples, como caixas térmicas adicionadas de gelo ou geladeiras comuns, para

realizar a curva de resfriamento e a congelação feita em caixas de isopor com N₂ líquido. Essa técnica apresenta resultados bons, mesmo sem o controle total das curvas de congelação e resfriamento.

As curvas de resfriamento ou tempo de equilíbrio a 5°C, recomendados na literatura variam muito; desde 10 min. até 18 h; porém a maioria preconiza 4 h como o período ideal. O importante é que as curvas de resfriamento não proporcionem o choque frio às células, fenômeno que causa um estresse térmico letal a algumas delas e é proporcional à taxa de resfriamento, ao intervalo e ao limite de temperatura.

Alguns componentes do plasma seminal também podem ser prejudiciais ao processo de criopreservação. Em eqüinos, a remoção do plasma seminal é fator primordial à congelação do sêmen. O incremento dos índices de congelabilidade também ocorre em pequenos ruminantes quando o plasma seminal é removido para a congelação. Os componentes prejudiciais à congelação também estão presentes no sêmen dos touros, porém, a eficiência da remoção do plasma seminal na criopreservação é pouco estudada.

Neste trabalho estudou-se: a influência do tempo de estabilização, utilizando quatro períodos diferentes 60, 120, 180 e 240 min.; os efeitos da remoção do plasma seminal pela centrifugação; e a interferência do meio diluente, comparando os resultados obtidos com TRIS-gema (TG), Glicina-gema (GG) e M20, sobre a criopreservação dos espermatozoides bovinos; e a capacidade fecundante dos espermatozoides criopreservados com as novas metodologias, pelo teste de fertilidade por IA. As variáveis espermáticas foram mensuradas por análise computadorizada dos movimentos dos espermatozoides (CASA) e integridade da membrana plasmática avaliadas por sondas fluorescentes.

2. Hipótesis

2. HIPÓTESES

1. O diluidor M20 promoverá maior proteção às células espermáticas no processo de criopreservação.

2. A centrifugação do sêmen antes da congelação, para a remoção do plasma seminal, melhorará a congelabilidade do sêmen bovino.

3. A variação do tempo de estabilização interferirá nos índices de congelabilidade do sêmen.

4. Haverá diferenças entre as taxas de prenhez dos grupos cujo sêmen foi submetido à centrifugação.

3. Revisão de Literatura

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Criopreservação espermática

No século XVIII um monge, professor de ciências naturais da Universidade de Pavia, Lázaro Spalanzani, inseminou artificialmente uma cadela e 62 dias depois constatou o nascimento de três filhotes saudáveis, sendo o primeiro relato científico de IA em animais, que constituiu um marco inicial de um novo ramo das ciências médicas, em 1784 (Mies Filho, 1982).

Não há como desvincular o avanço das técnicas de manipulação do sêmen com as necessidades atingidas pelo desenvolvimento dos procedimentos de IA. A substituição dos líquidos produzidos pelas glândulas anexas por um soro artificial foi realizada pelo russo Elias Ivanov em 1907, criando assim o meio conservador de sêmen. A partir daí a evolução da IA começou, com a melhoria dos métodos de colheita e manipulação do sêmen. O desenvolvimento de melhores meios diluidores foi responsável pela difusão do método (Foote et al., 2002).

Inicialmente, o principal problema a ser resolvido foi ampliar o período de conservação do sêmen sem alterar suas propriedades fecundantes. O primeiro grande passo para isso foi a descoberta das virtudes da gema de ovo efetuada por Phillips & Lardy (1940), criando o meio diluente *fosfato-gema*. Posteriormente, Salisbury et al. (1941) aprimoraram a composição do meio adicionando o citrato de sódio, como tampão, criando o clássico citrato-gema. Esse diluidor permitiu que os espermatozóides fossem conservados a 5°C, podendo ser utilizados até três dias após a colheita. Os antibióticos foram adicionados aos diluentes por Almquist et al. (1949), com o intuito de controlar doenças venéreas nos bovinos.

Anteriormente aos avanços obtidos nos meios diluidores, Ivanov havia descoberto a ação do frio na conservação das células espermáticas. Tal fato deu-se quando, ao puncionar os epidídimos de carneiros que permaneceram semi-sepultados por algumas horas nas neves dos montes Urais, encontrou células espermáticas vivas (Mies Filho, 1982). Porém, a criopreservação

somente foi viabilizada em 1949 na Inglaterra, por Polge, Smith e Parkes, que congelaram com sucesso, sêmen de galo em meio diluente contendo glicerol, descobrindo as propriedades criopreservantes desta substância. O Glicerol então foi testado em sêmen bovino e a técnica de criopreservação foi realizada com sucesso após aproximadamente uma década de experiências mal sucedidas. A partir desse momento houve um avanço significativo na aplicação da IA e na comercialização de sêmen congelado para ser utilizado na técnica (Foote, et al., 2002). Atualmente, existem poucas amostras de sêmen congeladas a mais de 50 anos; portanto não se conhece o tempo de viabilidade destas células, porém, estima-se que as células em N₂ líquido permaneçam viáveis por mais de 3000 anos, desde que não haja mudanças bruscas de temperaturas a -196°C (Yoshida, 2000).

O Brasil foi um dos primeiros países a aplicar a congelação de sêmen em bovino, tendo recebido a visita de Polge em agosto de 1953, a convite do extinto Departamento Nacional de Produção Animal. Mies Filho e Augusto Rosa, em 1954, publicaram o resultado de 54,2% de fertilidade, obtido na primeira inseminação, usando sêmen congelado (Mies Filho, 1987).

Atualmente, as biotecnologias como IA, transferência de embriões e fertilização "*in vitro*", são fundamentais para o aumento da competitividade do pecuarista no campo do agronegócio; nelas o sêmen congelado está presente de forma importante. O potencial para a utilização destas biotécnicas é grande, porém, o investimento para algumas delas pode ser alto. A IA é a mais prática e econômica biotecnologia da reprodução, seu conhecimento é de fácil acesso e com isso é possível a obtenção de um grande número de profissionais qualificados para aplicá-la (Gonzalez, 2004). Todavia a aplicabilidade das biotécnicas é restringida pela falta de instrução dos funcionários e pelo desinteresse dos pecuaristas que relutam em investir nas tecnologias aplicadas a seus rebanhos. Esses aspectos colaboram para que o Brasil, segundo a ASBIA (2004), insemine ao ano apenas 6% das fêmeas bovinas em idade reprodutiva, índice muito baixo comparado a outros países com tradições pecuaristas do mundo.

O objetivo da criopreservação de sêmen é a obtenção de um banco de células espermáticas a serem utilizadas nas diferentes biotécnicas de reprodução, sendo uma ferramenta importante para acelerar o melhoramento genético (Amirat et al., 2004). Entretanto, o impacto genético da IA é limitado pelo processo de criopreservação, que danifica as organelas e membranas dos espermatozóides, induzindo também alterações no processo de capacitação espermática e na reação acrossomal (Watson, 1995; Garner et al., 2001). Por conseguinte, a modernização dos protocolos de congelação visa minimizar os efeitos deletérios aos espermatozóides (Kumar et al., 2003).

Para a fertilização do oócito o espermatozóide, necessariamente, deverá manter atributos básicos como o metabolismo para produção de energia, a motilidade progressiva, a integridade acrossomal e das proteínas da membrana para ligação com o ovócito (Squires et al., 1999). Entretanto, os protocolos de criopreservação expõem as células espermáticas a várias situações de estresse como: variações de temperaturas e exposição a temperaturas não fisiológicas e estresse osmótico pelos elevados gradientes de concentração de solutos do meio diluidor de congelação, que levam à formação e dissolução de cristais de gelo no meio extracelular, os quais comprometem sua viabilidade (Watson, 2000).

No processo de criopreservação, a temperatura seminal deve diminuir da corpórea (37°C) para a ambiente (20°C). Esta queda na temperatura, aparentemente, não causa danos aos espermatozóides, desde que estejam diluídos em meio adequado. Existe, porém, uma faixa crítica de temperatura no processo de refrigeração, em que o sêmen pode ser severamente danificado; em bovinos essa faixa é compreendida entre 5 e 15°C (De Leew et al., 1990, Watson & Martin 2000; Agca & Critser, 2002). A esta temperatura, os lipídios da membrana plasmática passam por uma fase de transição do estado líquido-cristalino para o estado de gel (Graham, 1996). Se o espermatozóide não for resfriado apropriadamente nesta faixa crítica, ele sofrerá danos que poderão resultar em perda da motilidade e fertilidade (Watson, 1995).

O estresse sofrido pelos espermatozóides durante o processo de refrigeração é conhecido como choque frio. A sensibilidade a esta injúria varia

entre espécies. A susceptibilidade aos danos da refrigeração está correlacionada positivamente com a composição lipídica da membrana espermática de cada espécie. Animais que contenham concentrações de esteróides baixas e concentrações de ácidos graxos poliinsaturados altas são mais predispostos aos danos do choque térmico (Darin-Bennett et al., 1973). O sêmen de suíno é considerado altamente sensível; os de ovinos, bovinos e eqüinos são muito sensíveis (Watson, 1995); os espermatozóides caninos e felinos são pouco sensíveis; enquanto o sêmen de leporinos e humanos são os que apresentam menor sensibilidade ao choque frio (Medeiros et al., 2002).

England (1992) sugeriu que o sêmen de várias espécies animais necessita de um intervalo de algumas horas antes da congelação para que se desenvolva uma máxima resistência aos efeitos da congelação. Asseverando esta hipótese, Watson (1979) e Jasko (1994) afirmaram que antes da congelação os espermatozóides devem permanecer um determinado período de tempo a uma temperatura de equilíbrio, para que ocorra diminuição do metabolismo espermático e iniciem as interações com os componentes do meio diluidor antes do estresse do congelamento, diminuindo, dessa forma, os riscos de um choque térmico.

O período de equilíbrio varia de acordo com a espécie animal, com o protocolo de congelação-descongelação e também segundo o diluidor utilizado (England, 1992; Chacur, 1996).

Salisbury et al. (1978) afirmaram que a motilidade e a capacidade fecundante dos espermatozóides bovinos pós-descongelação aumentam quando existe um intervalo entre a adição do glicerol e o início da congelação, e que esta etapa pode ser chamada de período de equilíbrio.

As taxas de resfriamento e os tempos de equilíbrio têm sido testados no espermatozóide bovino, tentando empiricamente determinar a curva ideal de resfriamento (Gonzalez, 2004). O tempo de equilíbrio a 5°C recomendado, varia muito: desde 10 minutos (Berndtson & Foote, 1969) até 18 horas (Saroff & Mixner, 1955). Entretanto, a grande parte dos pesquisadores preconiza quatro horas de tempo de estabilização à temperatura de 5°C para a

congelamento de sêmen bovino (Bicudo et al., 1993; Thun et al., 2002; Foote et al., 2002).

Preocupados em modificar a técnica de congelamento devido as dificuldades encontradas nos trópicos em manter refrigeradores estáveis a 5°C por longos períodos, Sahni e Mohan (1988) congelaram sêmen de bovinos e bubalinos com diluidor TG, glicerolização e envasamento à temperatura ambiente. Uma parte das palhetas foi resfriada de 5 a 7°C em 4 a 6 horas e outra em 2 horas. Não houve, entre os grupos, diferenças na motilidade espermática pós-descongelamento, concluindo-se que o rápido resfriamento a 5°C reflete em facilidade e redução do tempo operacional do processo de criopreservação espermática. Papa et al. (2000) congelaram sêmen bovino com diluente GG em diferentes tempos de estabilização espermática a 5°C: 60,120,180,240 minutos. Os resultados obtidos não diferiram quanto a motilidade, vigor e retenção acrossomal, nos diferentes tempos estudados.

O resfriamento leva a célula a um estado de quiescência, reduzindo o metabolismo e proporcionando uma diminuição nos gastos energéticos e na produção de catabólitos tóxicos, contribuindo para a preservação celular. Da mesma maneira que a congelamento pode diminuir ou paralisar algumas reações bioquímicas celulares, ela pode também, acelerar outras, levando a danos ou mesmo à morte celular (Watson, 1995; Holt, 2000).

A congelamento das células ocorrem entre as temperaturas de 0 a -40°C, e é nesta faixa que podem ocorrer os principais danos as células espermáticas (Wolfe & Bryant, 2001). O ponto de solidificação da água é a 0°C, enquanto o de uma solução é determinado por sua concentração de solutos (Mazur, 1984). A água é o componente exclusivo dos cristais de gelo intracelulares, os sais existentes nas soluções se restringem à porção fluida do meio. (Amman e Pickett, 1987). Proporcionalmente à cristalização da água ocorre a saturação dos solutos, tornando o meio hipertônico (Mazur, 1977).

Em um processo de criopreservação, onde a célula é congelada rapidamente, não existe tempo hábil para que ela se desidrate e mantenha o equilíbrio osmótico, o que a torna altamente refrigerada, possibilitando a

formação de cristais de gelo intracelulares que podem causar danos irreversíveis a célula (Gao & Critser, 2000). Neste caso, para evitar possíveis danos às células, a descongelação deve ser também realizada de maneira rápida. Desta forma, não se permite que a água intracelular se descongele em um momento que a baixa temperatura presente permite a sua recristalização. Caso isso ocorra, formar-se-ão grandes cristais oriundos da recristalização, predispondo as células ao risco de perfurações (Watson, 1995; Holt, 2000).

As células que forem congeladas em um ritmo mais lento desidratar-se-ão em consequência do meio extracelular hipertônico, eliminando a possibilidade de formação de grandes cristais de gelo intracelulares; porém podem sofrer danos morfofuncionais devido a desidratação celular excessiva (Mazur, 1990). A descongelação neste processo deve se desenvolver lentamente, tal qual o processo de congelamento. Dessa maneira evita-se que grandes alterações no volume celular, decorrentes da reidratação, possam causar lesões nas membranas espermáticas (Watson, 1995; Holt, 2000).

3.2 Interações dos componentes dos diluentes com a célula espermática

Um protocolo de preservação adequado deve manter o potencial fertilizante das células espermáticas de modo que, ao final do processo essas apresentem a vitalidade necessária para atingir o local da fertilização, estando aptas a concluir a capacitação e a reação acrossômica; possibilitando a fecundação de um oócito (Watson, 1995; Rota, 1998; Peña, 2000). A sobrevivência dos espermatozóides no plasma seminal é limitada a poucas horas, porém, com a diluição em uma solução protetora, o resfriamento e a criopreservação mantém o sêmen viável por períodos mais longos (Hafez & Hafez, 2004).

O diluidor e o crioprotetor são utilizados com o intuito de proteger os espermatozóides do choque frio e osmótico que ocorrem durante o processo de congelamento e estes podem causar danos irreversíveis aos espermatozóides, devido a formação de cristais de gelo intracelulares, que afetam a estrutura físico-química da célula. Isto causa danos, principalmente à membrana, ao acrossoma, à motilidade progressiva e ao metabolismo para produção de

energia, como descreveram Pickett et al. (1987), afetando assim, o tempo de sobrevivência das células no trato reprodutivo da fêmea (Valcarcel et al, 1996).

Conforme resultados de estudos realizados ao longo de várias décadas, muitos fatores afetam a sobrevivência dos espermatozóides, incluindo tais como a composição dos meios diluentes e os crioprotetores usados para congelação (Liu et al., 1998; Guthrie et al., 2002).

O diluidor deve interagir com o sêmen, proporcionando proteção aos diferentes compartimentos celulares durante o resfriamento, congelação e descongelação. Por isso, sua constituição deve garantir nutrição, proteção, balanço eletrolítico (pH e osmolaridade) e inibição bacteriana. Os constituintes básicos dos diluentes são substâncias energéticas, crioprotetores, soluções tampões e antibióticos (Squires et al., 1999; Holt, 2000). De acordo com Vishwanath & Shannon (2000), para um meio diluente ser completo e eficiente, algumas substâncias são fundamentais na sua composição: substâncias iônicas e aniônicas que mantêm a osmolaridade; lipoproteínas ou material de alto peso molecular que previnam o choque frio, como a gema de ovo ou leite; glicerol, propanodiol ou dimetilsulfoxido (DMSO) como agentes crioprotetores intracelulares; glicose ou frutose como fonte de energia e outros aditivos como enzimas e antibióticos.

3.2.1. Ação Crioprotetora

As células espermáticas necessitam, para sobreviver ao processo de congelação e descongelação, de um ou mais agentes crioprotetores que são classificados como não penetrantes ou extra celulares e agentes crioprotetores penetrantes ou intracelulares (Mazur, 1980). O mecanismo de ação dos agentes crioprotetores não penetrantes baseia-se na proteção dos espermatozóides contra os efeitos osmóticos durante o processo de congelação e podem ser representados pelos açúcares, lipoproteínas da gema do ovo e proteínas do leite. Os crioprotetores penetrantes são substâncias que têm a capacidade de proteção intracelular das células espermáticas (Nash, 1966). O mecanismo de ação destes crioprotetores baseia-se em estruturas que promovem ligações de hidrogênio com as moléculas da água. Estas ligações mudam a orientação da molécula da água nos cristais de gelo, criando

um ambiente menos nocivo para as células (Dalimata & Graham, 1997). Os crioprotetores penetrantes utilizados em meios diluentes para congelação de sêmen nos animais domésticos são: os álcoois: etanol, etilenoglicol, glicerol, metanol e polietilenoglicol (De Leeuw et al., 1993) e também as amidas: acetamida, formamida, lactamida e bem como o dimetilsulfoxido (DMSO) (Jeyendran & Graham, 1980; Ashwood – Smith, 1987; Medeiros et al., 2002). Dentre os crioprotetores penetrantes, o glicerol tem sido o mais utilizado para a congelação de sêmen bovino desde a sua descoberta em 1949 por Polge et al., o que foi um grande avanço na tecnologia do sêmen, pois levou à redução dos danos mecânicos do espermatozóide durante o processo de congelação (Vishwanath & Shannon, 2000).

3.2.2. Crioprotetores não penetrantes

Os crioprotetores não penetrantes ou extra-celulares têm seu mecanismo de ação baseado na proteção das células espermáticas contra o desequilíbrio osmótico desencadeado no processo de criopreservação, promovendo a desidratação dos espermatozoides pela ação osmótica do meio hipertônico, ou seja, eles agem no meio extracelular, reduzindo assim a possibilidade da formação de cristais de gelo intracelular. Os crioprotetores extra-celulares são representados pelos açúcares, lipoproteínas da gema do ovo e proteínas do leite (Amann & Pickett, 1987).

3.2.2.1. Gema de ovo e substitutos

Desde que Philips e Lardy (1940) descobriram os efeitos da gema de ovo na conservação dos espermatozoides, muitos estudos foram realizados para elucidar a origem da indiscutível ação benéfica que este produto oferece aos espermatozoides na condução da conservação *in vitro*.

A gema parece ser o mais eficiente dos agentes na proteção de espermatozoides contra o choque frio, e é comumente incluída em diluentes para criopreservação; contudo não é igualmente eficiente para todas as espécies. A gema de ovo mostrou ter ação crioprotetora e, quando presente

em meios diluentes, permite a redução da concentração de glicerol (Watson, 1995).

Segundo Holt & North (1988), a gema de ovo evitou o dobramento de caudas e conservou a motilidade dos espermatozóides. O componente ativo na gema de ovo é a fração lipoprotéica de baixa densidade, um componente de alto peso molecular, que age apenas na superfície celular (Watson, 1995). Juntamente com o conhecimento de que um detergente possa melhorar a proteção da gema de ovo (Pursel et al., 1978), sugere-se que a associação estreita entre os componentes lipídicos dela e a membrana celular talvez resultem numa modificação dos eventos da fase de transição. Tal fato permite concluir que a proteção é devida aos lipídios da gema de ovo e que a emulsificação aumenta essa atividade protetora (Watson, 1995).

O mecanismo de ação da gema de ovo ainda não é bem compreendido, mas acredita-se que ela atue na superfície da membrana plasmática, sem alterar sua composição (Watson, 1990), o que promove alguma proteção para o espermatozóide durante o choque-frio e o resfriamento (Jones, 1976).

Phillips & Lardy (1940) descreveram os efeitos benéficos da gema de ovo na proteção dos espermatozóides contra o frio. As lipoproteínas presentes nela promovem proteção contra o choque térmico provocado pelo resfriamento.

Em um estudo retrospectivo, Vishwanath & Shannon (2000) relataram que há um maior número de espermatozóides móveis após o choque-frio em meio contendo 5% de gema de ovo (80% de espermatozóides móveis), quando comparado com meio não contendo (menor que 5% espermatozóides móveis).

A quantidade de gema comumente utilizada na congelação de sêmen é em média 15 a 30% do volume total do material congelado. Esta variação na concentração é baseada nos resultados obtidos por Van Demark et al. (1957), tendo o percentual de espermatozóides móveis após congelação e descongelação, sido similar entre estas concentrações.

Há décadas, o principal componente utilizado em meios diluentes para congelação de sêmen bovino têm sido gema de ovo. Entretanto, nos últimos anos aumentou-se o argumento contra a presença de gema na composição desses meios, em função do risco de contaminação por bactérias ou micoplasma. Em verdade cada contaminação é uma possível fonte de endotoxinas capazes de danificar a capacidade fertilizante do espermatozóide. Como consequência direta, muitos países estão com receio do risco de introdução de doenças exóticas pelo transporte de produtos à base de ovo. Em função deste problema, meios diluentes livres de proteína animal vem sendo estudados e testados nos últimos anos (Bousseau et al., 1998).

Aires et al. (2003) testaram funções essenciais dos espermatozóides bovino, que foram diluídos em meio com base na lecitina de soja e diluente padrão contendo gema de ovo (TG). Comparou-se motilidade espermática, integridade de acrossoma, inductibilidade de reações acrossomais, habilidade dos espermatozóides em ultrapassar a zona pelúcida e capacidade de fertilização, após a criopreservação. Concluíram que o meio livre de produtos de origem animal é uma alternativa viável aos meios tradicionais baseados em gema de ovo.

Segundo Gil et al. (2000) o espermatozóide criopreservado com o meio Biociphos-Plus[®] apresenta uma maior integridade de membrana, quando comparado ao Triladyl[®] (meio diluente à base de gema). Já Thun et al. (2002), utilizando o meio TG, obtiveram resultados que mostraram efeitos crioprotetores superiores se comparados ao meio Biociphos-plus[®], baseado em extrato de soja. De Leeuw et al. (2000), avaliando os resultados de fertilidade usando sêmen bovino criopreservado com meio diluente à base de gema de ovo e extrato de soja, observaram que o Biociphos-Plus[®] reduziu significativamente a fertilidade em três de quatro touros testados.

A gema é usualmente utilizada na concentração de 20%. Estudos laboratoriais revelaram que esta concentração dificulta a padronização e interfere nas investigações metabólicas, o que pode ser superado pela substituição de alguns componentes da gema (Wall & Foote, 1999).

De acordo com Moussa et al. (2002), a lipoproteína de baixa densidade (LDL) tem sido previamente isolada e identificada como a fração crioprotetora do ovo. Em estudos recentes realizados pelos mesmos, observaram uma melhor motilidade espermática com o meio Triladyl[®] contendo LDL, quando comparado com o meio Triladyl[®] original.

Amirat et al. (2004), comparando a fertilidade do sêmen criopreservado de bovino, na presença de um meio diluente contendo LDL, com um meio diluente comercial Optidyl[®] (a base de 20% de gema de ovo), observaram que a motilidade espermática e a taxa de clivagem foram significativamente maiores no diluente com LDL, quando comparado ao Optidyl[®]. Concluíram que LDL pode ser uma ótima alternativa para composição de meios quimicamente definidos.

3.2.2.2. Açúcares

Os açúcares desempenham importantes papéis no meio diluente de congelação, atuando como substrato para a produção de energia pelos espermatozóides, na manutenção da pressão osmótica do diluente, aumentando a quantidade de água não congelada em temperaturas abaixo do ponto de congelação e reduzindo a concentração de sais na solução não congelada (Holt, 2000).

Os açúcares mais comumente utilizados em meios diluentes para congelação de espermatozóides são: glicose, lactose, sucrose, rafinose, manose, trealose. Utilizados em associações com dois ou três, açúcares diferentes, seu mecanismo de ação baseia-se na permissividade a efeitos osmóticos sobre os espermatozóides, ou seja, cria um ambiente hiperosmótico, fazendo com que a água contida nos espermatozóides saia para o meio extracelular, prevenindo a formação de cristais de gelo no interior das células (Amann & Pickett, 1987).

Alguns açúcares mostraram ser capazes de evitar os danos causados pela desidratação através da estabilização da bicamada lipídica, promovendo

alterações na permeabilidade e na separação lateral dos componentes da membrana plasmática. Dissacarídeos tais como, trealose e sucrose, interagem com os grupos polares da membrana espermática, promovendo assim sua estabilização (Dalimata & Graham, 1997). Acredita-se que estes dois açúcares estabilizem a bicamada de fosfolipídios, mantendo sua capacidade de transporte de cálcio, inibição da fusão de membranas e manutenção dos lipídios numa fase fluida na ausência de água (Crowe et al., 1987).

An et al. (2000) compararam o efeito crioprotetor de dissacarídeos (Sucrose e Trealose) e trissacarídeos (Rafinose e Melezitose), em sêmen congelado de camundongos e não encontraram diferenças significativas na taxa de sobrevivência dos espermatozóides. Yildiz et al. (2000), estudaram os efeitos da adição de diferentes tipos de açúcares (monossacarídeos, dissacarídeos e trissacarídeos) no meio diluente para congelação de espermatozóides de cães e obtiveram melhorias nos parâmetros de motilidade pós-descongelação com a adição de monossacarídeos (xilose e frutose), e melhores índices na percentagem de células vivas e integridade acrossomal quando utilizaram a trealose ($p < 0,01$). Concluíram que existem diferenças em relação ao mecanismo de ação entre os distintos tipos de açúcares (monossacarídeos, dissacarídeos e trissacarídeos) e que a combinação entre eles pode trazer melhorias na viabilidade espermática pós-descongelação.

Quanto à adição dos açúcares ao meio diluente para bovinos, Nagase et al. (1964) relataram que a xilose, frutose, glicose, galactose, maltose, sacarose e a rafinose, são eficientes para a congelação rápida do sêmen, entretanto, em um outro trabalho, Nagase et al. (1968) afirmaram que a lactose, maltose, sacarose e a rafinose melhoram a qualidade dos espermatozóides móveis pós-descongelação.

A influência da presença da trealose ou sacarose, a osmolaridade do meio de congelação e a taxa de resfriamento, no sucesso da criopreservação da célula espermática de touros foram investigadas por Woelders et al. (1997), que observaram uma melhor congelação com o meio contendo sacarose e trealose. Este resultado contradiz a constatação de De Leeuw et al. (1993), que a trealose apresenta na pós-descongelação um maior número de células

móveis que a sacarose. Chen et al. (1993) também investigaram o efeito da trealose no meio de congelação de sêmen de bovino sobre a viabilidade do espermatozóide após descongelação e não relataram contribuição positiva deste açúcar.

3.2.2.3. Glicina

A adição do aminoácido glicina em meios diluentes de sêmen foi utilizada inicialmente, para a preservação de espermatozóides de ouriço-dormar (Tyler & Rothschild, 1951), justificado pelo aumento da motilidade e da capacidade de fertilização. Posteriormente, a glicina foi empregada como protetora de membranas em sêmen bovino (Flipse & Almquist, 1956).

O efeito benéfico da glicina na sobrevivência espermática é resultado da quelação de metais pesados. A frutólise e a produção de ácido láctico são diminuídas quando utilizados diluentes contendo glicina, reduzindo a taxa de metabolismo ou promovendo mudança no processo glicolítico. A proteção contra o choque térmico pode ser atribuída ao aminoácido (Tyler & Rothschild, 1951; Flipse & Almquist, 1956; Aisen et al., 1990). A glicina possui uma excelente capacidade tamponante, mantendo o pH entre 5 e 7, ideal para estocagem de sêmen diluído (Albright et al., 1958).

Bicudo et al. (1993) testaram um meio diluente para a congelação de sêmen bovino, composto de citrato de sódio, glicina, glicose, frutose, gema de ovo e *Ovus es Paste* (OEP) e observaram uma melhora no vigor espermático e no percentual de retenção acrossômica, quando comparado ao TG.

O meio diluidor à base de glicina-gema de ovo, apresentou bons resultados quando utilizado na congelação do sêmen nas espécies eqüina (Papa et al., 1993), ovina (Gonzalez et al., 1996) e na refrigeração do sêmen canino (Lopes, 1997).

Entre as facilidades e os cuidados necessários encontrados com a utilização de cada um dos diluentes, o GG oferece uma grande facilidade de leitura, tanto para motilidade como para o vigor, pois o campo visual durante a análise microscópica se apresenta de forma clara na identificação dos espermatozóides (Chacur, 1996).

3.2.3 Crioprotetores penetrantes

Quanto aos crioprotetores penetrantes, o glicerol é o mais utilizado desde a sua descoberta em 1949 por Polge et al. o que foi um grande avanço na tecnologia do sêmen, reduzindo os danos mecânicos ao espermatozóide durante o processo de congelação (Vishwanath & Shannon, 2000).

O glicerol e os outros crioprotetores penetrantes como o DMSO, reduzem os danos celulares pela prevenção dos efeitos da concentração do meio extracelular (Nicolafsen & Hvidt, 1994).

Os espermatozóides bovinos são rotineiramente criopreservados utilizando-se entre 4 a 8% de glicerol e os resultados são aceitáveis, contudo, esta concentração é influenciada por outros componentes presentes no meio diluente (Woelders et al., 1997). Fahy (1986) relatou que a concentração osmótica de glicerol entre 0,25M (2,25%) e 1M (9%), tem uma menor toxicidade ao espermatozóide. Esta variação das concentrações de glicerol foi citada por Watson (1979), tendo descrito que a concentração ideal para a congelação de sêmen pode variar dependendo da curva de congelação, da presença dos componentes do meio diluente e da espécie em questão.

Estudos realizados há mais de vinte anos já elucidavam que o glicerol, apesar de ser um bom crioprotetor espermático, apresenta toxicidade para os espermatozóides nas diferentes espécies e pode induzir efeitos contraceptivos (Becker et al., 1977). Hammerstedt & Graham (1992), analisaram os efeitos tóxicos do glicerol, que incluíam mudanças nas estruturas citoplasmáticas devido ao aumento da viscosidade intracelular, alteração da polimerização da tubulina, efeitos no balanço bioenergético e alteração direta nas proteínas da membrana plasmática.

Na tentativa de substituir o glicerol por outros crioprotetores, Pace & Graham (1974) realizaram um experimento e obtiveram um aumento da motilidade pós-descongelação de sêmen bovino com DMSO, quando comparado à motilidade observada no sêmen congelado com glicerol. Contradizendo este trabalho, Jeyendran & Graham (1980) observaram que o glicerol apresentou um melhor resultado pós-descongelação que outros

crioprotetores testados (DMSO, acetamida, etilenoglicol, dimetilacetamida e metilacetamida).

Snedeker & Gaunya (1970) fizeram testes comparativos de motilidade pós-descongelção entre amostras congeladas com glicerol e diluentes adicionados de DMSO a 1%, com 6% de glicerol. Após os testes, os autores concluíram que o sêmen congelado com diluente acrescido de DMSO apresentou melhores resultados do que o criopreservado somente com o glicerol. Entretanto, De Leeuw et al. (1993) obtiveram um melhor resultado na criopreservação de sêmen bovino, utilizando o glicerol comparado com o propanodiol.

Outros crioprotetores são testados na busca de minimizar os efeitos tóxicos do glicerol e a obtenção de melhores resultados de congelação. Para espermatozóides eqüinos, a dimetilformamida, utilizada com crioprotetor penetrante, incrementou os índices de congelação, em comparação direta com diluentes à base de glicerol (Alvarenga, 2002; Medeiros, 2003). Todavia, segundo Gonzalez (2004), o glicerol preserva melhor a motilidade, o vigor e a integridade das membranas (plasmática, acrossomal e mitocondrial) das células espermáticas bovinas após a descongelção, quando comparado aos crioprotetores dimetilformamida e etilenoglicol.

3.3 Plasma Seminal

O sêmen é uma suspensão celular líquida, contendo gametas masculinos e secreções dos órgãos acessórios do trato genital masculino. (Hafez & Hafez, 2004). A secreção fisiológica formada na ejaculação, é conhecida como plasma seminal (Mann, 1981). O plasma parece ser um componente essencial no processo de monta natural, servindo como transportador e protetor dos espermatozóides, porém seu significado funcional é questionável. Em algumas espécies, é possível induzir gestação com espermatozóides colhidos do epidídimo (Hafez & Hafez, 2004).

Muitos autores têm descrito a interferência do plasma seminal nas funções espermáticas, como a motilidade (Baas et al., 1983), viabilidade,

fertilidade (Killian et al., 1993; Bellin et al., 1998) e no auxílio à capacitação (Miller et al., 1990). O plasma seminal também é relacionado a fatores prejudiciais ao sêmen quanto a habilidade de fertilização (Shivaji & Bhargava, 1987) com a presença de fatores decapacitantes e inibidores de motilidade (Iwamoto e Gagnon, 1988). Há também relatos de influência negativa do plasma seminal no armazenamento do sêmen (Martinus et al., 1991), por conter componentes prejudiciais à viabilidade espermática (Dott, 1974; Way et al., 2000).

Fatores prejudiciais à fertilidade, ou à congelabilidade, foram encontrados no plasma seminal em alguns estudos. Sugere-se que haja ligações promotoras de alterações bioquímicas entre as proteínas presentes no plasma seminal e da membrana dos espermatozoides, provocando alterações bioquímicas, que aumentariam a sua permeabilidade, promovendo injúria celular e choque térmico durante a congelação (Moore & Hibbit, 1976; Moustafa & Meszaros, 1981). Katska et al. (1996) também relataram a existência de fatores antifertilidade no plasma seminal bovino, que podem estabilizar as membranas plasmáticas e acrossomal do espermatozoide, impedindo a reação do acrossomo e inibindo a capacitação nos processos de FIV.

Em touros já foi demonstrado que existem proteínas do plasma seminal que estão correlacionadas com a fertilidade do reprodutor. Duas proteínas predominam em touros de alta fertilidade (26 kDa, pl 6,2 e 55 kDa, pl 4,5) e outras duas (16 kDa, pl 6,7 e 16 kDa, pl 4,1) em animais de baixa fertilidade (Killian et al., 1993). Em outros estudos, esta proteína de 55 kDa associada à fertilidade, foi caracterizada como sendo a osteopontina (Cancel et al., 1997). Killian (1992) mencionou que os touros de alta fertilidade possuem oito vezes menos a concentração destas proteínas marcadoras de baixa fertilidade; 3,5 vezes mais a proteína de 26Kda e 2,6 vezes mais a proteína de 55KDa.

Outros pesquisadores verificaram que a proteína de 26 kDa do plasma seminal, mencionada por Killian et al. (1993), apresentava homologia com a prostaglandina D sintetase tipo lipocalina (L-PGDS) (Gerena et al., 1998).

As interações entre o plasma seminal e as proteínas da membrana do espermatozóide podem ser responsáveis pelas diferenças na fertilidade e na congelabilidade do sêmen e a composição protéica é um dos aspectos que interferem nestas interações (Roncoletta et al., 2004). Em touros, estudos demonstraram que uma maior quantidade das proteínas BSP A1/A2 (16,5kDa, pI4,7 e 16 kDa, pI 4,9 a 5,2, respectivamente), que são as principais proteínas ligadoras de heparina nesta espécie, provavelmente forneça melhor proteção à membrana espermática durante a congelação (Mattos et al., 2004).

Garcia & Grahan (1987) reportaram que uma fração protéica de baixo peso molecular (>12-14KDa) não é benéfica para as células espermáticas durante os processos de congelação, e demonstraram que a diálise por duas horas a uma temperatura inicial de 37 a 5°C, pode ser um método para a separação desta fração protéica, melhorando a congelabilidade do sêmen. Al-Somai et al. (1994a) afirmaram que o prejuízo a motilidade espermática, causada por este grupo protéico, tem efeito dependente da concentração destas proteínas no plasma seminal. Al-Somai et al. (1994b) comentaram que as proteínas em maior concentração no plasma seminal, com peso molecular entre 15-16KDa, aniônicas, são prejudiciais à motilidade espermática e a sua retirada por diálise pode ocasionar melhora neste parâmetro. Van Voorst & Leenstra (1994) demonstraram que com sêmen de galo, a remoção de moléculas com pesos moleculares menores que 8 KDa do plasma seminal pode aumentar a capacidade de fertilização do sêmen resfriado; porém esta mesma técnica não tem efeito benéfico quando o sêmen é submetido à criopreservação.

A porção do plasma seminal prejudicial aos espermatozóides bovinos é a fração de alto peso molecular (Baas et al., 1983). Fatores de estímulo e manutenção da motilidade presentes no plasma seminal, não dializáveis (alto PM), podem bloquear os efeitos benéficos da gema de ovo utilizada no diluidor, por competição com os sítios de ligação na membrana plasmática dos espermatozóides (Schmehl et al. 1986). Entretanto, não somente a presença ou ausência dos fatores pré-determinam a fertilidade do ejaculado durante a sua estadia na cauda do epidídimo para a maturação, mas também a

concentração crítica destas proteínas pode ser responsável pelos efeitos do plasma seminal na fertilidade. Quando presentes em meio contendo plasma seminal provindo de animais de alta fertilidade, os espermatozóides têm maior habilidade para penetrar nos ovócitos em ensaios *in vitro*, quando comparados a meios com plasma seminal de animais de baixa fertilidade, sejam estes espermatozóides de animais de alta ou baixa fertilidade (Henault & Killian, 1996).

Ollero et al. (1998) verificaram que há perda de 04 bandas (35, 68, 100 e 245 kDa) no sêmen congelado, quando comparado ao fresco, e afirmaram que esta perda é devida a danos à membrana induzidos, pelos processos de criopreservação e descongelação. Ollero et al. (1997) afirmaram que esta perda de heterogeneidade na membrana, causada pela diluição e criopreservação do sêmen, pode ser prevenida com a remoção de moléculas com peso molecular menor que 10 kDa do plasma seminal, mantendo-se a heterogeneidade de membrana necessária para que esta seja viável para a criopreservação.

Uma alternativa para reduzir as concentrações de plasma seminal do ejaculado é a centrifugação do sêmen. Em eqüinos, a remoção do plasma seminal é uma técnica utilizada rotineiramente na criopreservação de sêmen, sendo essencial e necessária para o sucesso da congelação. A intensidade e tempo de centrifugação adequadas a uma maior recuperação de células espermáticas, com mínimos danos estruturais e funcionais aos espermatozóides, é um fator fundamental para obtenção de bons índices de congelabilidade do sêmen (Heitland et al., 1996). Papa et al. (1998), utilizaram intensidade de centrifugação entre 600 – 800xg/5 minutos, em experimentos com diferentes diluidores para a congelação de sêmen eqüino e não observaram nenhum efeito deletério desta técnica sobre a integridade do acrossomo.

Papa et al. (1981) demonstraram que a centrifugação é um método adequado para o nivelamento da variação de qualidade e quantidade dos ejaculados eqüinos. As forças e tempos de centrifugação não apresentaram efeito negativo sobre a motilidade e sobrevivência dos espermatozóides,

avaliados pela coloração supra vital. Os mesmos autores também observaram efeito positivo da centrifugação sobre a motilidade espermática, além de sua intensificação não ter depreciado a qualidade do sêmen *in vitro* durante os testes de termorresistência a 5°C e a 37°C.

A centrifugação para a remoção do plasma seminal, normalmente não é prejudicial ao sêmen, e seu efeito pode ser ainda minimizado com a utilização de diluidores específicos para esse fim, e com utilização de baixas forças de centrifugação, de 400x g (Jasko, 1994). Pickett et al. (1975), concluíram que forças de centrifugações entre 370x g e 829x g não produziram efeito deletério no sêmen. A diluição do sêmen antes de ser centrifugado é feita na proporção de 1:1, com soluções à base de glicose-EDTA, ou Ringer com lactato de sódio (Papa & Alvarenga, 1988). Na remoção do plasma seminal de sêmen ovino é comum a utilização de diluidores à base de leite (Olafsson, 1980; Lillo, 1984; Grotte et al., 1992; Soderquist et al., 1999; Gil et al., 2000).

Bedford et al. (1995a) relataram que a centrifugação de sêmen eqüino se torna essencial quando o diluidor a ser utilizado contém gema de ovo. De acordo com os autores, parece ocorrer uma interação negativa entre o plasma seminal e a gema, que leva à depressão da motilidade, mais evidente após longos períodos de estocagem. Essa interação não prejudica somente a motilidade espermática, mas também interfere negativamente nos índices de fertilidade (Bedford et al.1995b). Segundo Corteel (1980) em sêmen de bode a centrifugação também é fundamental quando o meio diluidor utilizado contém gema de ovo.

Gil et al. (2000) removeram o plasma seminal de sêmen de carneiros, em centrifuga refrigerada a 5°C e concluíram que este procedimento incrementou os índices de motilidade, linearidade, integridade de membrana e capacitação espermática. Os efeitos benéficos da remoção do plasma seminal sobre a congelabilidade de sêmen ovino também foi descrito por Oba et al. (2004), porém utilizando centrifugação em temperatura ambiente.

Vários autores têm sugerido com êxito a centrifugação de sêmen canino antes da criopreservação (Rota, 1998; Strom Holst, 1999; Peña, 2000).

Lopes & Papa (1998) verificaram uma melhora da qualidade espermática do sêmen de cão, descongelado no grupo onde foi realizada a centrifugação previa ao processo de congelação. Cunha (2002) concluiu que a centrifugação do sêmen canino não interferiu na qualidade do movimento espermático e na integridade de membrana e também observou que a centrifugação do sêmen diluído à base de leite desnatado e glicose, conferiu maior manutenção da qualidade do movimento espermático durante a incubação em banho-maria a 37°C.

López e Encalada (1997) investigaram em touros, o efeito da remoção parcial do plasma seminal sobre a congelabilidade do sêmen com concentração inferior a 500×10^6 espermatozoides/ml. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm/5 minutos e removeu-se 40-50% do sobrenadante, previamente à congelação. Foram aprovadas, com no mínimo 25 % de motilidade total, 52,9% das palhetas congeladas com a remoção parcial do plasma seminal, superando ($p < 0,01$) os 5,9% de palhetas aprovadas congeladas sem a remoção do plasma. Os autores concluíram que a remoção parcial do plasma seminal incrementou em mais de 40% a possibilidade de congelar com êxito amostras de sêmen consideradas diluídas.

Fatores que interferem na congelabilidade do sêmen ainda precisam ser amplamente pesquisados. Para melhor compreensão das alterações bioquímicas ocorridas durante os processos de criopreservação, além do conhecimento do perfil dos componentes da membrana plasmática dos espermatozóides, como mencionaram Ollero et al. (1998), também é necessária a compreensão das interações do plasma seminal e dos meios diluidores, frente aos diferentes padrões de fertilidade e/ou congelabilidade do sêmen de indivíduos de uma mesma população (Roncoletta et al., 2004).

3.4 Avaliação espermática

Os primeiros relatos científicos da manipulação seminal foram publicados pela *Philosophical Transactions of the Royal Society*, na Inglaterra, em 1678, quando Leewenhoek e seus auxiliares visualizaram, pela primeira

vez, as células espermáticas ao microscópio, classificando-as como “animais” microscópicos (Foote, et al., 2002). Desde então se desenvolveram os métodos de avaliação seminal, e Anderson (1942), descreveu como o melhor e o mais utilizado, desde aquela época, a análise microscópica da proporção de espermatozóides com movimentos progressivos normais, metodologia que até os dias atuais segue sendo amplamente utilizada. A estimativa visual da motilidade espermática é o mais simples, rápido e barato método de avaliação da qualidade seminal, porém é uma técnica subjetiva (Anzar et al., 1991), em que podem ocorrer variações de 30 a 60% quando um mesmo ejaculado é avaliado por técnicos diferentes (Coetzee et al., 1999; Verstegen et al., 2002). Viana (2004) relatou que os resultados de motilidade da análise subjetiva é em média 6% menor que os resultados obtidos pela análise computadorizada dos movimentos espermáticos.

Posteriormente, foram desenvolvidas novas técnicas de avaliação espermática em microscópios de campos luminosos e contraste de fases; citometria de fluxo e análise computadorizada dos movimentos espermáticos (CASA), que contribuíram muito para o avanço em suas quantificações (Foote, 1998). As análises de sêmen pós-descongelamento, como a avaliação da integridade acrossomal foi descrita em 1968 por Saacke & Marshall (Foote et al., 2002)

O desenvolvimento de técnicas que permitam predizer, com acurácia, o potencial fertilizante do sêmen, há muitos anos incitam os pesquisadores. Não existe um teste que, isoladamente, permita estimar o potencial fecundante do sêmen, visto que para o cumprimento de suas funções os espermatozóides apresentar diversos atributos (Graham et al. 1990; Arruda, 2000).

3.4.1. Avaliação computadorizada do sêmen

Vários estudos têm sido dirigidos com o objetivo de correlacionar resultados de investigações laboratoriais com os testes de fertilidade. Nas avaliações de qualidade seminal, a motilidade é a característica de viabilidade espermática investigada com maior frequência, embora sua correlação com fertilidade seja controversa. Outras variáveis seminais como a percentagem de

espermatozóides viáveis obtidas por CASA, têm sido altamente correlacionadas com a fertilidade (Januskauskas et al., 2000).

Pela CASA, a avaliação das variáveis espermáticas relacionadas com a movimentação dos espermatozóides é minuciosamente investigada pelo computador, revelando a performance dos espermatozóides pré e pós - congelação. A CASA é empregada em diversas espécies de mamíferos: homem (Marck et al., 1988); bovinos (Budworth et al., 1998); eqüinos (Varner et al., 1991; Ferreira et al., 1997) e ovinos (Souza et al., 1999), permitindo assim avaliar as variáveis detalhadamente, o que não é possível na análise convencional subjetiva (Moses et al., 1995).

CASA é um sistema objetivo para a determinação dos valores das variáveis espermáticas. Os resultados obtidos por esse método são mais fidedignos, comparados às avaliações padrões, para a determinação da qualidade de um ejaculado, elaboração de prognósticos de fertilidade e comparações de efeitos de diluidores ou outras substâncias adicionadas ao sêmen com o intuito de ampliar sua viabilidade (Verstegen et al., 2002); além disso, o método é prático, rápido e de fácil execução (Ferreira et al., 1997). As desvantagens da utilização da CASA são relativas aos custos do equipamento, instalação e manutenção, e padronização das mensurações a serem realizadas (Verstegen et al., 2002).

A importância da utilização da CASA é justificada pela relevância da cinética espermática na determinação da fertilidade dos espermatozóides. Dentre as variáveis determinadas, a velocidade progressiva e os padrões de movimentação celular têm se correlacionado com a penetração no muco cervical, em ovócitos; e com resultados de fertilização *in vitro* (Januskauskas et al., 1999).

Muitas publicações, desde meados da década de 80, têm relatado o uso desta técnica, tanto para análises clínicas quanto para pesquisas laboratoriais com sêmen. É na espécie humana que se observa a utilização da técnica em maior escala, em centros de reprodução assistida, com o intuito de avaliar o espermatozóide antes da realização das técnicas de reprodução e

correlacionar a qualidade espermática (movimentos e morfologia) com a fertilidade (Verstegen et al., 2002). Em bovinos existe correlação entre as variáveis qualitativas dos espermatozóides e a fertilidade (Farrell et al., 1998; Zhang et al., 1998). A motilidade é comumente descrita como a mais importante característica de habilidade fecundante dos espermatozóides. A motilidade e a velocidade espermática são altamente correlacionadas com a fertilidade (Gibson & Graham, 1969; Jondet & Rebadeux, 1974; Farrell et al., 1998).

Segundo, Brahmkshtri et al. (1999), a motilidade, a viabilidade e a integridade de acrossomo não estão correlacionadas com a taxa de concepção. Todavia, motilidade pós-descongelamento e viabilidade são altamente correlacionadas entre si. Os mesmos autores relataram que a baixa correlação entre a motilidade e a viabilidade pós-descongelamento, com a taxa de concepção, refletem a habilidade do espermatozóide em atingir o oócito, mas não indica a capacidade para a realização da reação acrossômica com a membrana vitelínica e a formação do pró-núcleo.

Viana (2004) verificou uma tendência ($0,05 < p < 0,01$) da motilidade total pós-descongelamento estar associada com a fertilidade, ratificando os relatos publicados por Casagrande et al. (1980).

Algumas características de movimentos dos espermatozóides são importantes para que eles sejam considerados aptos a fertilizar (Aitken & Clarkson, 1988). Outros valores, além da motilidade total, obtidos por CASA, são importantes para prever as taxas de fertilidade (Aitken et al., 1992; Amman, 1989). Os valores da velocidade média dos espermatozóides (VAP), velocidade linear (VSL) e velocidade curvilínea (VCL) são maiores ($p < 0,01$) nas amostras que fertilizam mais de 50% dos ovócitos que nas que fertilizam menos. A correlação positiva entre o número total de espermatozóides móveis inseminados, VCL e fecundidade, foram observados por Gerris & Khan, (1987); Brown et al. (1988) e Byrd et al. (1990). Holt & North (1994) relataram que a VCL está fortemente correlacionada com as taxas de fertilidade *in vitro*. Também pode existir correlação positiva com fertilidade, de acordo com os valores de retilinearidade (STR) e linearidade (LIN). LIN é a média dos valores de VSL e VCL, que podem ser relacionados negativamente com a fertilidade se

a proporção de espermatozóides com VSL alto for maior que VCL (Verstegen et al. 2002).

Alguns fatores podem interferir na análise correta do sêmen. Entre eles observa-se que a concentração espermática deve ser reduzida de modo a permitir a visualização do campo sem que existam interseções entre as trajetórias. Quanto maior o número de cruzamentos, maior é o erro da análise. Para adequar a amostra utiliza-se diluidores seminais que devem ser livres de partículas de tamanho semelhante ao espermatozóide analisado, evitando-se que estas sejam consideradas um espermatozóide imóvel (Ferreira et al., 1997).

3.4.2. Análise da integridade de membrana plasmática

A integridade da membrana plasmática é uma das variáveis mais estudadas no processo de avaliação das injúrias sofridas pela célula durante o processo de criopreservação (Dell' Aqua, 2000), devido ao papel fundamental da membrana, na sobrevivência do espermatozóide no trato genital da fêmea e na manutenção de sua capacidade fertilizante (Parks & Grahan, 1992).

A importância de se avaliar a integridade estrutural da célula espermática prende-se ao fato de que a funcionalidade do gameta está diretamente ligada à integridade da membrana plasmática, ou seja, para toda lesão estrutural tem-se uma alteração funcional correspondente (Zuccari, 1998).

O uso de fluorocromos (isolados ou associados), tem promovido uma boa metodologia de avaliação da integridade de vários compartimentos subcelulares, como a função mitocondrial e a integridade da membrana plasmática (Martinez, 2000). As sondas fluorescentes são muito utilizadas, pois têm a capacidade de se difundir pelas células íntegras ou lesadas, mesmo na presença de algum crioprotetor (Zúccari, 1998) e sua utilização busca avaliar a integridade e a função de compartimentos específicos da célula espermática (Peterson et al., 1974).

Garner et al. (1986) descreveram o uso combinado de duas substâncias fluorescentes, o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e o iodeto de propídio (IP), para investigar a integridade do espermatozóide de bovinos e outras espécies. Entretanto, a contagem dos espermatozóides foi realizada com citômetro de fluxo, avaliando um número maior de células, em um tempo reduzido.

Harrison & Vickers (1990) descreveram a mesma técnica, porém modificada, em que uma pequena quantidade de formaldeído era adicionada à amostra, o que viabilizou a avaliação por preparação úmida em microscópio de epifluorescência.

Com o objetivo de avaliar a integridade da membrana plasmática, vários autores têm utilizado com sucesso a associação do IP com o CFDA (Harrison & Vickers, 1990; Coelho et al., 1995; Peña et al., 1998; Papa et al., 2002; Brito et al., 2003).

O IP possui afinidade com o DNA e cora de vermelho o núcleo celular, é impermeável à membrana celular íntegra, penetrando na célula e desempenhando sua função somente naquelas com a membrana plasmática lesada (Garner et al., 1988; Harrison & Vickers, 1990; Arruda, 2000).

A utilização do IP tem apresentado êxito em diversos trabalhos realizados em microscopia de epifluorescência e em citometria de fluxo; este sucesso está relacionado com a alta estabilidade que este fluorocromo apresenta. (Garner et al., 1988; Valcarcel et al., 1994; Arruda, 2000; Dell' Aqua, 2000; Papa et al., 2002; Zahn, 2002; Brito et al., 2003; Gonzalez, 2004; Celeghini, 2005).

O CFDA é conhecido na literatura como coloração vital, apresentando-se como composto hidrofóbico, capaz de penetrar a membrana celular sem interferência fisiológica, não possuindo fluorescência sob esta forma. No interior da célula o CFDA é hidrolisado por esterases, produzindo o CFDA livre, que é retido dentro da célula com a membrana plasmática intacta, exibindo

uma fluorescência de coloração verde (Harrison & Vickers, 1990; Valcarcel et al., 1994; Peña et al., 1998).

Brito et al. (2003) observaram uma alta correlação entre os valores de integridade de membrana obtidos através da associação dos corantes CFDA e PI e a taxa de fertilização *in vitro*.

Zúccari (1998) trabalhando com espermatozóides eqüinos, verificou correlações entre as variáveis motilidade, vigor e integridade da membrana plasmática, pela utilização das sondas fluorescentes, IP e CFDA, após a descongelação e durante o teste de termoresistência.

Brito et al. (2003) compararam métodos de avaliação da membrana dos espermatozóides bovinos e verificaram que os valores de espermatozóides com a membrana intacta, determinada pelas colorações de CFDA/IP e SYBR-14/IP, foram maiores do que a proporção de espermatozóides com membrana íntegra ao teste hiposmótico durante a incubação pós-descongelação.

Coelho et al. (1995) comparando a integridade da membrana plasmática dos espermatozóides bovinos e sua relação com a motilidade progressiva a uma temperatura de 38,5°C durante 2-4 horas, correlacionaram positivamente o declínio da motilidade progressiva com relação ao percentual de células íntegras em função do tempo de incubação, sugerindo que a perda da motilidade está associada às lesões da membrana plasmática.

Associações de sondas fluorescentes permitem avaliar simultaneamente mais do que um compartimento da célula espermática (Celeghini, 2005). Arruda e Celeghini (2003) desenvolveram uma técnica rápida e precisa para a avaliação simultânea da integridade das membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial das células espermáticas de bovino, validando uma técnica na qual foram associadas às sondas fluorescentes IP, FITC-PSA e MITO, para identificar simultaneamente integridade da membrana plasmática, acrossomal e função mitocondrial, respectivamente. Em estudo mais recente, Celeghini (2005) concluiu que a avaliação simultânea da integridade das membranas plasmáticas e acrossomal e da função mitocondrial

pode ser realizada por técnicas simples e de alta repetibilidade, pela associação das sondas fluorescentes PI, FICTC-PSA e MITO ou PI, FICT-PSA e CMXRos ou PI, FICT-PSA e JC-1.

4. Objetivos

4. OBJETIVOS

- 1.** Testar uma nova metodologia de congelação de sêmen bovino que possa contribuir para o avanço da biotecnologia nesta espécie,
- 2.** Testar o efeito da centrifugação de amostras de sêmen antes da congelação.
- 3.** Avaliar a viabilidade espermática pós-descongelação, com diferentes meios diluidores.
- 4.** Desenvolver um novo diluidor, com fórmula inovadora para as técnicas de congelação de sêmen bovino.
- 5.** Comparar a influência dos diferentes tempos de estabilização sobre os parâmetros espermáticos pós-descongelação, pela análise computadorizada do movimento (CASA) e da fluorescência.
- 6.** Comparar as taxas de fertilidade entre a metodologia que apresentar melhores resultados laboratoriais, com a convencional.

5. Material e Métodos

5. MATERIAL E MÉTODOS

Para atingir os objetivos propostos foram realizados três experimentos distintos. No primeiro avaliaram-se os efeitos de diferentes meios diluentes, e da remoção do plasma seminal na congelação do sêmen. No segundo, comparou-se a influência dos diferentes tempos de estabilização sobre as variáveis espermáticas pós congelação. Finalmente, o terceiro constituiu o teste de fertilidade para o qual utilizou-se as metodologias de criopreservação com melhores desempenhos nos dois experimentos anteriores.

5.1 EXPERIMENTO I: Efeito de três meios diluentes, com ou sem a remoção do plasma seminal.

5.1.1 Local da Pesquisa e Animais

As atividades experimentais foram realizadas no Laboratório do Centro de Reprodução Animal (CERAN) do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, localizado no Campus de Botucatu. A colheita, manipulação e congelação do sêmen foram realizadas nas fazendas de origem dos touros e o sêmen congelado foi transportado ao CERAN para as análises pós congelação.

Foram utilizados 40 touros, sendo, 20 *Bos taurus indicus*, provenientes das fazendas: Braido (10), no município de Cerqueira César-SP, Andorinha (5), em Avaré-SP e Experimental São Manuel (5) da UNESP – Campus de Botucatu, na cidade de São Manuel-SP, e 20 *Bos taurus taurus*, oriundos da Fazenda Carretão (10) e da Central Bela Vista de Genética Bovina (10). Todos os animais foram aprovados em exames andrológicos prévios à experimentação.

5.1.2 Colheita do Sêmen

As colheitas de sêmen foram realizadas por estímulo elétrico de baixa amperagem (eletroejaculador), com os animais posicionados em bretes de contenção. Antes das colheitas, realizou-se a higienização externa do prepúcio com água e interna com solução fisiológica. O ejaculado foi recolhido em um funil plástico, acoplado a um tubo de colheita graduado e protegido por um envoltório de isopor a fim de evitar exposição à luz e mudanças drásticas de temperatura.

5.1.3 Avaliações do Sêmen Fresco

Todas as amostras de sêmen foram avaliadas antes do processamento pré-congelação, segundo as características. Consideraram-se duas classes de caracteres da amostra: os físico-químicos (macroscópicos): coloração, odor, aspecto e volume; e os microscópicos: turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração e patologia espermática.

5.1.3.1 Volume

O volume foi determinado mediante leitura direta na graduação milimétrica do tubo coletor (15mL), expresso em mililitros (mL).

5.1.3.2 Cor e Aspecto

A coloração e o aspecto dos ejaculados foram avaliados visualmente e classificados de branco acinzentada a amarelo citrino. O aspecto, que depende fundamentalmente da concentração de espermatozóides, foi classificado em três categorias: aquoso, leitoso ou cremoso.

5.1.3.3 Turbilhonamento

O turbilhonamento (movimento de massa), foi avaliado pela deposição de uma gota de sêmen sobre uma lâmina aquecida (37°C), observada em microscópio de luz em aumento de 100 X, sendo o valor classificado, subjetivamente, em ordem crescente: 0 , + , ++ , +++

5.1.3.4 Motilidade e Vigor

As avaliações de motilidade e vigor foram realizadas aplicando-se uma gota de sêmen sobre lâmina aquecida (38-40°C) e recoberta por lamínula. A análise foi realizada por microscopia de contraste de fase. Os resultados obtidos foram expressos em percentagem para a motilidade e por um escore de zero a cinco (0-5), para o vigor.

5.1.3.5 Concentração Espermática

Para a obtenção das concentrações espermáticas, diluiu-se uma amostra de 20 µL de sêmen em 4 mL de água (1:200). A contagem das células foi realizada em Câmara Hematocitométrica de Neubauer, sob microscopia óptica comum em aumento de 400X.

5.1.3.6 Morfologia Espermática

O exame de morfologia espermática foi realizado na fase de seleção dos animais, pela técnica de câmara úmida. Para a obtenção da amostra, o sêmen foi diluído na proporção de 1:100, em solução de formol salino tamponado. A análise foi realizada pela deposição de uma gota desta solução sobre lâmina recoberta por lamínula e analisada em microscópio de contraste de fase, no aumento de 1000x, com óleo de imersão. As patologias foram classificadas em defeitos maiores e menores (Blom, 1972).

5.1.4 Procedimento Experimental

Este experimento foi delineado objetivando a constatação dos efeitos dos meios diluentes e da remoção do plasma seminal pela centrifugação, sobre as variáveis espermáticas pós-congelação, conforme a figura 2.

Para a realização deste experimento foram confrontados três diferentes meios diluentes de duas frações (fração I, sem glicerol e fração II, com glicerol): TG (Mies Filho, 1987), GG (Bicudo et al., 1993) e M20 (diluente desenvolvido para a pesquisa). A remoção do plasma seminal foi realizada pela centrifugação das amostras.

Neste experimento foram colhidos ejaculados de 40 touros (n=40). Após a colheita e a avaliação inicial, os ejaculados obtidos foram fracionados em seis alíquotas e diluídos em fração I de TRIS, GG e M20, ou seja, duas alíquotas com cada diluente.

Três dessas alíquotas, uma de cada diluente foram diluídas normalmente (fração I+ fração II), para a padronização da concentração em 30×10^6 espermatozoides por palheta.

As outras três alíquotas foram diluídas com a fração I de cada diluente, na proporção 2:1, e centrifugadas em centrífuga Baby I (Fanem[®]), por 10 minutos a 600 xg, para a remoção do plasma seminal. Após a centrifugação desprezou-se o sobrenadante e os "pellet" foram ressuspensos até a metade do volume final nos referidos meios, sem glicerol, e o volume final foi completado com os respectivos meios diluentes fração II. A diluição nas alíquotas centrifugadas também foi realizada até atingir o volume para padronização da concentração em 30×10^6 espermatozoides por palheta.

Finalizada a diluição, as amostras (240) foram envasadas manualmente em palhetas francesas de 0,5 mL, previamente identificadas com o número do touro, meio diluente e tratamento realizado: centrifugado (C) ou não centrifugado (NC). As palhetas foram vedadas por álcool polivinílico.

5.1.5 Congelação do Sêmen

Após o envase e fechamento, as palhetas foram dispostas horizontalmente sobre bandeja de aço telada e submetidas ao período de estabilização de quatro horas a 5°C, em geladeira automática digital (Minitub®_ Porto Alegre-Brasil).

Após esse período, as bandejas com as palhetas foram colocadas a 5,0 cm do nível do nitrogênio líquido, amparadas por suporte de alumínio (Figura 1A); todo o conjunto no interior de uma caixa de isopor (51 x 45 x 45 cm). Após 20 minutos em vapor de nitrogênio, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido (Figura 1B), após o término do processo de congelação as palhetas foram acondicionadas em raques e colocadas em canisteres de um botijão criobiológico.

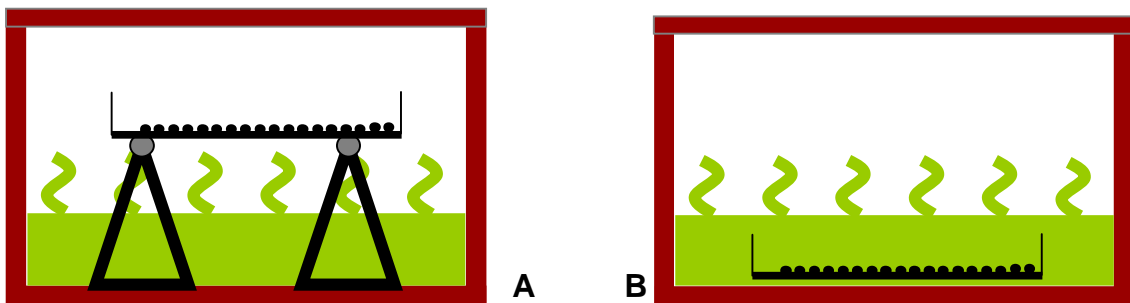


Figura 1 – Esquematização gráfica do processo de congelação. **A-** Palhetas alojadas em bandejas de aço telada mantidas a 5cm do nível de N₂. **B-** Palhetas imersas em N₂.

5.1.6 Descongelação do Sêmen

Decorrido um mês de estocagem em nitrogênio líquido, uma palheta de cada tratamento (40 touros x 3 diluentes x 2 grupos – centrifugado ou não centrifugado = 240 palhetas), foi descongelada em banho maria a 46°C/20" (Dellaqua Jr, 2000), e para uma melhor homogeneização das amostras, o sêmen foi transferido das palhetas para microtubos mantidos a temperatura de 37°C.

5.1.7 Avaliação Computadorizada do Sêmen

O sêmen foi homogeneizado e submetido à análise computadorizada pelo Hamilton Thorne Research – IVOS 10, colocando uma gota na câmara de Makler aquecida a 38°C, para as análises das variáveis espermáticas. As análises foram realizadas em *setup*, ajustados para as características seminais de bovinos (Anexo I), sendo avaliadas no mínimo três campos de cada amostra.

As variáveis espermáticas consideradas foram: motilidade espermática total (MT), motilidade espermática progressiva (MP), velocidade curvilínea (VCL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN) e percentagem de espermatozóides rápidos (RAP).

5.1.8 Avaliação da Integridade da Membrana Plasmática

A análise da integridade da membrana plasmática foi realizada com a utilização das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (FDA) e iodeto de propídio (IP), segundo a técnica descrita por Harrison & Vickers (1990), modificada por Zuccari (1998), em que diluiu-se 20 µl de sêmen em 40µl da solução de trabalho. O material foi analisado entre lâmina e lamínula, em microscópio de epifluorescência (Leika®) com aumento de 400X, por excitação em filtro BW. Foram contadas 200 células, sendo consideradas íntegras as coradas em verde, e lesadas as coradas em vermelho ou em verde e vermelho. O resultado foi expresso em percentagem de células íntegras.

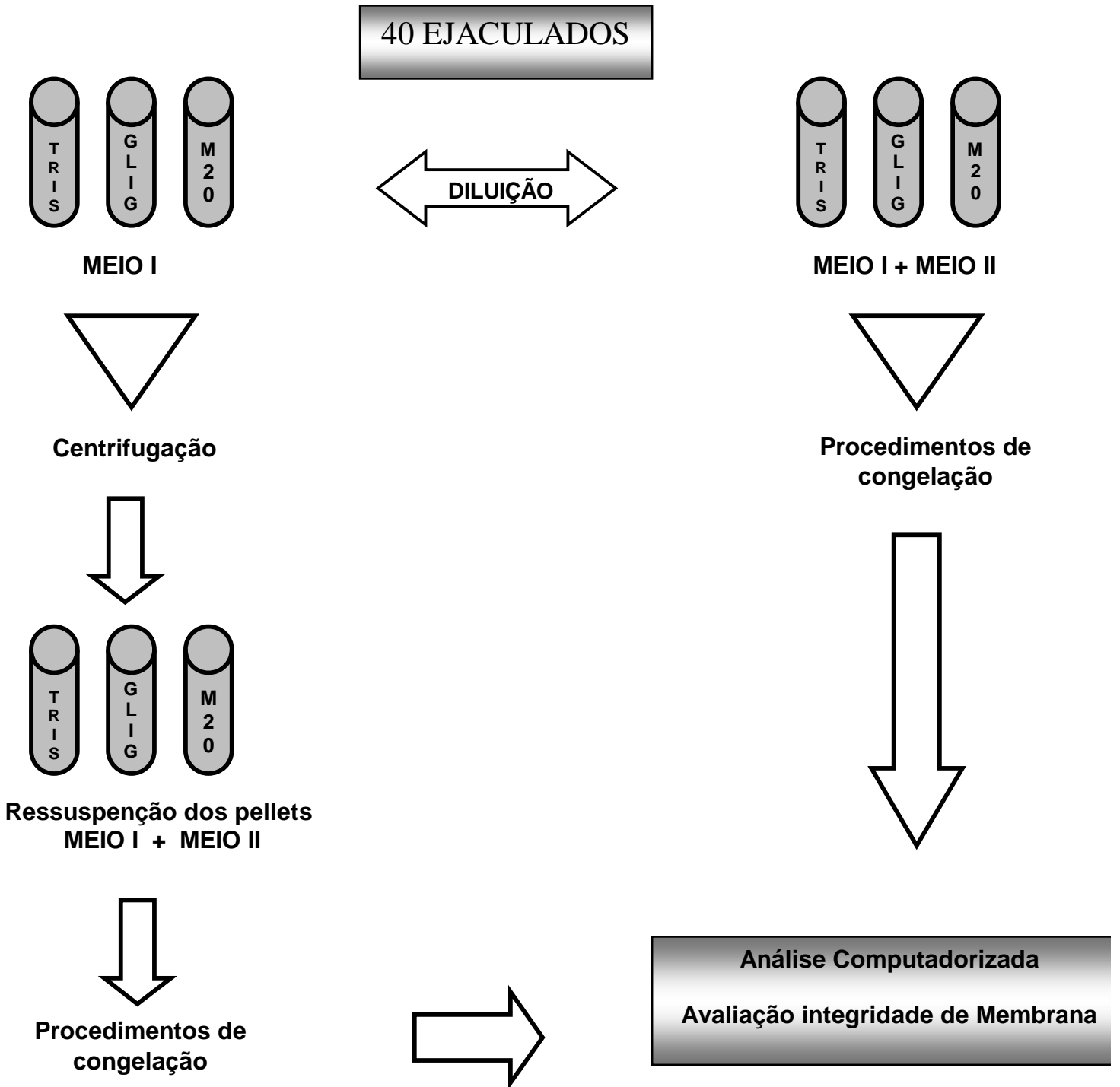


Figura 2: Esquema simplificado dos procedimentos experimentais realizado no experimento I

5.1.9 Análise Estatística

Para a análise estatística dos dados deste experimento, usou-se um fatorial 2 X 2 X 3 (2 raças X 2 grupos (centrifugado e não centrifugado) X 3 diluidores), com parcelas subdivididas, num delineamento inteiramente casualizado. As parcelas principais foram os touros e as sub-parcelas as amostras de sêmen, obtidas de uma colheita por touro, às quais foram aplicadas as combinações de grupo (centrifugado e não centrifugado), com diluidor.

Os resultados foram analisados por meio do programa GLM do SAS 8.02, usando-se o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijklm} = m + r_i + t_{ij} + d_k + c_l + (rd)_{ik} + (rc)_{il} + (dc)_{kl} + (rdc)_{ikl} + e_{ijklm}$$

Onde: m= efeito fixo da média;

r_i = efeito fixo da i-ésima raça (i=1,2);

t_{ij} = efeito aleatório do j-ésimo touro dentro da i-ésima raça (j= 1,2,...,20) = erro(a)

d_k = efeito fixo do k-ésimo diluente(k=1,2,3);

c_l = efeito fixo do l-ésimo grupo de centrifugação (l=1,2)

$(rd)_{ik}$ = efeito fixo da interação entre a i-ésima raça e o k-ésimo diluente;

$(rc)_{il}$ = efeito fixo da interação entre a i-ésima raça e o l-ésimo grupo de centrifugação

$(dc)_{kl}$ = efeito fixo da interação entre o k-ésimo diluente e o l-ésimo grupo de centrifugação

$(rdc)_{ikl}$ = efeito fixo da interação entre a i-ésima raça, o k-ésimo diluente e o l-ésimo nível de centrifugação;

e_{ijklm} = erro aleatório das sub-parcelas= erro(b).

O teste F de raças usou o erro (a), e o teste F dos demais efeitos fixo, o erro (b). Usou-se $p < 0,01$ como nível de significância.

Quando se observou interação entre diluidor e centrifugação, os efeitos de centrifugação foram desdobrados em contrastes ortogonais.

5.2 EXPERIMENTO II: Influência dos diferentes tempos de estabilização sobre as variáveis espermáticas pós-descongelamento.

5.2.1 Local da Pesquisa e Animais

As atividades experimentais foram realizadas no laboratório CERAN do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", localizado no Campus de Botucatu.

Foram utilizados 40 touros (diferentes dos utilizados na primeira etapa do projeto), sendo 20 *Bos taurus taurus*, oriundos da Estância dos Alberti (10) e Fazenda Aliança (10), ambas no município de São João da Boa Vista-SP, e 20 *Bos taurus indicus*, provenientes das fazendas Braido (10) e Carretão (10). Todos os animais foram aprovados nos exames andrológicos, prévios à experimentação.

O sêmen foi colhido, manipulado e congelado nas fazendas de origem dos touros. Após a congelamento o sêmen foi transportado para o CERAN, onde foram realizadas as análises.

5.2.2 Colheita de Sêmen

As colheitas de sêmen, neste experimento, foram iguais ao descrito em 5.1.2.

5.2.3 Avaliações do Sêmen Fresco

Logo após a colheita, o sêmen foi avaliado macroscopicamente quanto ao volume, odor, cor e aspecto e microscopicamente para o turbilhonamento, motilidade e vigor espermático, seguindo a mesma metodologia do experimento I.

5.2.4 Procedimentos Experimentais

Para atingir os objetivos propostos, este experimento foi delineado para a observação dos efeitos do tempo de estabilização em geladeira automática digital (Minitub[®] _ Porto Alegre-Brasil) a 5°C nos tempos de 60, 120, 180 e 240 min. Os efeitos destes tempos sobre as variáveis espermáticas, pós-descongelamento, foram determinados por CASA e teste de integridade de membrana plasmática. Também foram avaliados os efeitos da remoção do plasma seminal, nos diferentes tempos de estabilização.

Nesta etapa do projeto, utilizaram-se apenas os meios diluentes TRIS, como controle e M20, que apresentou melhores resultados no experimento I.

Cada ejaculado foi dividido em quatro partes e diluídas com a fração I dos diluentes TRIS e M20, duas partes com cada um. Duas frações (uma de cada diluente), foram centrifugadas para a remoção do plasma seminal, seguindo a mesma metodologia do experimento I. As duas alíquotas restantes (uma de cada diluente), foram diluídas normalmente (fração I+ fração II), para a padronização da concentração em 30×10^6 espermatozoides por palheta.

Cada alíquota de sêmen foi envasada em quatro palhetas francesas de 0,5 ml, que foram identificadas com o número do touro, meio diluente, metodologia empregada (centrifugada ou não) e tempo de estabilização a serem submetidas. A vedação das palhetas foi realizada com álcool polivinílico de diferentes cores para facilitar a visualização dos grupos de tempos de estabilização.

5.2.5 Congelamento do Sêmen

Após o envase e fechamento das palhetas, elas foram separadas em quatro bandejas:

- I : 60 min de estabilização
- II : 120 min de estabilização
- III : 180 min de estabilização
- IV : 240 min de estabilização

Cada bandeja foi submetida à estabilização em geladeira automática digital (Minitub® _ Porto Alegre-Brasil), a 5°C, durante os respectivos períodos. A cada 60 minutos, um grupo de palhetas foi retirado da geladeira e submetido ao processo de congelação como descrito no item 5.1.5.

5.2.6 Descongelação do Sêmen

Decorrido um mês de estocagem em nitrogênio líquido, uma palheta de cada tratamento (40 touros x 2 diluentes x 2 grupos – centrifugado ou não centrifugado x 4 tempos de estabilização= 640 palhetas), foi descongelada aleatoriamente em banho-maria a 46°C/20” (Dellaqua Jr, 2000), e para uma melhor homogeneização das amostras o sêmen foi transferido das palhetas para microtubos mantidos a temperatura de 37°C.

5.2.7 Avaliação do Sêmen Pós - Descongelação

As variáveis espermáticas foram avaliadas por meio da análise computadorizada do movimento (CASA), e a integridade da membrana realizada pela técnica descrita por Harrison & Vickers (1990), modificada por Zúccari (1998), conforme descrito nos itens 5.1.7 e 5.1.8.

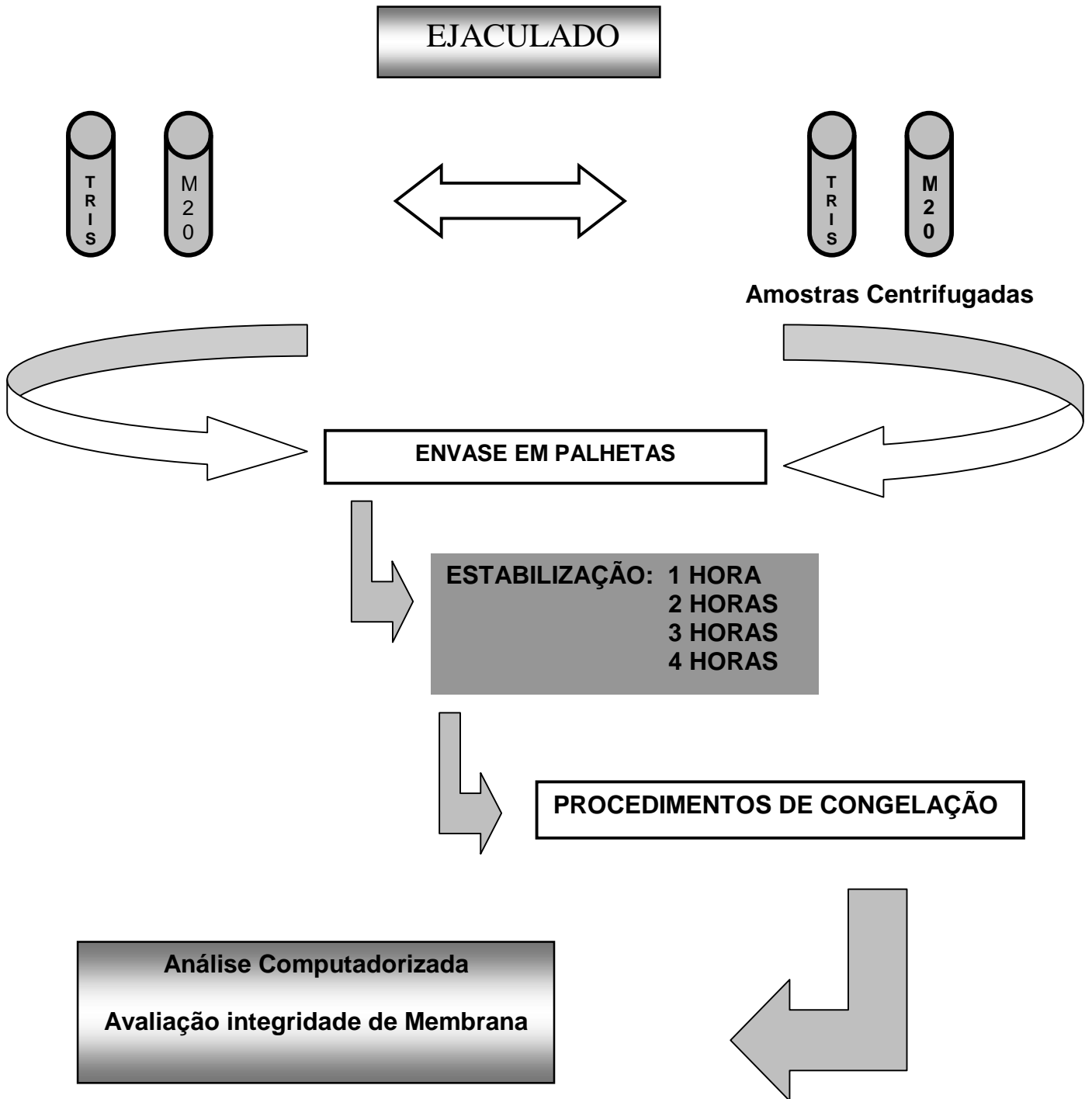


Figura 3: Esquema simplificado dos procedimentos experimentais realizado no experimento II

5.2.8. Análise Estatística

Após o término da fase laboratorial os dados foram analisados por um fatorial 2 X 2 X 2 X 4 (2 raças X 2 grupos (centrifugado e não centrifugado) X 2 diluidores X 4 tempos de estabilização), com parcelas subdivididas, num delineamento inteiramente casualizado. As parcelas principais foram os touros e as sub-parcelas as amostras de sêmen, obtidas de uma colheita por touro, às quais foram aplicados as combinações de grupo, diluidor e tempo.

Os resultados foram analisados por meio do programa MIXED do SAS 8.02, usando-se o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijklmn} = m + r_i + t_{ij} + d_k + c_l + s_m + (rd)_{ik} + (rc)_{il} + (rs)_{im} + (dc)_{kl} + (ds)_{km} + (cs)_{lm} + (rdc)_{ikl} + (rds)_{ikm} + (dcs)_{klm} + (rdcs)_{ijkm} + e_{ijklmn}$$

Onde: m= efeito fixo da média;

r_i = efeito fixo da i-ésima raça (i=1,2);

t_{ij} = efeito aleatório do j-ésimo touro dentro da i-ésima raça (j=1,2,...,20) = erro(a)

d_k = efeito fixo do k-ésimo diluente(k=1,2);

c_l = efeito fixo do l-ésimo grupo de centrifugação (l=1,2);

s_m = efeito fixo do m-ésimo tempo de estabilização;

$(rd)_{ik}$ = efeito fixo da interação entre a i-ésima raça e o k-ésimo diluente;

$(rc)_{il}$ = efeito fixo da interação entre a i-ésima raça e o l-ésimo grupo de centrifugação;

$(rs)_{im}$ = efeito fixo da interação entre a i-ésima raça e o m-ésimo tempo de estabilização;

$(dc)_{kl}$ = efeito fixo da interação entre o k-ésimo diluente e o l-ésimo grupo de centrifugação;

$(ds)_{km}$ = efeito fixo da interação entre o k-ésimo diluente e o m-ésimo tempo de estabilização;

$(cs)_{lm}$ = efeito fixo entre o l-ésimo grupo de centrifugação e o m-ésimo tempo de estabilização;

$(rdc)_{ikl}$ = efeito fixo da interação entre a i-ésima raça, o k-ésimo diluente e o l-ésimo grupo de centrifugação;

$(rds)_{ikm}$ = efeito fixo da interação entre a i-ésima raça, o k-ésimo diluente e o m-ésimo tempo de estabilização;

$(dcs)_{klm}$ = efeito fixo da interação entre o k-ésimo diluente, o l-ésimo grupo de centrifugação e o m-ésimo tempo de estabilização;

$(rdcs)_{iklm}$ = efeito fixo da interação entre a i-ésima raça, o k-ésimo diluente, o l-ésimo grupo de centrifugação e o m-ésimo tempo de estabilização.

e_{ijklmn} = erro aleatório das sub-parcelas = erro(b).

A estrutura de covariância das medidas repetidas foi a autorregressiva do primeiro grau.

O efeito de tempo foi desdobrado em polinômios do segundo grau em um modelo linear hiperbólico:

$$\hat{y} = b_0 + b_1 * t + b_2 * (1/t)$$

onde: b_0 , b_1 e b_2 são os coeficientes de regressão, e t é o tempo de estabilização.

5. 3 EXPERIMENTO III: Efeito de dois meios diluentes e da centrifugação sobre a fertilidade de vacas inseminadas em tempo fixo.

5.3.1 Local da Pesquisa e Animais

Para a realização do teste de fertilidade foi utilizado sêmen de um touro zebuíno da raça Brahman, alojado na Central Bela Vista Genética Bovina, no município de Pardinho-SP.

As inseminações artificiais (IA) referentes ao teste foram realizadas em duas localidades: Fazenda Santa Marta, município de Lavínia - SP, e na Agropecuária Café no Bule Ltda, município de Ribas do Rio Pardo – MS.

5.3.2 Colheita do Sêmen

Após a aprovação do animal em exame andrológico completo iniciaram-se as colheitas de sêmen para a congelação das doses que foram utilizadas neste experimento. Previamente às colheitas, o animal teve o prepúcio higienizado externamente com água e internamente com solução fisiológica. As colheitas foram realizadas por funcionários da Central Bela Vista, em vagina artificial, utilizando uma fêmea como manequim. O ejaculado foi recolhido em tubo de colheita graduado, protegido por envoltório de tecido a fim de evitar a exposição à luz e mudanças bruscas de temperatura.

5.3.3 Procedimentos Experimentais

O objetivo do teste de fertilidade foi verificar a capacidade fecundante do sêmen congelado com as metodologias de melhores desempenhos nas análises laboratoriais dos experimentos anteriores. Para atingir este objetivo, cada ejaculado foi dividido em três partes, uma diluída em TRIS (grupo controle) e as outras duas diluídas em M20, com e sem a remoção do plasma seminal.

Todas as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 ml, previamente identificadas com o número e nome do touro e do tratamento. Os tratamentos foram identificados como A, B ou C (A= TRIS; B= M20 com remoção do plasma seminal e C= M20 sem o plasma seminal). Após o envase e fechamento, as palhetas foram colocadas para estabilizar em geladeira automática digital (Minitub[®]_ Porto Alegre – Brasil), durante três horas (tempo determinado pelos resultados obtidos no experimento II); em seguida, submetidas ao processo de criopreservação igual aos experimentos anteriores.

Foram realizadas 418 inseminações artificiais (IA), em duas localidades: 196 na Fazenda Santa Marta, e 222 na Agropecuária Café no Bule Ltda, tendo 140 vacas sido inseminadas com o sêmen do grupo A, 139 com o grupo B e 139 com o grupo C. A escolha das palhetas para inseminação foi feita de maneira aleatória.

Para a realização das inseminações artificiais utilizou-se o manejo reprodutivo habitual das propriedades. Em ambas empregou-se um programa de IA em Tempo Fixo (IATF).

Na fazenda Santa Marta o protocolo de sincronização do ciclo estral e ovulação utilizado constituiu-se de implante de dispositivo progestágeno vaginal (CIDR[®]), com aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol (Estrogin[®]) no primeiro dia do programa (D0). A retirada do implante foi realizada no D9, seguida de aplicação de 150 µg de D–cloprostenol (Prolise[®]) + 300 UI de eCG (Novormon[®]). Quarenta e oito horas após a remoção do implante foram realizadas as IATF, seguidas por aplicação de 100 µg de GnRH sintético (Gestran[®]), como demonstrado na Figura 4.

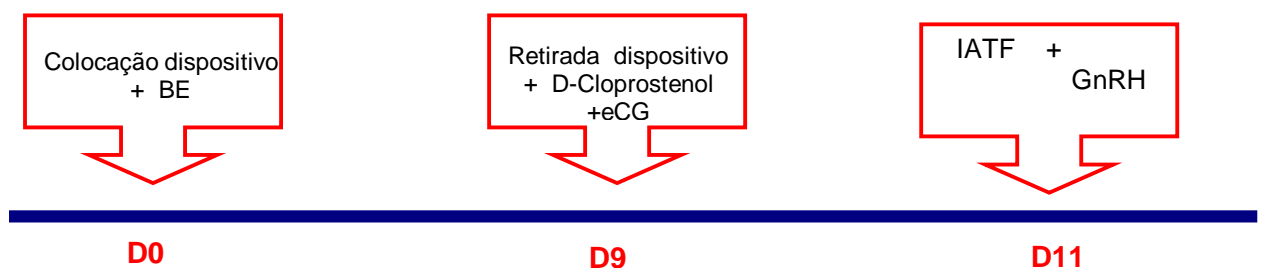


Figura 4: Esquematização do protocolo de sincronização de estro e ovulação utilizado na fazenda Santa Marta.

Na Agropecuária Café no Bule Ltda, para o programa de IATF foi implantado dispositivo de progestágeno auricular (Crestar[®]) no D0, e retirado nove dias depois, seguido de aplicação de 300 UI de eCG (Foligon[®]). As IATF foram efetuadas 48 horas após, como demonstrado na Figura 5.



Figura 5: Esquematização do protocolo de sincronização de estro e ovulação utilizado na Agropecuária Café no Bule Ltda.

O intuito do trabalho não foi a comparação de protocolos de sincronização e ovulação, por isso foram utilizados os usuais das propriedades.

O diagnóstico de gestação foi realizado por exame ultra-sonográfico, 45 dias após as inseminações.

5.3.4 Análises Estatísticas

Os dados de fertilidade foram analisados mediante regressão logística, utilizando-se o procedimento LOGISTIC do SAS 802 (SAS, 2001).

O modelo incluiu os seguintes efeitos: fazenda, inseminador aninhado em fazenda, tratamento. Os efeitos de tratamento foram desdobrados mediante os seguintes contrastes: TG X M20 não centrifugado; TG X M20 centrifugado; M20 centrifugado X M20 centrifugado. Para a proteção da taxa global de erro de tipo 1, o nível de significância adotado ($p=10$) foi dividido por 3.

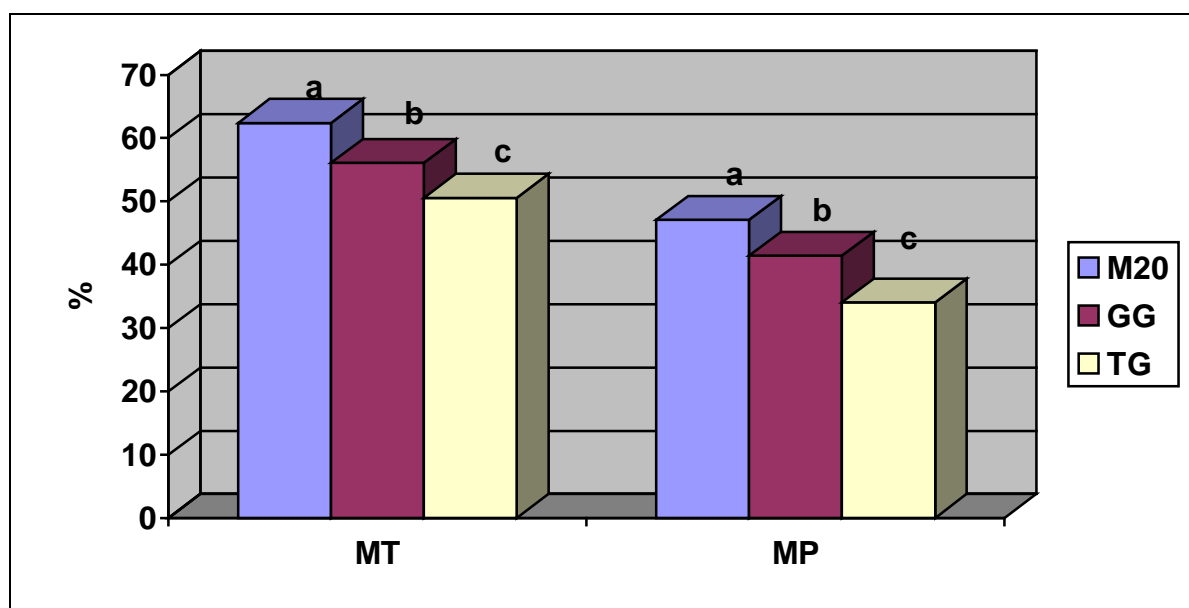
6. Resultados

6. RESULTADOS

6.1. EXPERIMENTO I – Efeitos do meio diluente e da remoção do plasma seminal na congelabilidade do sêmen bovino.

6.1.1. Efeito dos meios diluentes

Na figura 6 podem ser observados os valores médios pós-descongelção da MT e MP, do sêmen criopreservado com os três meios diluentes. Nos resultados de MT as médias de M20 (62,37%^a) foram superiores ($p < 0,01$) as apresentadas pelos outros dois diluidores, GG (56,10%^b) e TG (50,55%^c). Na MP os resultados obtidos diferiram ($p < 0,01$) entre M20, GG e TG, sendo respectivamente 47,10%^a, 41,41%^b e 34,02%^c.



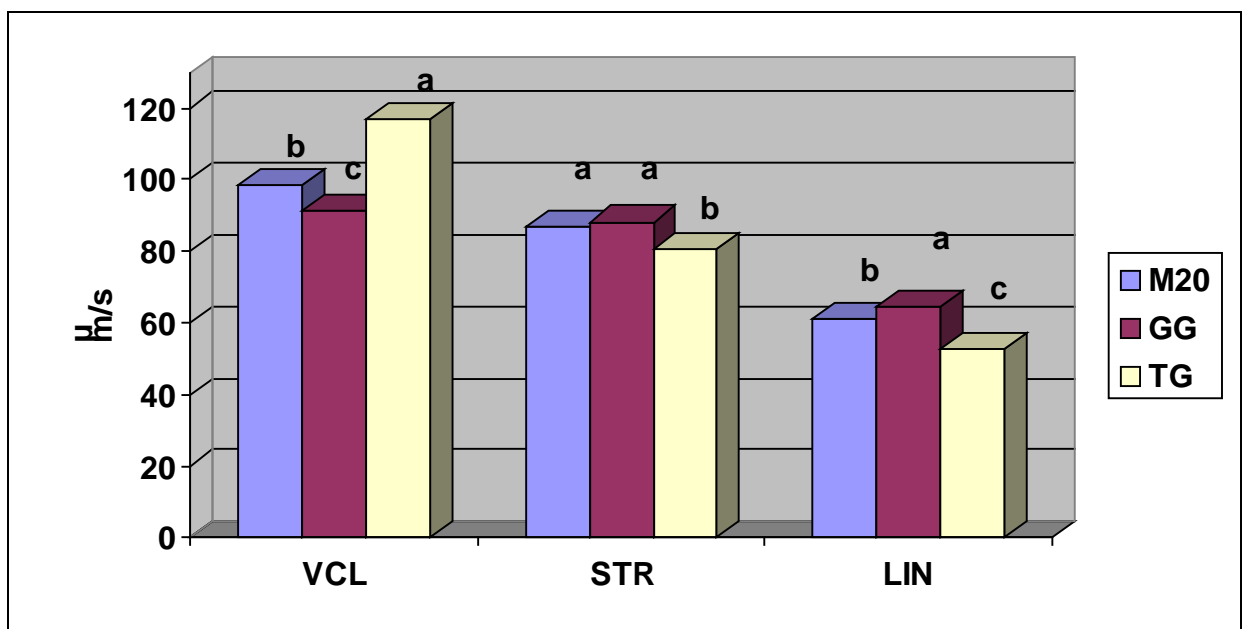
^{a,b,c} Letras distintas indicam diferença estatística ($p < 0,01$)

Figura 6 – Valores Médios das variáveis motilidade espermática total (MT) (%) e motilidade espermática progressiva (MP) (%) pós-descongelção do sêmen congelado com M20, GG e TG.

O diluidor TG apresentou média de VCL ($116,98^a \mu\text{m/s}$) superior ($p < 0,01$) às médias de M20 ($98,46^b \mu\text{m/s}$) e GG ($91,43^c \mu\text{m/s}$), a média de M20 superou significativamente a do GG.

A variável STR apresentou igualdade ($p > 0,01$) entre as médias de M20 ($86,65^a \mu\text{m/s}$) e GG ($88,12^a \mu\text{m/s}$) que foram superiores ($p < 0,01$) a TG ($80,76^b \mu\text{m/s}$).

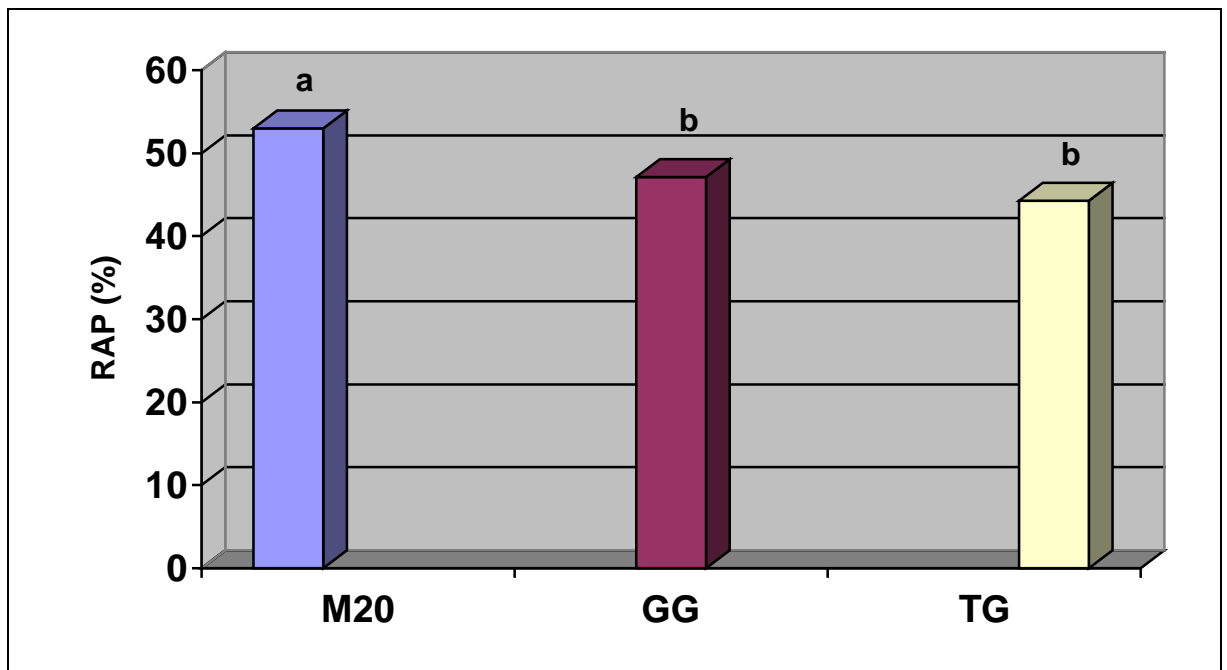
GG foi superior ($p < 0,01$) aos demais diluentes em LIN com média $64,35^a \mu\text{m/s}$, contra $61,10^b \mu\text{m/s}$ de M20, que transcendeu aos $52,81^c \mu\text{m/s}$ apresentados por TG. As velocidades foram medidas por CASA e são mostradas na figura 7.



^{a,b,c} Letras distintas indicam diferença estatística ($p < 0,01$).

Figura 7 – Valores Médios das variáveis velocidade curvilínea espermática (VCL) ($\mu\text{m/s}$), retilinearidade espermática (STR) ($\mu\text{m/s}$), linearidade espermática (LIN)(%) pós-descongelamento, do sêmen congelado com os diluentes M20, GG e TG.

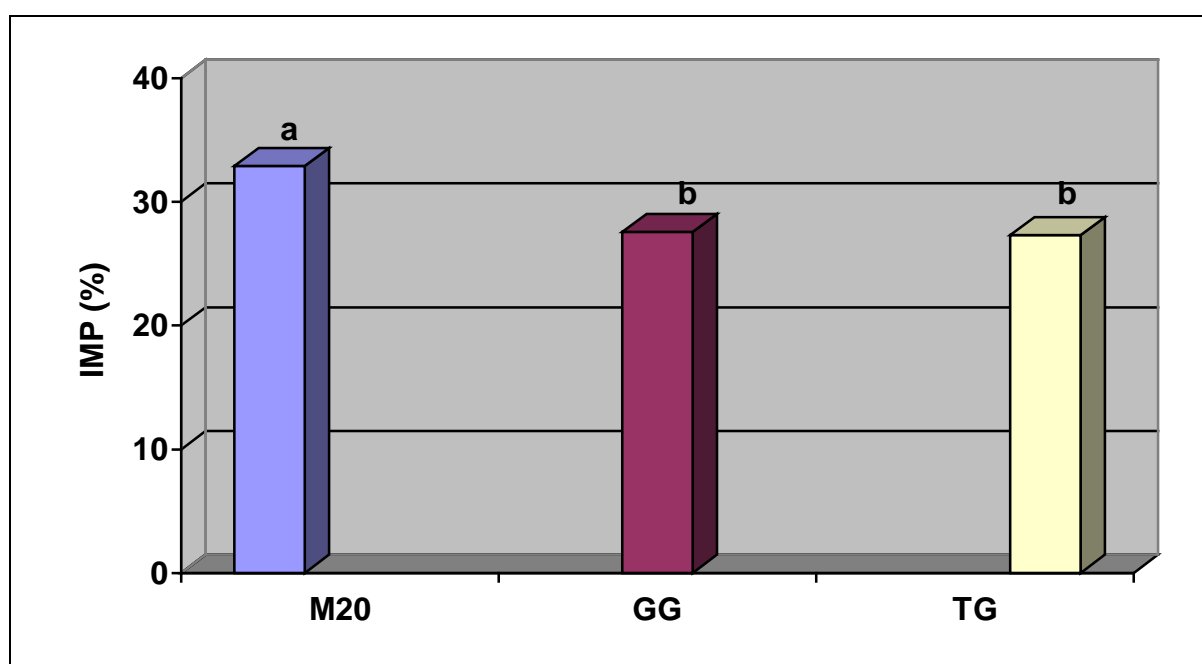
Na percentagem de espermatozóides com movimentos rápidos (Figura 8), novamente obteve-se a superioridade ($p < 0,01$) do diluente M20 sobre os demais. A média apresentada por M20 (52,98^a%) diferiu de GG (47,15^b%) e TG (44,28^b%), que foram iguais entre si ($p > 0,01$).



^{a,b}Letras distintas indicam diferença estatística ($p < 0,01$)

Figura 8 – Valores Médios da percentagem de espermatozóides com movimentos rápidos (RAP) pós-descongelamento, do sêmen congelado com os meios diluentes M20, GG e TG.

Os valores médios de integridade de membrana plasmática das células espermáticas (Figura 9) criopreservadas com M20 (32,88^a%) foram superiores ($p < 0,01$) às médias das amostras de sêmen criopreservadas com GG (27,55^b%) e TG (27,28^b%), que não diferiram ($p > 0,01$) entre si. Os dados mostram que o M20 foi o mais eficiente na preservação das membranas plasmáticas dos espermatozoides.



^{a,b} Letras distintas indicam diferença estatística ($p < 0,01$)

Figura 9 – Valores Médios da porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra pós-descongelamento, do sêmen congelado com meios diluentes M20, GG e TG.

6.1.2 Efeito da remoção do plasma seminal

A remoção do plasma seminal pré-congelação, pela centrifugação, mostrou efeito significativo ($p < 0,01$) na MT em todos os diluentes testados (Tabela 1). As médias de MT para M20 foram de 66,18%, quando o plasma seminal foi removido e de 58,58% sem a remoção do plasma seminal. GG com remoção de plasma teve médias de 59,08%, enquanto a média das amostras sem remoção foram de 53,13%. A média das amostras congeladas com TG sem plasma seminal foi de 54,18% contra 46,16% apresentada pelas amostras com plasma seminal.

Tabela 1: Valores médios de MT dos diluidores, com (CRPS) e sem (SRPS) a remoção do plasma seminal.

Plasma Seminal	Diluidores			Médias de RPS
	TG	GG	M20	
CRPS	54,18	59,08	66,18	59,81 ^A
SRPS	46,16	53,13	58,58	52,62 ^B
Médias de diluidores	50,55 ^C	56,10 ^b	62,37 ^a	

^{A,B} Médias na mesma coluna com letras distintas diferem ($p < 0,01$) pelo teste F.

^{a,b,c} Médias na mesma linha com letras distintas diferem ($p < 0,01$) pelo teste de Tukey.

A variável MP apresentou médias superiores ($p < 0,01$) quando houve a remoção do plasma seminal nas amostras congeladas com os três meios diluentes (Tabela 2). As médias das amostras criopreservadas sem plasma seminal, com os diluentes M20, GG e TG foram 50,98%; 44,00% e 38,83%, respectivamente. Já as amostras em que o sêmen foi congelado em sua forma total (sem remoção do plasma seminal) as médias foram 43,23%; 36,10% e 31,95%, para os mesmos diluentes.

Tabela 2: Valores médios de MP dos diluidores, com (CRPS) e sem (SRPS) a remoção do plasma seminal.

Plasma Seminal	Diluidores			Médias de RPS
	TG	GG	M20	
CRPS	38,38	44,00	50,98	44,45 ^A
SRPS	31,95	36,10	43,23	37,09 ^B
Médias de diluidores	34,02 ^C	41,41 ^b	47,10 ^a	

^{A,B} Médias na mesma coluna com letras distintas diferem ($p < 0,01$) pelo teste F.

^{a,b,c} Médias na mesma linha com letras distintas diferem ($p < 0,01$) pelo teste de Tukey.

Ocorreu o efeito da remoção ($p < 0,01$) do plasma seminal para os diluentes TG e M20 na variável VCL (Tabela 3). Os valores das médias de VCL do TG foram 110,00 $\mu\text{m/s}$ sem a remoção do plasma seminal e 123,98 $\mu\text{m/s}$ com o plasma removido, para M20 os valores foram de 94,53 $\mu\text{m/s}$ no sêmen não centrifugado e 102,40 $\mu\text{m/s}$ para o sêmen centrifugado e o GG obteve médias iguais ($p > 0,01$) nas amostras sem centrifugação (92,75 $\mu\text{m/s}$) e nas amostras centrifugadas (90,13 $\mu\text{m/s}$).

Tabela 3: Valores médios de VCL dos diluidores, com (CRPS) e sem (SRPS) a remoção do plasma seminal.

Plasma Seminal	Diluidores			Médias de RPS
	TG	GG	M20	
CRPS	123,98 ^A	92,75 ^A	102,40 ^A	106,37
SRPS	110,00 ^B	90,13 ^A	94,53 ^B	98,22
Médias de diluidores	116,98 ^a	91,43 ^c	98,46 ^b	

^{A,B} Médias na mesma coluna com letras distintas diferem ($p < 0,01$) pelo teste F.

^{a,b,c} Médias na mesma linha com letras distintas diferem ($p < 0,01$) pelo teste de Tukey.

Na variável STR (Tabela 4) somente houve efeito da centrifugação ($p < 0,01$) nas amostras congeladas com TG, detectado por contrastes ortogonais. Nesta variável as médias de TG do sêmen não centrifugado (82,73

$\mu\text{m/s}$) foram superiores ao sêmen centrifugado ($78,80 \mu\text{m/s}$). As médias não diferiram ($p>0,01$) em M20, sendo $86,13 \mu\text{m/s}$ no sêmen que teve o plasma seminal removido e $87,18 \mu\text{m/s}$ na outra amostra; e os resultados foram iguais ($p<0,01$) na congelação com GG, com sêmen não centrifugado, a média foi de $88,00 \mu\text{m/s}$ e $88,25 \mu\text{m/s}$ no sêmen centrifugado.

Tabela 4: Valores médios de STR dos diluidores, com (CRPS) e sem (SRPS) a remoção do plasma seminal.

Plasma Seminal	Diluidores			Médias de RPS
	TG	GG	M20	
CRPS	$78,80^{\text{B}}$	$88,25^{\text{A}}$	$86,13^{\text{A}}$	84,39
SRPS	$82,73^{\text{A}}$	$88,00^{\text{A}}$	$87,18^{\text{A}}$	85,97
Médias de diluidores	$80,76^{\text{b}}$	$88,12^{\text{a}}$	$86,65^{\text{a}}$	

^{A,B} Médias na mesma coluna com letras distintas diferem ($p<0,01$) pelo teste F.

^{a,b} Médias na mesma linha com letras distintas diferem ($p<0,01$) pelo teste de Tukey.

Na variável LIN não houve efeito ($p>0,01$) da remoção do plasma seminal para TG sendo a média das amostras não centrifugadas ($54,85 \mu\text{m/s}$) superior à média das centrifugadas ($50,78 \mu\text{m/s}$). A média com sêmen congelado com M20, que sofreu a remoção do plasma seminal ($60,70 \mu\text{m/s}$) foi igual ($p>0,01$) a média das amostras que não tiveram o plasma seminal removido ($61,43 \mu\text{m/s}$). As amostras congeladas com GG também foram semelhantes estatisticamente ($p>0,01$), a média das amostras centrifugadas foi de $65,13 \mu\text{m/s}$ e as não centrifugadas $63,58 \mu\text{m/s}$ (Tabela 5).

Tabela 5: Valores médios de LIN dos diluidores, com (CRPS) e sem (SRPS) a remoção do plasma seminal.

Plasma Seminal	Diluidores			Médias de RPS
	TG	GG	M20	
CRPS	58,78 ^B	65,13 ^A	60,70 ^A	58,87
SRPS	54,85 ^A	63,58 ^A	61,43 ^A	59,95
Médias de diluidores	52,81 ^C	64,35 ^a	61,10 ^b	

^{A,B} Médias na mesma coluna com letras distintas diferem ($p < 0,01$) pelo teste F.

^{a,b,c} Médias na mesma linha com letras distintas diferem ($p < 0,01$) pelo teste de Tukey.

A remoção do plasma seminal aumentou ($p < 0,01$) a percentagem de RAP nos três meios diluentes (Tabela 6). Os diluidores M20, GG e TG apresentaram medias de 48,38%; 44,10% e 40,12%, respectivamente, quando o sêmen não foi centrifugado antes da congelação. Com a remoção do plasma seminal os valores das médias foram 57,60% para M20; 50,20% para GG e 48,45% para TG.

Tabela 6: Valores médios de RAP dos diluidores, com (CRPS) e sem (SRPS) a remoção do plasma seminal.

Plasma Seminal	Diluidores			Médias de RPS
	TG	GG	M20	
CRPS	48,45	50,20	57,60	52,08 ^A
SRPS	40,12	44,10	48,38	44,20 ^B
Médias de diluidores	44,28 ^C	47,15 ^b	52,98 ^a	

^{A,B} Médias na mesma coluna com letras distintas diferem ($p < 0,01$) pelo teste F.

^{a,b,c} Médias na mesma linha com letras distintas diferem ($p < 0,01$) pelo teste de Tukey.

Nos resultados obtidos observa-se que a remoção do plasma seminal (Tabela 7) aumentou a preservação da integridade da membrana plasmática durante o processo de criopreservação, elevando ($p < 0,01$) as percentagens de espermatozóides que mantiveram a membrana íntegra. A média apresentada pelo sêmen sem plasma congelado com M20 (35,65%) foi superior à média do

sêmen com plasma (30,13%), assim como em GG centrifugado (28,73%) superou o não centrifugado (26,38%) e a média de TG sem plasma seminal (28,68%) sobrepujou a que o manteve (25,90%).

Tabela 7: Valores médios de IMP dos diluidores, com (CRPS) e sem (SRPS) a remoção do plasma seminal.

Plasma Seminal	Diluidores			Médias de RPS
	TG	GG	M20	
CRPS	28,68	28,73	35,65	31,02 ^A
SRPS	25,90	26,38	30,13	27,47 ^B
Médias de diluidores	27,28 ^b	27,55 ^b	32,88 ^a	

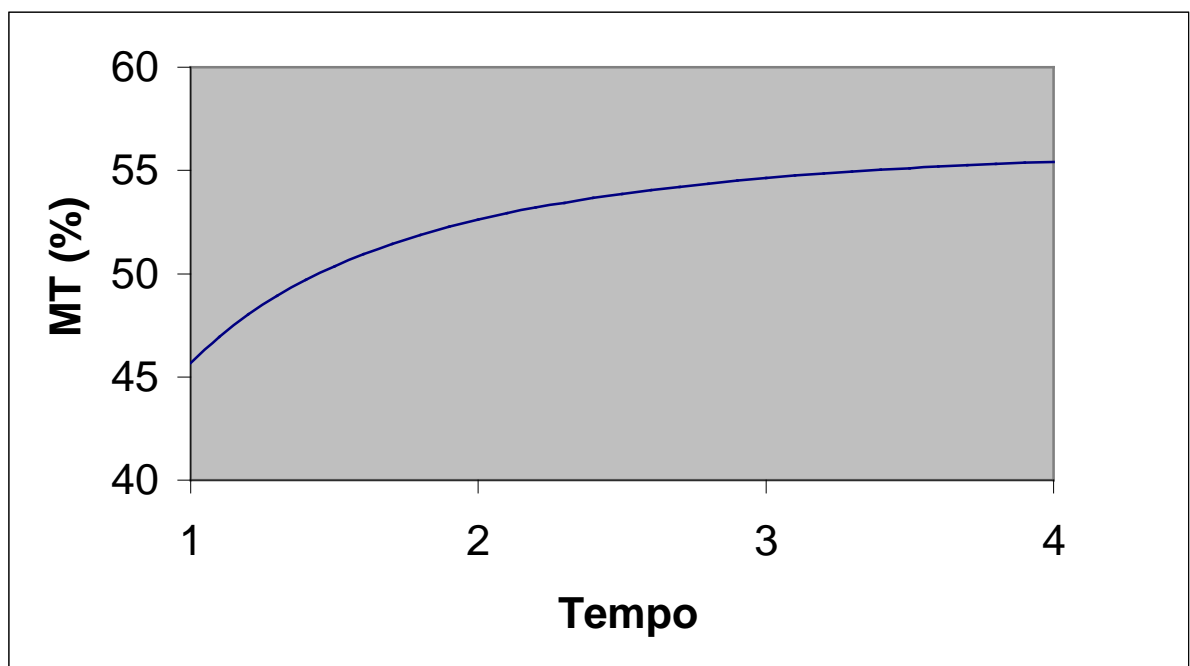
^{A,B} Médias na mesma coluna com letras distintas diferem ($p < 0,01$) pelo teste F.

^{a,b} Médias na mesma linha com letras distintas diferem ($p < 0,01$) pelo teste de Tukey.

6.2. EXPERIMENTO II - Influência dos diferentes tempos de estabilização sobre as variáveis espermáticas pós-descongelamento.

Não houve interação entre diluente e tempo ou metodologia e tempo em nenhuma das variáveis dependentes, exceto para RAP, em que houve interação entre diluente e tempo. Não havendo interação entre as variáveis independentes é possível analisar isoladamente o efeito do tempo de estabilização sobre as variáveis espermáticas. As médias do tempo de estabilização das amostras congeladas neste experimento foram diferentes ($p < 0,01$) entre si, nas variáveis dependentes MT, MP, RAP e IMP.

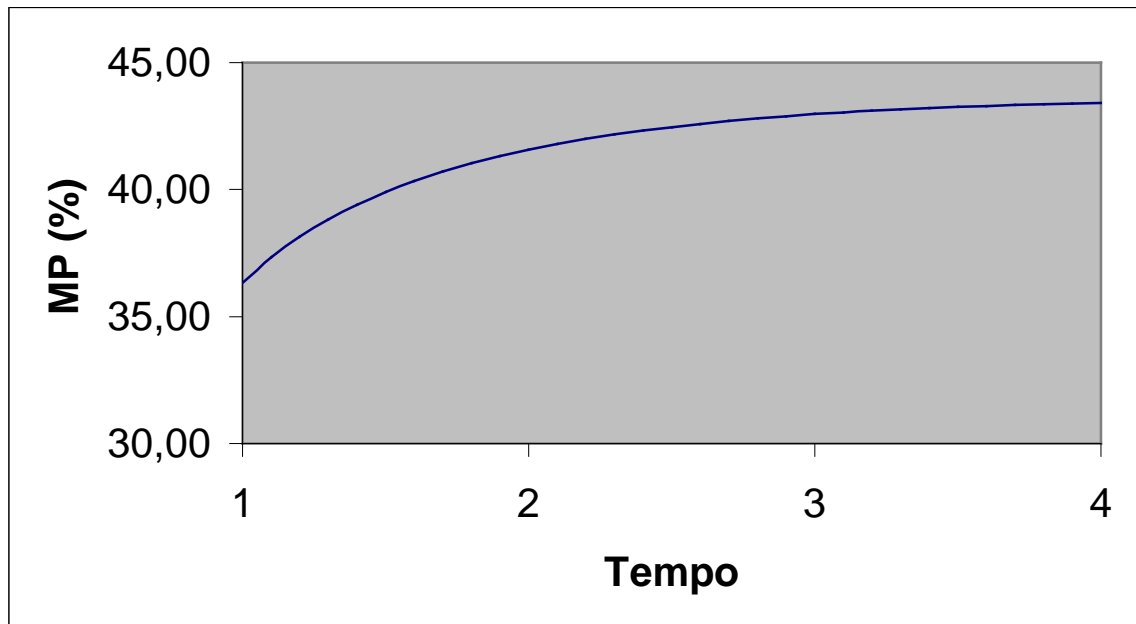
As médias de MT (Figura 10) variaram conforme o tempo de estabilização decorrido. Os valores médios do sêmen congelado com 60, 120, 180 e 240 minutos de estabilização foram 45,66%; 52,59%; 54,65% e 55,40%, respectivamente.



$$\hat{y} = b_0 + b_1 * x + b_2(1/x)$$

Figura 10 – Valores Médios de motilidade total (%) pós descongelamento de sêmen congelado após tempo de estabilização 1 (60 min.), 2 (120 min.), 3 (180 min.) e 4 (240 min.).

Os valores das médias de MP também variaram ($p < 0,01$) de acordo com o tempo de estabilização das amostras (Figura 11). Com 60 minutos de estabilização o sêmen congelado apresentou médias de 36,32% contra 41,61% com 120 minutos; 42,92% com 180 minutos e 43,43% com 240 minutos.



$$\hat{y} = b_0 + b_1 * x + b_2(1/x)$$

Figura 11 - Valores Médios de motilidade progressiva (%) pós descongelamento de sêmen congelado após tempo de estabilização 1 (60 min.), 2 (120 min.), 3 (180 min.) e 4 (240 min.).

O tempo de estabilização não influenciou os valores médios de VCL apresentados (Figura 12). As médias das amostras estabilizadas por 60 minutos (105,38 $\mu\text{m/s}$) foram semelhantes ($p>0,01$) às médias com 120 minutos (103,33 $\mu\text{m/s}$), 180 minutos (106,28 $\mu\text{m/s}$) e 240 minutos (104,51 $\mu\text{m/s}$).

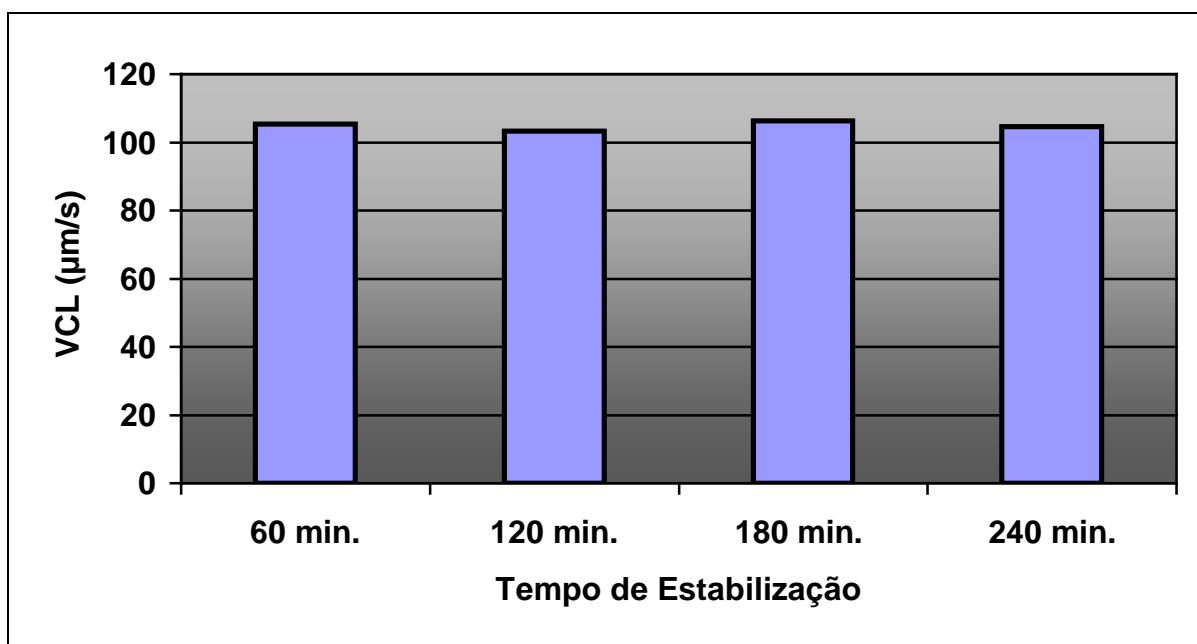


Figura 12 – Valores médios de velocidade curvilínea dos espermatozoides (VCL) ($\mu\text{m/s}$) pós descongelação de sêmen congelado após tempo de estabilização de 60, 120, 180 e 240 minutos.

Os índices de STR não sofreram alterações ($p>0,01$) pelo tempo de estabilização das amostras (Figura 13). Os valores médios desta variável com sêmen congelado aos 60 minutos de estabilização foram de 87,54 $\mu\text{m/s}$; aos 120 minutos 86,67 $\mu\text{m/s}$; aos 180 minutos 87,33 $\mu\text{m/s}$ e aos 240 minutos 86,81 $\mu\text{m/s}$.

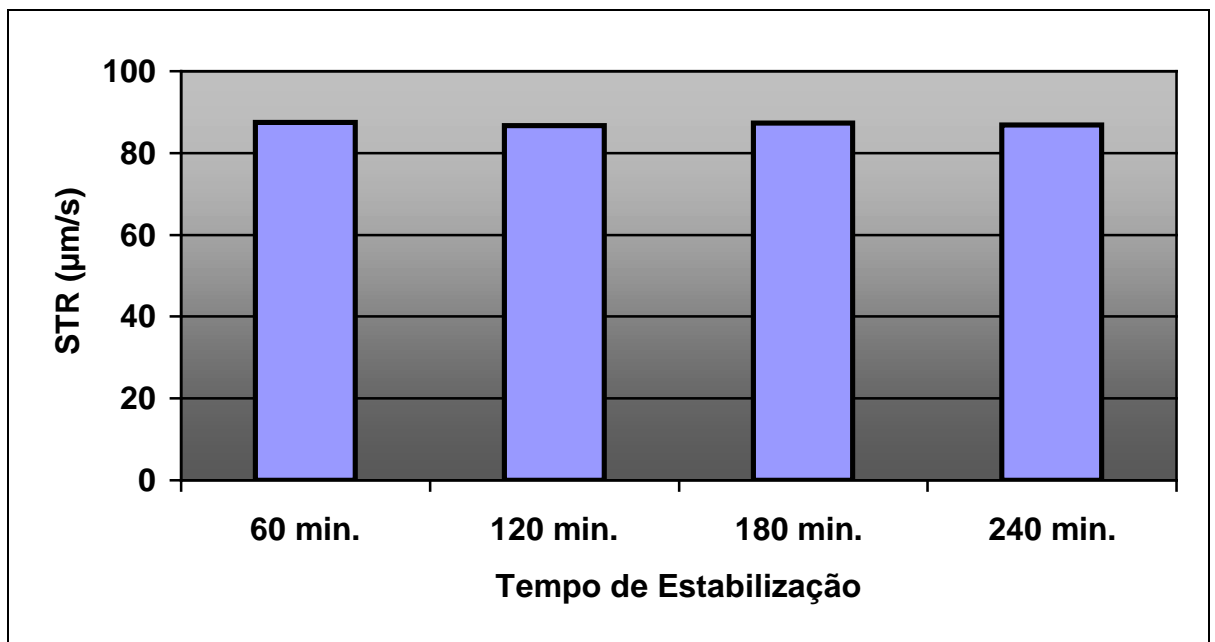


Figura 13 - Valores médios de retilinearidade dos movimentos espermáticos (STR) ($\mu\text{m/s}$) pós descongelação de sêmen congelado após tempo de estabilização de 60, 120, 180 e 240 minutos.

O tempo de estabilização não influenciou ($p>0,01$) os valores médios de LIN (Figura 14). Quando a congelação foi realizada com 60 minutos de estabilização a média foi de $61,23 \mu\text{m/s}$; com 120 minutos $61,76 \mu\text{m/s}$; $61,33 \mu\text{m/s}$ com 180 minutos e $61,21 \mu\text{m/s}$ com 240 minutos.

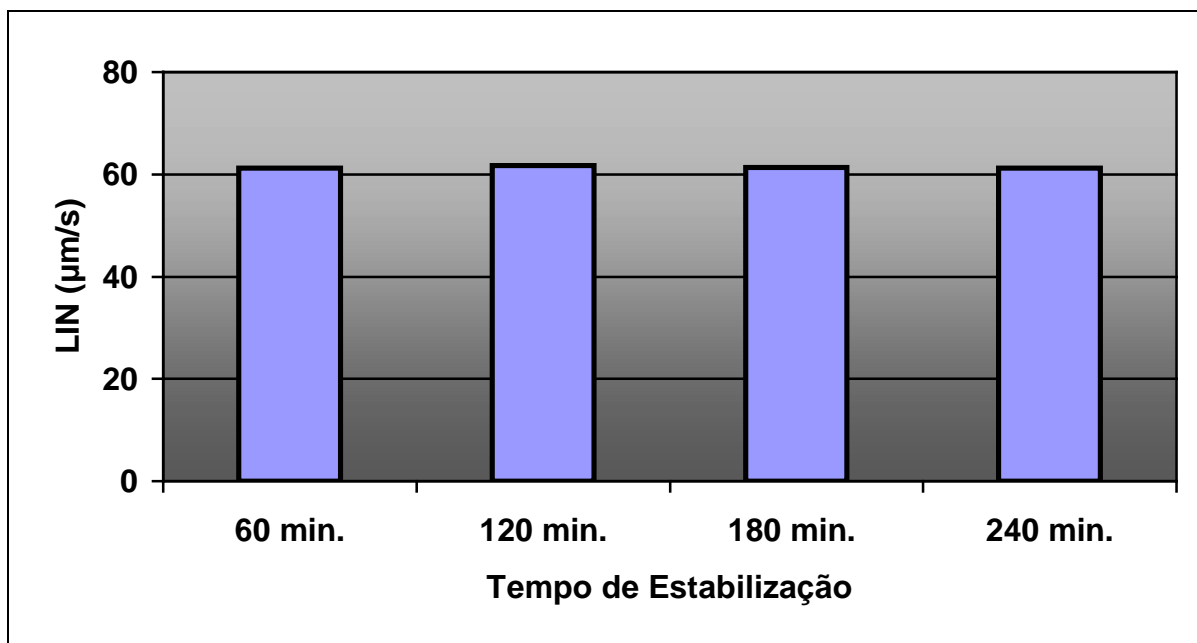
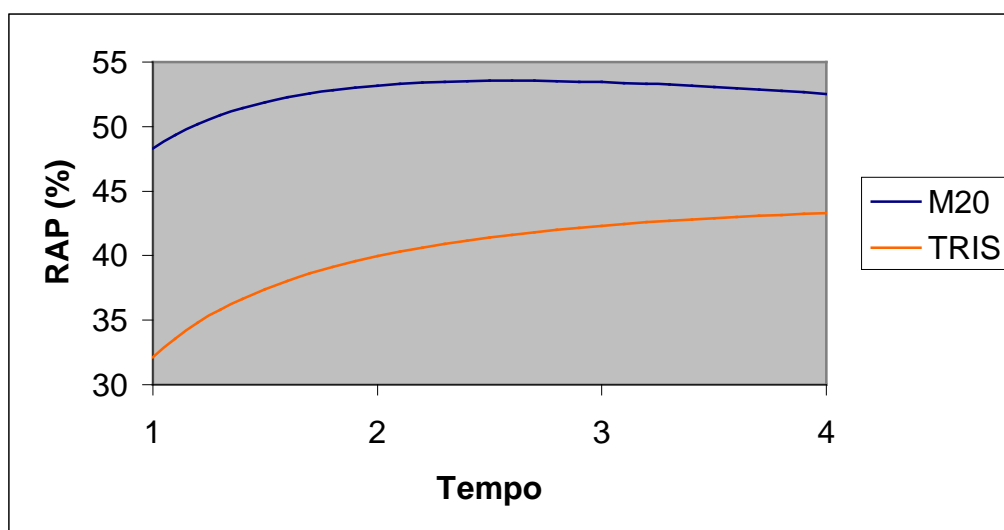


Figura 14 - Valores médios de linearidade dos espermatozoides (LIN) ($\mu\text{m/s}$) pós descongelação de sêmen congelado após tempo de estabilização de 60, 120, 180 e 240 minutos.

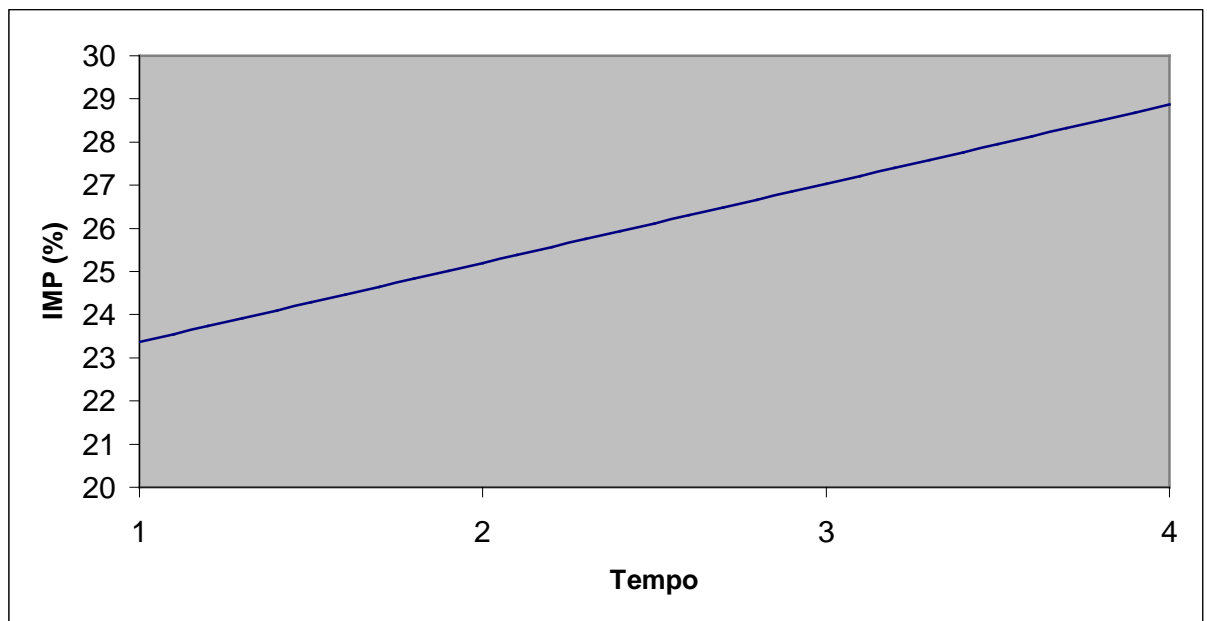
A variável dependente RAP apresentou as médias (Figura 15) diferentes ($p < 0,01$) das amostras de sêmen congelado de acordo com o tempo de estabilização. Os índices de RAP foram de 40,23% com estabilização em 60 minutos; 46,50% em 120 minutos; 47,97% em 180 minutos e 47,88% em 240 minutos. Nesta variável também observou-se interação entre diluente e tempo, sendo que as medias de M20 foram de 48,5%; 52,7%; 54,0% e 52,4%, superando ($P < 0,01$) os resultados de TRIS que foram 32,3%; 39,4%; 43,0%; 43,1%, respectivamente.



$$\hat{y} = b_0 + b_1 * x + b_2(1/x)$$

Figura 15 - Valores Médios de espermatozóides com movimentos rápidos (RAP) (%) pós descongelação de sêmen congelado após tempo de estabilização 1 (60 min.), 2 (120 min.), 3 (180 min.) e 4 (240 min.).

A percentagem de espermatozóides que mantiveram a membrana plasmática íntegra aumentou ($p < 0,01$) gradativamente, conforme o tempo de estabilização empregado (Figura 16). O sêmen criopreservado com 60 minutos de estabilização alcançou a média de 23,32% de espermatozóides com membrana plasmática íntegra. As médias subiram para 25,04% com 120 minutos de estabilização; 27,46% com 180 minutos e 28,70% com 240 minutos.



$$\hat{y} = b_0 + b_1 * x + b_2 * x^2$$

Figura 16 - Valores Médios de Integridade de membrana plasmática (IMP) (%) pós descongelação de sêmen congelado após tempo de estabilização 1 (60 min.), 2 (120 min.), 3 (180 min.) e 4 (240 min.).

Nas médias dos diluentes e da remoção do plasma seminal, obtidas neste experimento, observou-se superioridade do diluente M20 (tabela 8) e a melhora ocasionada no sêmen em virtude da remoção do plasma seminal (tabela 9) nas análises laboratoriais do sêmen congelado. De acordo com a análise de máxima verossimilhança realizada, ocorreu diferença entre os diluentes em todas as variáveis e na remoção do plasma seminal pela centrifugação para MT, MP, VCL, RAP e IMP.

Tabela 8: Valores médios dos meios diluentes nas percentagens de motilidade espermática total (MT) e motilidade progressiva (MP); velocidade curvilínea espermática (VCL) e retilinearidade espermática (STR), em $\mu\text{m/s}$; e percentagens de linearidade espermática (LIN), percentagem de espermatozóides com movimentos rápidos (RAP) e integridade de membrana plasmática (IMP).

Diluentes	MT	MP	VCL	STR	LIN	RAP	IMP
M20	59,04 ^a	47,56 ^a	98,39 ^b	88,90 ^a	64,52 ^a	51,86 ^a	29,23 ^a
TG	45,11 ^b	34,57 ^b	111,35 ^a	85,28 ^b	58,19 ^b	39,42 ^b	23,02 ^b

^{a,b}letras distintas nas colunas mostram diferenças ($p < 0,01$) entre os diluentes.

Tabela 9: Valores médios das metodologias, remoção do plasma seminal (C) e sem remoção do plasma seminal (NC), nas percentagens de motilidade espermática total (MT) e motilidade progressiva (MP); velocidade curvilínea espermática (VCL) e retilinearidade espermática (STR), em $\mu\text{m/s}$; e percentagens de linearidade espermática (LIN), percentagem de espermatozóides com movimentos rápidos (RAP) e integridade de membrana plasmática (IMP).

Metodologia	MT	MP	VCL	STR	LIN	RAP	IMP
C	54,35 ^a	43,43 ^a	108,53 ^a	86,55	61,29	48,44 ^a	27,09 ^a
NC	49,80 ^b	38,70 ^b	101,22 ^b	87,62	61,22	42,80 ^b	25,17 ^b

^{a,b}letras distintas nas colunas mostram diferenças ($p < 0,01$) entre as metodologias.

6.3. EXPERIMENTO III: Efeito de dois meios diluentes e da centrifugação sobre a fertilidade de vacas inseminadas em tempo fixo.

Das 139 vacas inseminadas com sêmen congelado com TG (grupo A), 68 tiveram prenhez confirmadas 30 dias após a inseminação por exame ultrassonográfico; o grupo B apresentou 72 gestações positivas nas 139 fêmeas inseminadas e 80 vacas gestantes foram obtidas pela inseminação de 140 vacas com sêmen centrifugado congelado com M20 (grupo C). Os resultados do teste de fertilidade (Figura 17) mostraram que para o número de vacas inseminadas neste experimento não houve diferença ($p < 0,05$) entre os meios diluentes e os métodos utilizados.

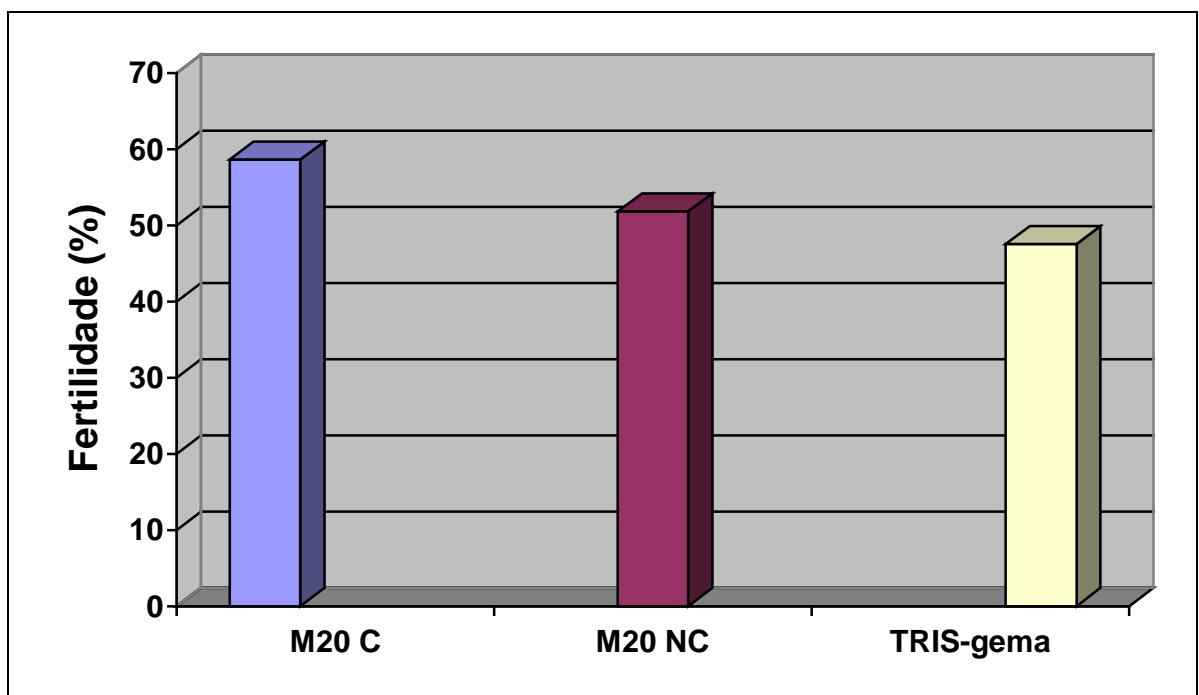


Figura 17 - Percentual de prenhez obtidas em inseminações artificiais com sêmen congelado por M20 com (C) e sem a remoção do plasma seminal (NC) e com TG.

A análise de regressão logística está exibida na tabela 10, onde não se observa interação para nenhum dos efeitos. Para o efeito dos tratamentos foi realizado desdobramento em contraste (Tabela 11) que indicam uma tendência

estatística de superioridade ($0,10 > p > 0,05$) nas comparações do diluente M20 centrifugado contra TG e M20 centrifugado contra M20 não centrifugado.

Tabela 10: Análise de regressão logística para os valores de fertilidade.

Efeito	GL	Valor de X^2	P
Fazenda	1	3,4035	0,0651
Inseminador (Fazenda)	3	7,4288	0,0594
Tratamento	2	4,0755	0,1303

Tabela 11: Valores de p nos desdobramentos em contrastes ortogonais na comparação entre os tratamentos

Contrastes	GL	Valor de X^2	p
TRIS X M20 NC	1	0,6727	0,4121
TRIS X M20 C	1	0,0402	0,0444
M20 NC X M20 C	1	3,3713	0,0663

7. Discussão

7. DISCUSSÃO

Desde a descoberta das qualidades crioprotetoras do glicerol, por Polge et al. (1949), e o desenvolvimento da primeira técnica de criopreservação de sêmen bovino, muitos estudos foram conduzidos neste campo. O sucesso da congelação de sêmen bovino permitiu a expansão da utilização da IA, pela comercialização de doses de sêmen congelado (Foote et al., 2002). Embora a criopreservação seja amplamente realizada, o processo ainda promove efeitos deletérios às células espermáticas. Com o intuito de minimizar tais efeitos deletérios aos espermatozóides, buscam-se alterações na metodologia de criopreservação das células, capazes de ampliar a viabilidade dos espermatozóides após a descongelação.

7.1. EXPERIMENTO I: Efeitos do meio diluente e da remoção do plasma seminal na congelabilidade do sêmen bovino.

7.1.1. Efeito dos meios diluentes

Para atingir uma criopreservação eficiente das células espermáticas é necessário que seja preservada a capacidade de fertilização dos espermatozóides (Yoshida, 2000). Os eventos físico-químicos da congelação, que ocorrem durante a manipulação, criopreservação e estocagem são irreversíveis; alteram as estruturas da membrana espermática, aumentam a sensibilidade ao dano resultante da peroxidação lipídica, levando à desordem, fluidez, instabilidade da membrana, comprometimento nuclear, perda de componentes intracelulares e queda de motilidade espermática. Seus efeitos sobre as células podem ser deletérios se ainda, cuidados como composição do meio, osmolaridade, protetores de membrana, crioprotetores e técnica de congelação, não forem utilizados corretamente (Parks & Graham, 1992; Lenzi et al., 1996).

Segundo Royere et al. (1996) o sêmen congelado deve passar por uma avaliação criteriosa quanto a motilidade e seus outros tipos de movimentos e velocidades, e aos danos causados as membranas plasmáticas e ao

acrossomo. Para que a congelação de um ejaculado seja realizada com sucesso é necessária a adição de um diluidor que ajude a estabilizar o metabolismo celular e que ainda preserve a célula de sofrer, precocemente, a capacitação ou uma forma desorganizada da reação do acrossomo. O meio diluidor deve também permitir um ambiente favorável para a conservação da integridade e função de todos os compartimentos espermáticos e ainda, IMP dos espermatozóides (Watson, 1995; Watson, 2000).

Neste trabalho observou-se que o meio diluente M20 obteve desempenho superior ($p < 0,01$) aos demais diluidores confrontados nas variáveis MT, MP, RAP e IMP. Nestas mesmas variáveis as médias de GG superaram ($p < 0,01$) as de TG, exceto em IMP onde os resultados dos dois diluentes não diferiram ($p > 0,01$). Na variável STR os valores obtidos por M20 e GG foram iguais ($p > 0,01$) entre si, e maiores ($p < 0,01$) ao de TG. O índice de GG para a LIN foi mais elevado ($p < 0,01$) que os demais, e M20 estabeleceu-se entre os dois diluentes tendo sido maior ($p < 0,01$) que TG. VCL foi a única variável em que o TG superou ($p < 0,01$) aos outros dois diluentes e M20 foi melhor ($p < 0,01$) que GG. Observando esses resultados nota-se que M20 superou os demais nas variáveis relativas à mobilidade dos espermatozóides, enquanto nas velocidades, nem sempre seu desempenho foi superior, igualando-se ao GG em STR, sendo superado por ele em LIN e por TG em VCL. Os resultados obtidos podem ser justificados pela diferença da densidade existente entre os diluidores. Segundo Mortimer (1997) a densidade do meio pode interferir na velocidade espermática, diminuindo a amplitude flagelar. Hirai et al. (1997) descreveram aumento ($p < 0,01$) das velocidades em diluentes mais densos e afirmaram que a velocidade dos espermatozóides é inversamente proporcional à viscosidade do meio. Celeguini (2005) também obteve superioridade das variáveis de velocidade MT e MP utilizando o Botu-Bov[®], a base de gema de ovo (mais denso). Neste mesmo estudo, as variáveis relacionadas à velocidade dos espermatozóides foi superior quando foi utilizado o Bioxcell[®], à base de lecitina de soja (menos denso).

Os efeitos deletérios da refrigeração da célula podem se apresentar de maneira diferente entre as diferentes espécies animais, entre indivíduos e

ainda entre compartimentos de um espermatozóide (Garner et al., 1999; Holt, 2000). O M20 é um diluidor rico em aminoácidos e tampões (Anexo II), que funcionam como crioprotetores e antioxidantes e, provavelmente, são estes componentes que conferem a ele maior poder de proteção quanto aos efeitos adversos das alterações de temperatura existentes no processo de congelação.

O EDTA, que neste estudo está presente somente na composição do M20, é um quelante de cálcio, sendo assim, a concentração do cálcio em presença desta substância no meio é diminuída (Graham, 1996). A entrada de cálcio no espermatozóide leva-os à capacitação, por conseguinte, induz movimentos oscilatórios, assim como desencadeia uma série de alterações que culminarão na reação do acrossomo (Cross, 1998). O meio M20 exerceu uma maior proteção às células espermáticas, provavelmente por diminuir os riscos de injúrias que ocorrem no início do processo de capacitação.

Quanto à preservação da integridade da membrana plasmática (IMP), M20 também superou ($p < 0,01$) aos outros dois diluidores, que se assemelharam ($p > 0,01$) nos resultados. Portanto, o diluente proposto para teste (M20) promoveu uma melhor proteção aos efeitos deletérios decorrentes do processo de resfriamento e congelação. Essa maior conservação dos espermatozóides pode ser creditada aos componentes do diluidor, aos crioprotetores e seus percentuais presentes na composição. Os aminoácidos presentes neste diluidor podem ter se integrado positivamente na manutenção das membranas espermáticas e ainda, a presença do EDTA pode ter protegido a célula espermática de alterações de permeabilidade que podem levar à lesão da membrana plasmática.

A percentagem de gema de ovo no diluente colaborou para a melhor conservação da membrana plasmática dos espermatozóides, evitando o dobramento de caudas e conservando a motilidade dos espermatozóides (Holt & North, 1988). O componente ativo da gema é a fração lipoprotéica de baixa densidade (LDL), um componente de alto peso molecular, que age apenas na superfície celular (Watson, 1995).

A adição de glicina e Ovus es Paste (OEP) à formulação é outro fator importante no sucesso do M20. Segundo Bicudo et al. (1993), estes componentes promoveram melhor condicionamento aos espermatozóides quanto ao vigor e preservação acrossômica, se comparados a diluentes livres destas substâncias, como o TG. A associação de uma maior proporção de um detergente, melhorando a ação protetora da gema de ovo foi sugerida por Pursel et al. (1978). Watson (1995) concluiu que a proteção ocasionada pelos lipídios da gema aumenta com a maior emulsificação destas partículas. A maior proporção relativa destes componentes na formulação do M20 auxiliaram na obtenção da superioridade em relação ao GG que possui tanto a glicina quanto o OEP em sua composição, porém em proporções inferiores.

Bicudo et al. (1993) pesquisaram a eficiência do meio diluidor GG em comparação ao meio TG, e obtiveram resultados superiores em motilidade, vigor e retenção de acrossomo com o diluidor GG, corroborando com os dados deste experimento, em que o diluente GG obteve melhores resultados que o TG, na maioria das variáveis espermáticas avaliadas.

7.1.2 Efeito da remoção do plasma seminal

O plasma seminal, uma secreção fisiológica de múltiplas glândulas do trato reprodutivo masculino, é um meio natural para a maturação final dos espermatozóides por ações hormonais, enzimáticas e modificações estruturais nas células (Mann, 1981). O plasma seminal é comumente relatado como um importante agente mantenedor da motilidade dos espermatozóides dos bovinos (Baas, et al, 1983) e dos ovinos (Graham, 1994), ampliando a viabilidade espermática dos carneiros (Ashworth et al., 1994) e incrementando a resistência dos espermatozóides de suínos aos efeitos deletérios do choque frio (Pursel et al., 1973). Em contra partida, alguns autores afirmam existir fatores prejudiciais à fertilidade e à congelabilidade no plasma seminal em diferentes espécies (Baas et al., 1983; Shivaji & Bhargava, 1987; Killian et al., 1993; Martinus et al., 1991; Bellin et al., 1998).

Vários autores têm descrito metodologias de criopreservação de sêmen em diferentes espécies, utilizando a centrifugação como forma de eliminar o plasma seminal e minimizar seus efeitos deletérios (Papa et al., 1981; Jasko, 1994; López e Encalada, 1997; Lopes e Papa, 1998; Cunha 2002; Oba et al., 2004). A metodologia de remoção do plasma seminal, testada neste experimento, também mostrou ser melhor para o processo de congelação do sêmen bovino. Nas variáveis espermáticas MT, MP e RAP, as médias das amostras que tiveram o plasma seminal removido foram superiores ($p < 0,01$). Os resultados obtidos ratificam os encontrados por Lopez e Encalada (1997), que incrementaram ($p < 0,01$) em 40% o número de palhetas aprovadas, com mais de 25% de motilidade, quando o plasma foi removido por centrifugação de sêmen bovino.

As análises destas variáveis não mostraram interação entre diluente e metodologia, portanto, a metodologia mostrou-se eficiente, independentemente do diluidor utilizado. Os resultados de motilidade espermática obtidos reiteram os relatos de Bidot (1990) e Gadella et al. (1991), em que afirmam que o plasma seminal tem efeito inibitório na motilidade dos espermatozóides.

Nas variáveis de velocidade espermática ocorreu interação entre diluidor e metodologia. Portanto, em VCL ocorreu efeito nos diluentes TG e M20, apresentando melhora ($p < 0,01$) nos índices com a remoção do plasma seminal. A média obtida pelo diluidor GG não diferiu entre as metodologias ($p > 0,01$). Nas variáveis STR e LIN apenas houve efeito da centrifugação na criopreservação com o diluidor TG. Porém neste caso os valores obtidos das amostras congeladas sem o plasma seminal foram inferiores ($p < 0,01$) as criopreservadas convencionalmente, provavelmente, pelo aumento da concentração dos produtos utilizados no meio que possam beneficiar estas variáveis. Quando o sêmen foi congelado com os diluentes GG ou M20 os valores médios obtidos foram iguais ($p > 0,01$). No caso destas variáveis, a comparação com outras literaturas torna-se difícil, pois não há relatos concisos de investigação, embora sejam de grande importância na caracterização do movimento espermático, integridade de membrana e a predição da fertilidade.

Constatou-se também os benefícios da remoção do plasma seminal na análise da integridade da membrana plasmática. Nesta variável, as médias obtidas das amostras congeladas sem o plasma seminal foram superiores ($p < 0,01$) às criopreservadas de modo convencional, em todos os diluidores testados, corroborando os resultados obtidos em sêmen de carneiros por Gil et al. (2000) que trabalharam com centrifuga refrigerada e Oba et al. (2004).

O plasma seminal influenciou negativamente a criopreservação do sêmen bovino, constatado pelos melhores índices pós-descongelção das amostras centrifugadas. A interferência contraproducente do plasma seminal na conservação dos espermatozoides, também foi constatada na espécie eqüina por Macedo (2005), que trabalhou com sêmen refrigerado de eqüino, e observou uma interação negativa do diluente ITA-7 com plasma seminal. As amostras centrifugadas obtiveram valores de integridade de membrana plasmática superiores às não centrifugadas (com plasma seminal). Esses resultados estão de acordo com Carvalho (2003), que observou valores de integridade de membrana plasmática das amostras do diluente ITA-7 centrifugadas, superiores ($p < 0,05$) às não centrifugadas, a partir de 48 horas. Jasko et al. (1991) afirmaram que o plasma seminal não é um meio ideal para armazenar espermatozoide eqüino. Diversos trabalhos nessa espécie indicam que altas concentrações de plasma seminal podem ter efeitos deletérios sobre a motilidade espermática após armazenamento por períodos prolongados (Kenney et al., 1975; Jasko et al., 1991; Keller et al., 2001; Carvalho, 2003; Macedo, 2005).

As interferências ocasionadas aos espermatozoides pelo plasma seminal, a presença de fatores inibidores de mobilidade, velocidade espermática e integridades estrutural e funcional são descritas em muitas espécies de mamíferos e algumas aves (Iwamoto e Gagnon, 1988; Chao, et al., 1996; Tanphaichitr et al., 1996; Thérien et al., 1999; Moreno, et al., 2002; Romitto, 2003; Roncoletta, 2003; Jobin et al., 2004). Portanto, os resultados obtidos neste experimento sugerem que a remoção do plasma seminal é benéfica à congelabilidade dos espermatozoides bovinos. Contrariando Simpson & Holmes (1994) que afirmaram a essencialidade do plasma seminal

a congelabilidade e fertilidade do sêmen. Roncoletta (2003) descreveram proteínas que prejudicam e outras que melhoram a congelabilidade do sêmen bovino.

A intensidade de centrifugação de 600xg por um tempo de 10 minutos, proporcionou uma boa taxa de recuperação espermática e não comprometeu a atividade morfo-funcional dos espermatozoides, colaborando para o sucesso dos demais passos da criopreservação do sêmen bovino. Estes resultados assemelham-se aos obtidos em eqüinos por Papa et al. (1998), que relataram que a centrifugação de 600 xg por 10 minutos não expressou nenhum efeito deletério sobre a integridade do acrossomo. Esses resultados, somam-se aos obtidos em sêmen de garanhões por Dell'Aqua (2000), que concluiu que a melhor força e tempo de centrifugação, com uma recuperação espermática em torno de 87%, foram de 600xg / 10 min.

7.2. EXPERIMENTO II: Influência de diferentes tempos de estabilização sobre as variáveis espermáticas pós-descongelação.

O sêmen de várias espécies necessita de um período de resfriamento antes da congelação, para que desenvolva uma máxima resistência aos efeitos adversos da criopreservação. Watson (1979) sugeriu que este tempo não é só importante para permitir a entrada do glicerol, mas também permite que as membranas espermáticas se acomodem ou que os influxos iônicos ocorram nas células. Os efeitos deletérios da refrigeração da célula podem se apresentar de maneiras diferentes entre as espécies, entre os indivíduos e ainda entre os compartimentos de um espermatozoide, como o acrossômico e o mitocôndrial (Garner et al., 1999; Holt, 2000).

Revisando as técnicas atuais de congelação e armazenagem de sêmen bovino, Vishwanath & Shannon (2000) concluíram que o resfriamento e o período de equilíbrio antes da congelação, são necessários no processamento do sêmen diluído, e estes procedimentos trazem efeitos benéficos na recuperação espermática pós-descongelação

Verifica-se na literatura que o tempo necessário para que a célula espermática se estabilize em um meio diluidor é extremamente variável (Bicudo et al., 1993; Papa et al., 2000; Gonzalez, 2004; Alberti et al., 2004; Celeguini 2005). Este tempo pode variar de acordo com os constituintes do diluidor e do protocolo adotado, podendo também depender das características dos espermatozoides de uma determinada espécie e do indivíduo (Holt, 2000).

A avaliação isolada dos tempos de estabilização, neste experimento, foi possível por não ter ocorrido efeito entre diluente e tempo; e tempo com metodologia, exceto para RAP em que houve interação diluente e tempo. Nas variáveis MT, MP e RAP, os valores alcançados diferiram ($p < 0,01$) entre si, de acordo com o tempo. Nas variáveis MT e MP, as médias se alteraram de maneira crescente entre os tempos testados, porém, não variaram de forma linear. A análise pelo modelo linear hiperbólico mostrou que ocorreu pouca variação dos resultados de MT, MP e RAP após as três horas de estabilização, sem implicações na qualidade do sêmen. Tal constatação evidencia que, na prática, a economia de uma hora no período de resfriamento das palhetas a serem congeladas, não interfere significativamente na viabilidade espermática pós-descongelação.

Os resultados deste experimento discordam dos apresentados por Papa et al. (2000), que utilizaram diluidor GG em quatro tempos de estabilização (60, 120, 180 e 240 minutos) e não encontraram diferença entre eles ($p > 0,05$), em motilidade e vigor analisado visualmente em microscopia de contraste de fase. Contrariam também as conclusões de Chacur (1996) que trabalhou com sêmen de bubalino, com 1, 2, 3 e 4 horas de estabilização e mostrou que a motilidade e o vigor, avaliados subjetivamente, foram iguais ($p > 0,05$) entre os tempos. Foote & Kaproth (2002) avaliaram a motilidade e a fertilidade de sêmen de touros com 4 e 18 horas de estabilização. Seus resultados mostraram que embora o tempo de 18 horas tenha sido superior ($p < 0,01$) na motilidade, eles não diferiram ($p = 0,09$) quanto a fertilidade.

Os valores das variáveis de velocidades espermáticas VCL, STR e LIN não sofreram influência do tempo de estabilização. Para as três variáveis as médias obtidas foram iguais ($p > 0,01$) nos diferentes períodos propostos.

Segundo Farrell et al. (1998), a combinação das velocidades apresentadas por CASA são altamente correlacionadas com a fertilidade, portanto, pode-se prever que o período de estabilização embora tenha alterado ($p < 0,01$) os valores das variáveis relacionadas ao movimento dos espermatozoides, devem influenciar significativamente os resultados de fertilidade.

A variável RAP apresentou interação entre diluente e tempo, indicando que os diluentes TG e M20 se comportaram de maneiras distintas no decorrer da curva de regressão traçada. Apesar da ocorrência do efeito de diluente para essa variável, ambos os diluentes apresentaram pouca variação após a terceira hora de refrigeração. Os valores desta variável, pelas médias dos dois diluentes, também apresentaram efeito de tempo, sendo o melhor resultado absoluto conquistado com três horas de estabilização, diferente do obtido para as outras variáveis de motilidade.

Com base nos resultados obtidos neste experimento, observou-se que o tempo de estabilização interferiu na motilidade pós-descongelamento dos espermatozoides, em contraposição aos dados encontrados na literatura (Sahni & Mohan, 1988; Salhad & Merilan, 1991; Chacur, 1996; Papa et al, 2000; Cunha, 2002).

Após o término do processo de criopreservação, os espermatozoides devem apresentar uma boa motilidade para que possam atingir o sítio de fertilização e penetrar no óvulo. A integridade da membrana plasmática também precisa ser mantida, para a sua posterior ligação à zona pelúcida e membrana vitelínica, formando o zigoto (Holt, 1995; Zuccari, 1998).

A percentagem de espermatozoides que mantiveram a membrana plasmática íntegra diferiu ($p < 0,01$) entre os tempos de estabilização. Com os resultados mostrados na IMP traçou-se uma reta de regressão, impossibilitando a estimativa do tempo de estabilização ótimo. Sugere-se que se o período de estabilização fosse ampliado além dos 240 minutos, os valores obtidos supostamente seriam superiores aos verificados neste trabalho, embora não se possa prever o período em que essa hipótese seria verdadeira. Chacur (1996) verificou diferença ($p < 0,05$) de integridade de membrana

apenas entre 1 e 3 horas de estabilização, em sêmen congelado com GG enquanto o Triladyl[®], na integridade de membrana plasmática, apresentou diferença ($p < 0,05$) entre 2 e 3 horas de estabilização.

Para que a congelação se torne um processo rápido e ágil busca-se o menor tempo de estabilização, porém todos os benefícios advindos deste procedimento devem ser garantidos às células espermáticas (Cunha, 2002).

Analisando isoladamente os resultados obtidos por cada um dos diluentes utilizados neste experimento, nota-se que o desempenho de M20 superou ($p < 0,01$) ao TG em todas as variáveis exceto VCL, para o qual este foi melhor ($p < 0,01$), ratificando os dados obtidos no experimento I. Tal observação também pode ser feita com relação à remoção do plasma seminal nas amostras, mostrando a melhora ($p < 0,01$) obtida por esta metodologia nas diferentes variáveis analisadas, embora em STR e LIN os valores tenham sido iguais ($p > 0,01$).

7.3. EXPERIMENTO III: Efeito de dois meios diluentes e da centrifugação sobre a fertilidade de vacas inseminadas em tempo fixo.

O principal produto dos sistemas de produção de bovinos de corte é o bezerro; logo os índices de fertilidade de uma propriedade são essenciais para a viabilidade econômica da atividade. Com o advento da IA, os criadores são capazes de acelerar o ganho genético e produtivo dos rebanhos e para isso o sêmen congelado tem papel fundamental. Yoshida (2000) afirmou que o principal objetivo do desenvolvimento das técnicas de congelação de sêmen e de IA é atingir índices de fertilidade semelhantes ou melhores que os obtidos com a monta natural.

Os resultados do teste de fertilidade mostraram que para o número de vacas inseminadas neste experimento não houve diferença ($p > 0,05$) entre os meios diluentes confrontados, embora as comparações individuais entre eles tenham mostrado tendência de superioridade ($0,05 < p < 0,10$) do diluente M20 centrifugado contra TG e M20 não centrifugado, sugerindo que a centrifugação

pode melhorar a fertilidade, assim como melhorou a congelabilidade, confirmada pelos testes laboratoriais. A tendência de superioridade dos valores conquistados pelas amostras sem plasma seminal, mostra que essa metodologia de congelação passa a ser uma importante ferramenta para o incremento dos índices de fertilidade dos rebanhos bovinos que dispõem da técnica de IA em seu manejo reprodutivo.

As percentagens de fertilidade de 48,7%, 51,8% e 57,1%, alcançadas pelos grupos A, B e C, respectivamente, mostram semelhança de resultados entre os grupos e os índices de fertilidade obtidos neste experimento foram considerados bons, apesar de ter sido utilizada a técnica de IATF. Os índices obtidos neste experimento são superiores aos 42,7% de prenhez apresentados por Baruselli et al. (2001), utilizando protocolo de sincronização similar e sêmen congelado com TG, superando também os resultados de Odde (1990) nas mesmas condições quando obteve 33,1% de vacas prenhes. Os resultados que mais se aproximaram aos do presente trabalho foram os de Bó et al. (2001) que obtiveram taxa de prenhes de 48,9% equivalendo-se ao grupo A (TG). Macmillan (1999) obteve 48,3% de prenhez à primeira IATF utilizando protocolo com implantes de progesterona e sêmen congelado com TG.

Coelho et al. (2000) utilizaram sêmen congelado com diferentes diluentes para fecundação *in vitro* (FIV), e notaram que houve diferença na taxa de clivagem, sendo que o pior resultado também foi com o diluidor TG, o que ratifica o seu desempenho neste trabalho. Os valores obtidos neste estudo contrapõem-se aos de Graham et al. (1972), que consideraram o TRIS a melhor substância a ser utilizada em diluentes, como tampão para diluir o sêmen para congelação, como também melhora os índices de motilidade e fertilidade.

Os dados obtidos neste teste superaram a expectativa de prenhez com IATF à primeira inseminação, que é de 45% (estimativa) em vacas no início da estação de monta. Não havia registros de resultados semelhantes a estes nas fazendas onde as inseminações foram realizadas, o que permite afirmar que tanto o diluente, quanto a metodologia, são importantes para o desenvolvimento das técnicas e para os resultados da IA.

8. Conclusões

8. CONCLUSÕES

Nas condições deste estudo resultados permitiram concluir que:

- ü O meio diluente M20 foi o que apresentou os melhores resultados laboratoriais, sendo considerado o ideal para a utilização no processo de congelação de sêmen bovino.

- ü O processo de centrifugação para a remoção do plasma seminal, melhorou a qualidade do sêmen na maioria das variáveis espermáticas.

- ü O tempo de estabilização de 180 minutos foi considerado o melhor para a criopreservação do sêmen bovino.

- ü No teste de fertilidade em campo, o confronto de amostras de sêmen congeladas com e sem plasma seminal, exibiu uma tendência de superioridade ($0,05 < p < 0,10$) das amostras que tiveram o plasma seminal removido.

9. Referências

9. REFERÊNCIAS

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

AIRES, V.A.; HINSCH, K.D.; SCHLOESSER, F.M.; BOGNER, K.; SCHLOESSER, S.M.; HINSCH, E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology**, v.60, p.269-279, 2003.

AISEN, E.G.; CISALE, H.; FERNANDEZ,. Criopreservación de semen ovino. Nueva técnica. **Veterinaria Argentina**, v.7, p.176-182, 1990.

AITKEN, R.J.; BUCKINGHAM, D.; HARKISS, D. Use of a xanthine oxidase oxidant generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. **Journal Reproduction and Fertility**, v.97, p. 441-450, 1992.

AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S., Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparative techniques. **Journal of Andrology** , v.9, p. 367-376, 1988.

ALBERTI, K.; CARMO, M.T.; OBA, E.; MENDONÇA, A.L.Z.; SOUZA, D.B.; DELL'AQUA JR., J.A.; VIANNA, F.P.; PAPA, F.O. Eficiência de novo diluente na congelabilidade de sêmen bovino. **Acta Science Veterinariae**, v. 32 (Suplemento), p. 176, 2004.

ALBRIGHT, J. L.; EHLERS, M. H.; ERB, R. E. Motility of bovine spermatozoa stored at 5° C when extended in mixtures of yolk-citrate, yolk-glycine, whole milk, shimilk and glicerol. **Journal Dairy Science**, v. 41, p. 524 – 529, 1958.

ALMQUIST, J. O.; GLANTZ, P. J.; SHAFFER, H. E.. The effect of a combination of penicillin and streptomycin upon the livability and bacterial content of bovine semen. **Journal Dairy Science**. v.32, p.183–190, 1949.

AL-SOMAI, N.; VISHWANATH, R.; MOLAN, P.C. SHANNON, P. Anionic and Cationic components from protein aggregates in Bovine Seminal Plasma and their effects on sperm motility. **Molecular Reproduction and Development**, v.39, p. 328-336, 1994a.

AL-SOMAI, N.; VISHWANATH, R.; SHANNON, P.; MOLAN, P.C. Low molecular weight components in bovine semen diffusate and their effects motility of bull sperm. **Reproduction Fertility and Development**, v. 6, p. 165-171, 1994b.

ALVARENGA, M.A. **Melhoria da resistência espermática a congelação e diminuição das variações entre raças e indivíduos com o uso da dimetilformamida para sêmen de garanhões**. Botucatu, SP, 2002. 87p. Tese (livre-docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia , Universidade Paulista do Estado de São Paulo.

AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Principals of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal Equine Veterinarian Science**, v.7, p.145-73, 1987.

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

AN, T.Z.; IWAKIRI, M.; EDASHIGE, K.; SAKURAI, T.; KASAI, M. Factors affecting the survival of frozen – thawed mouse spermatozoa. **Cryobiology**, p.237-49, 2000.

ANZAR, M.; HASSAN, M.M.; GRAHAM, E.F.; DEYO, R.C.M.; SINGH,G. Efficacy of the hamilton thorn motility analyzer (HTM-2030) for the evaluation of bovine semen. **Theriogenology**, v.36, n.2, p.307-17, 1991.

ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para espermatozóides eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. São Paulo, 2000. 85p. Tese (Livre Docência) –

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
São Paulo.

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

ASBIA (Associação Brasileira de Inseminação Artificial). Disponível em: <http://www.asbia.org.br>. Acesso em: 15 de outubro de 2004.

ASHWOOD-SMITH, M. J. Mechanisms of cryoprotectant action. In: BOWLER, K., FULLER, B. J. **Temperature and animal cells**. Cambridge: The Co. of Biologists Ltd. p. 395-406, 1987.

ASHWORTH, P.J.C., HARRISON RAP, MILLER NGA, PLUMMER JM, WATSON PE. Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. **Reproduction Fertility and Development**, v.6, p.173-180, 1994.

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

BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA, E.H.; MARQUES, M.O. Programas de inseminación artificial en tiempo fijo en *Bos taurus*. **Resúmenes: Simposio Internacional de Reproducción Animal**, Huerta Grande, Córdoba, p.95-116, 2001.

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

BEDFORD, S.J.; GRAHAM, J.K.;AMANN, R.P.;SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. Use of two freezing extenders to cool stallion spermatozoa to 5°C with and without seminal plasma. **Theriogenology**, v.43, p.939-953, 1995a.

BEDFORD, S.J.; JASKO, D.J.; GRAHAM, J.K.;AMANN, R.P.;SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. Effect of seminal extenders containing egg yolk and glycerol on motion characteristics and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 43, p.955-967,1995b.

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

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

BICUDO, S.D., PAPA, F.O., TAVARES, C.V.N., MEIRA, C., ALVARENGA, M.A. Glicina-Gema: proposta de um novo diluidor para congelação de sêmen bovino. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, Portugal. **Anais...** Portugal, v.2, p.174-179, 1993

BIDOT, A. Evaluación de la esperma de sementales bovinos que presentan baja congelabilidad. **Revista Cubana Reproduccion Animal**, v.16, p.45-53, 1990.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. ATTI 7 SIMPOSIUM INTERNATIONAL ZOOTECNICAL , p.125, 1972.

BÓ, G.A.; CUTAIA, L.; BROGLIATTI, G.M.;MEDINA, M.TRIBULO, H. Programas de inseminación artificial em tiempo fijo en ganado bovino utilizando progestagenos y estradiol. Resúmenes del cuarto SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, Huerta Grande, Córdoba, p.117-136, 2001.

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

BRAHMKSHTRI, B.P., EDWIN, M.J., JOHN, M.C., NAINAR, A.M., KRISHNAN, A.R. Relative efficacy of conventional sperm parameters and sperm penetration bioassay to assess bull fertility *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v 54, p. 159-68, 1999.

BRITO, L.F.C., BARTH, A.D., GOESEELS-BILODEAU, S., PANICH, P.L., KASTELIC, J.P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with *in vitro* fertilization rate. **Theriogenology**, v.60, p. 1539-51, 2003.

BROWN, C.A.; BOONE, W.R.; SHAPIRO, S.S. Improved cryopreserved semen fecundability in an alternating fresh-frozen artificial insemination program. **Fertility and Sterility**. v.50, p.825-827, 1988.

BUDWORTH, P.R., AMANN, R.P., CHAPMAN, P.L. Relationship between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. **Journal of Andrology**, v.9, p.41-3, 1998.

BYRD, W.;BRADSHAW, K.; CARR, B.; EDMAN, C.; ODOM, J.; ACKERMAN, G. A prospective randomized study of pregnancy rates following intrauterine and intracervical insemination using frozen donor semen. **Fertility and Sterility**. v.53, p.521-527, 1990.

CANCEL, A.M.; CHAPMAN, D.A.; KILIAN, G.J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1293-1301, 1997.

CARVALHO, G.A. **Estudo de diferentes diluentes sobre a viabilidade espermática utilizando-se diversas formas de refrigeração com sêmen eqüino**. 2003. 183p. Dissertação (mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia , Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

CASAGRANDE, J.F., PINHEIRO, L.E.L., FERRAZ, J.B.S., ALMEIDA, C.A., A influência da motilidade e da velocidade espermática sobre a fertilidade do sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.3, n.2, p.31-5, 1980.

CELEGUINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes.** São Paulo.2005.186p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia , Universidade de São Paulo.

CHACUR, M. G. M. **Avaliação da congelação de sêmen bubalino, com os diluidores Glicina-Gema, Tryladil[®] e TES em diferentes tempos de equilíbrio.** Botucatu, SP: FMVZ/UNESP, 1996, 105p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista.

CHEN, Y., FOOTE, R.H., BROCKETT, C.C. Effect of sucrose, trealose, hypotaurine, taurine, and bloodserum on survival of frozen bull sperm. **Cryobiology**, v.30, p.423 – 431, 1993.

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

COELHO, L.A., ESPER, C.R., GARCIA, J.M. Avaliação da integridade de membrana plasmática dos espermatozóides de bovinos, através de corantes fluorescentes, e sua relação com a motilidade progressiva. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.19, n.3-4,p.173-80, 1995.

COETZEE, K., KRUGER, T.F., LOMBARD, C.J. *ET AL.* Assessment of inter- and intra-laboratory sperm morphology readings using a Hamilton Thorne research IVOS semen analyser. **Fertility and Sterility**, v.71, p.1–5, 1999.

CORTEEL, JM. Effects of seminal plasma on the survival and fertility of spermatozoa kept in vitro. **Reproduction Nutrition Development**, v.20, p.1111–1123, 1980.

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

CROWE, J.H., CROWE, L.M., CARPENTER, J.F. e AURELL, W.C.. Stabilization using dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochemistry Journal**, v. 242, p.1-10, 1987.

CUNHA, I.C.N., **Criopreservação do sêmen de cães**. Botucatu, 2002.149 p.Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista.

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

DARIN-BENNETT, A., POULOS, A., WHITE, I.G. The effect of cold-shock and freeze-tawing on release of phospholipids by ram, bull and boar spermatozoa. **Australian Journal Biology Reproduction**, v. 26, p. 1409-20, 1973.

DE LEEUW, F.E. et al. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, v.27, p.171-183, 1990.

DE LEEUW, F.E.; DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.HG.;COLENBRANDER, B.;VERKLEIJ, A.J. Effects of Various Crioprotective Agents and Membrane-Stabilizing Compounds on Bull Sperm Membrane Integrity after Cooling and Freezing. **Cryobiology**, v.30 p.32-44, 1993.

DE LEEUW, A.M.V.; HARING, R.M.; KAAL-LANSBERGEN, L.M.T.E., den Daas, J.H.G. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. **Theriogenology**, v. 54, p. 57-67, 2000.

DELL'AQUA JR, J.A. **Efeito da centrifugação, tipos de envase e temperatura de descongelação sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade relacionados com o local de deposição e concentração da dose inseminante do sêmen congelado eqüino**. Botucatu, 2000. 113p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

DOTT, H.M. The effects of bovine seminal plasma on the impedance change frequency and glycolysis of bovine epididymal spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.38: p.147-156,1974.

ENGLAND, G.C.W. **The criopreservation of dog semen**. London, Thesis submitted for Fellowship of Royal College of Veterinary Surgeons, 1992.

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

FARRELL, P.B., PRESICCE, G.A., BROCKETT, C.C., FOOTE, R.H. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v.49, p.871-879, 1998.

FERREIRA, J.C.P.; NEVES NETO, J.R.; PAPA, F.O. Avaliação computadorizada das características espermáticas de garanhões com fertilidade comprovada. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, p. 131-132, 1997.

FLIPSE, R. J.; ALMQUIST, J. O. Diluters for bovine semen – motility of bovine spermatozoa in milk-glycine and egg yolk-glycine diluents with and without glycerol. **Journal Dairy Science**, v. 39, p. 1956 – 1996, 1956.

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

FOOTE, R.H., Artificial Insemination to cloning. **Cornell University Resource Center**, Ithaca, NY, 1998.

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

GADELLA BM, COLENBRANDER B, LOPES-CARDOSO M. Arylsulfatases are present in seminal plasma of several domestic mammals. **Biology and Reproduction**, v.45, p. 381-386, 1991.

GAO, D.; CRITSER, J.K. Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells. **ILAR Journal**, v. 41 (4), p.187-96, 2000.

GARCIA, M.A.; GRAHAM, E.F. Dialysis of bovine semen and its effect on fresh and freeze-thawed spermatozoa. **Cryobiology**, v.24, p.446-454, 1987.

GARNER, D.L., PINKEL, D., JOHNSON, L.A. et al. Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**, v.34, p.127-38, 1986.

GARNER, D.L.; JOHNSON, L.A.; ALLEN, C.H. Fluorimetric evaluation of cryopreserved bovine spermatozoa extended in egg yolk and milk. **Theriogenology**, v. 30, p.369-378, 1988.

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

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

GERENA, R.L.; IRIKURA, D.; URADE, Y.; EGUCHI, N.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Identification of a fertility associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. **Biology of Reproduction**, v.58, p. 826-833, 1998.

GERRIS, J. & KHAN,I. Correlation between *in vitro* fertilization and human sperm density and motility. **Journal of Andrology**. v. 8, p. 48-54, 1987.

GIBSON, C.D., GRAHAM, E.F. The relationship between fertility and post-freeze motility of bull spermatozoa (by pellet freezing) without glycerol. **J. Reproduction and Fertility**, v.20, p.155-7, 1969.

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

GONZALEZ, C. I. M. ; OBA, E. ; BICUDO, S. D. ; SOUZA, M. I. L. . Cryopreservation of semen in Ideal Rams with Glycine-Egg-Yolkmilk extender. In: ICAR, 1996, Sydney. ANAIS DO INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION. Sydney - Australia : ICAR, v. 2. p. 2-9,1996.

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. 92p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia , Universidade de São Paulo.

GRAHAM, E.F., CRABO, B.G. AND BROWN, K.I. Effects of some zwitterion buffers on the freezing and storage of spermatozoa. **Journal Dairy Science**, v.55, p.372–378, 1972.

GRAHAM, J.K. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. **Veterinarian Clinical of North America Equine Practice**, v.12 p.119-30, 1996.

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

GRAHAM, JK. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. **Theriogenology**. , v. 41: 1151-1162, 1994.

GROTTE, O.; GRAFFER, T. ; OLESEN I. Artificial insemination with frozen ram semen in Norway. PROC 12TH INTERNACIONAL CONFERENCE ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION. p. 1557-1559, 1992.

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

HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7.ed. Barueri: Manole, 2004. 509p.

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

HARRISON, R.A., VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.343-52, 1990.

HEITLAND, A.V. et al. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. **Equine Veterinarian Journal**, v.28, p.47-53, 1996.

HENAULT, M.A., KILLIAN, G.J., Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 108, p. 199-204, 1996.

HIRAI, M., CERBITO, W.A.; WIJAYAGUNAWARDANE, et al. The effect of viscosity of semen diluents on motility of bull spermatozoa. **Theriogenology**, v.47, p.1463-1478, 1997.

HOLT, W.V. e NORTH, R.D. The role of membrane-active lipids in the protection of ram spermatozoa during cooling and storage. **Gamete Research**, v. 19, p.77-89, 1988.

HOLT, W.V. The sperm plasma membrane. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON HUMAN SPERM ACROSSOME REACTION, PHYSIOLOGICAL AND PHARMACOLOGICAL INDUCTION AND TRANSDUCTION PATHWAYS, 1995. France. **Proceedings....**,France, 1995.

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

HOLT, W.V.; NORTH, R.D. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.51, p.414 - 424, 1994.

IBGE, Instituto Brasileira de Geografia e Estatística www.ibge.gov.br Acesso em 24/02/2006.

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

JANUSKAUSKAS, A. JOHANNISSON, A., SÖDERQUIST, L. e RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in swedish dairy bulls. **Theriogenology**, v. 53, p.859-75, 2000.

JANUSKAUSKAS, A., GIL, J., SÖDERQUIST, L., HAARD, M.G.M., HAARD, M.Ch., JOHANISSON, A. RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. **Theriogenology**, v.52, p.641-58, 1999.

JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars. Veterinaria**, v.10, p.156-65, 1994.

JASKO, D.J.; MORAN, D.M.; FARLIN, M.E.; SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology** v.35, p. 1059-1068, 1991.

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

JOBIN, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBERGO, C.G.; SOUZA, D.O.; WALD, V.B.; TRAMONTINA, F.; MATTOS, R.C. Two-dimensional electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v.61, p.255-266, 2004.

JONDET, R., RABADEUX, Y. Utilisation du test de thermoresistance dans l'appréciation de la valeur du sperme congelé de taureau. In: 9th INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF ZOOTECNY, 1974, Milano. **Proceedings ...** Milano, p.15-7, 1974.

JONES, R.C. The nature of ultrastructural changes induced by exposure of spermatozoa to lysolecithin. **Theriogenology**, v.6, p.656, 1976. (Abstract).

KATSKA, L., RYNSKA, B., SMORAG, Z. Effect of seminal plasma on the in vitro fertilizability of bull spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.44, p.23-31, 1996.

KELLER, A.; MALSCHITZKY, E.; HOTT, A.; VIERA, M.J., MATTOS, R.; GREGORY, R.M., MATTOS, R.C. Effect of method of seminal plasma removal, extender and length of storage on motility and fertility of equine semen. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON STALLION REPRODUCTION, 3., 2001, Colorado. **Proceedings...**, Colorado, p.318-319, 2001.

KENNEY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L., et al. Minimal contamination techniques for breeding mares. *Techniques and preliminary findings*. In: ANNUAL CONVENTION OF AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, **Proceedings...**v.21, p.327-36, 1975.

KILLIAN, G.J. Fertility factors in seminal plasma. In: 14TH TECHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION & REPRODUCTION, . **Proceedings...** p. 33-38, 1992.

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

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

LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L.; DONDERO, F. lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy . **Human Reproduction Update**, v. 2, p. 246-256, 1996.

LILLO A. Lambing rates after single inseminations of ewes with liquid or deep frozen semen. **Proceedings 10TH INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION** , v.3, p.373 abstr, 1984.

LIU, D.Y., DU PLESSIS, Y.P., NAYADU, P.L., et al. The use of in vitro fertilization evaluated putative tests of human sperm fuction. **Fertility and Sterility**, v.49, p.272-77, 1998.

LOPES, M.D. Estudo da viabilidade do processo de refrigeração do sêmen canino, utilizando-se diluidores a base de leite e glicina gema . IN: XII CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, v.21, p.68, Caxambu. Revista Brasileira de Reprodução Animal, 1997.

LOPES, M.D., PAPA, F.O. Effects of diferent diluents and method of centrifugation for canine semen congelation. In: CONGRESS OF THE WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, 23, 1998, Buenos Aires. **Proceedings...** Buenos Aires, p.799,1998.

LÓPEZ, A.R. e ENCALADA, S.W. Efecto da la remoción parcial del plasma seminal sobre la congelabilidad del semen bovino. **Revista Biomedica**, v.08, n. 1, p. 21-25, 1997.

MACEDO, L.P. **Efeito de diferentes diluentes e antibióticos sobre a longevidadee fertilidade do sêmen eqüino refrigerado a 5°C**. Botucatu 2005. 80P. Tese (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

MACMILLAN, K.L. Pharmacological control of the oestrus cycle to improve the reproductive performance of cattle. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.2, p. 61-64, 1999.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. **Male reproductive function and semen general features of the seminal plasma**. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 1981.

MAPA, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: www.agricultura.gov.br. Acesso em 30/06/2006.

MARCK, S.O., WOLF, D.P, TASH, J.S. Quantification of specific parameter of motility in large members of human sperm by digital image processing. **Biology of Reproduction**, v.38, p.270-81, 1988.

MARTINEZ, H.R. Evaluation of Frozen semen: traditional and new approaches. International Veterinary Information Service, 2000. Disponível em: <http://www.ivis.org>. Acesso em: 25/07/2005.

MARTINUS, R.D., MOLAN, P.C., SHANNON, P. Deleterious effect of seminal plasma in the cryopreservation of bovine spermatozoa. **New Zealand Journal Agricultural Research**, v.34, p.281-285, 1991.

MATTOS, R.C.; JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBERGO, C.G.; WALD, V.B.; HORN, A.P.; MATTOS, A.L.G. BSP A1/A2: A seminal plasma marker of high semen freezability. In: 15th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION. **Proceedings...**, 2004, p. 462.

MAZUR, P. Equilibrium, quasi-equilibrium and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. **Cell Biophys**, v.17, p.53-92, 1990.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal Physiology**., v. 247, p. C125-42, 1984.

MAZUR, P. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. In: 9TH INT CONG. ANIMAL REPROD AND A. I. **Proceedings...**v.2, p.99-114, 1980.

MAZUR, P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiology**, v.14, p.251-272, 1977.

MEDEIROS, A.S.L. **Utilização de diferentes tipos de amidas como agentes crioprotetores para espermatozoides de garanhões**. Botucatu, 2003. 113p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

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

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais domésticos e inseminação artificial**. Porto Alegre: Sulina, 1982.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**, 6^a ed. Porto Alegre: Sulina, v.2, 1987.

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

MOORE, H.D.M.; HIBBIT, K.C.S. The binding of labeled basic proteins by boar spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.46, p.71, 1976.

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

MOSES, D.F., DE LAS HERAS, M.A., VACCARCEL, A. et al. Use of computerized motility analysis for the evaluation of frozen-thawed ram spermatozoa. **Andrology**, v.27, n.1, p.25-9, 1995.

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

MOUSTAFA, A.R.; MESZAUROS, I. Interrelationship between the total protein content of bovine seminal plasma and behavior of the spermatozoa after

freezing-and-thawing. **Acta Veterinary Academy Science Hungarian**, v.28,n.4, p.403-408, 1981.

NAGASE, H., NIWA, T., YAMASHITA, S., IRIE, S. Deep freezing Bull semen in concentrated pellet form:II. Protective action of sugars. In: 5TH INT. CONGR. ANIM. REPROD. A.I. **Proceedings**...Trento, Italy, v.2, p.1121-1123, 1964.

NAGASE, H., YAMASHITA, S., IRIS, S. Protective effects of sugars freezing injury of Bull spermatozoa. In: 6INT CONG ANIM REPROD AND AI. **Proceedings**...v.2, p.1111-1113, 1968.

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

NICOLAFSEN, H., HVIDT, A. Phase behaviour of the system trehalose-NaCl-water. **Criobiology**, v.31, p.199-205, 1994.

OBA, E. ; DELLAQUA JUNIOR, J. A. ; SOUSA, D. B. ; PAPA, F. O. ; BICUDO, S. D. ; MACEDO, L. P. Influence of centrifugation and removal of seminal plasma in cryopreservation of ram semen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 2, n. 1, p. 481-481, 2004.

ODDE, K.G. A review of synchronization of estrus in post partum cattle. **Journal of Animal Science**. v.68, p. 817-830, 1990.

OLAFSSON, T. Insemination of sheep with frozen semen. **Results obtained in a field trial in Norway**. Zuchthgiene,v.15, p.50-59, 1980.

OLLERO, M., BESCOS, O., CEBRIAN-PEREZ, J.A., MIIÑO-BLANCO, T. Loos of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process.**Theriogenology**, v.49, p.547-555, 1998.

OLLERO, M., CEBRIAN-PEREZ, J.A., MIIÑO-BLANCO, T. improvement of cryopreserved ram sperm heterogeneity and viability addition of seminal plasma.**Journal of Andrology**, v.18, p.732-739, 1997.

PACE, M.M.; GRAHAM, E.F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. **Journal of Animal Science**, v, 39, p.1144-9, 1974.

PAPA, F.O., ALVARENGA, M.A. Utilização da Solução de Ringer com lactato de sódio em substituição ao pré-diluyente EDTA no congelamento de sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.12, p.93-7, 1988.

PAPA, F. O.; GABALDI, S.H.; WOLF, A. Viabilidade espermática pós-descongelação de sêmen bovino criopreservado com meio diluyente Glicina-Gema em quatro diferentes tempos de estabilização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, , v.24, n.1, p. 39 – 44, 2000.

PAPA, F. O.; NEVES NETO, J. R. ; LEME, D. P. ; FERREIRA, J. C. P. . A comparative study between the freezability and fertility of stallion semen using different extenders. In: Annual Conference Of Society For Theriogenology., 1998, Baltimore. ANAIS DO ANNUAL CONFERENCE OF SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, p. 149-151, 1998.

PAPA, F.O. et al. Influência da centrifugação sobre a motilidade de sêmen de eqüino em resistência térmica e congelamento. **Revista Ciência Biomédica**, v.2, p.31-9, 1981.

PAPA, F.O. TAVARES, C.V.N., MEIRA, C., BICUDO, S.D., ALVARENGA, M.A. Glicina-Gema: Proposta de um novo diluidor para congelação de sêmen eqüino. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 5, 1993, Portugal. **Anais...** Portugal, v.2, p.378-84,1993.

PAPA, F.O., ZAHN, F.S., DELL'AQUA JR, J.A., ALVARENGA, M.A. Utilização do diluyente MP50 para criopreservação de sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p.184-187, 2002.

PARKS, J.E., GRAHAM, J.K. Effect of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Therigenology**, v.38, p.209-22, 1992.

PEÑA, A.I. **Flow cytometry in the assessment of fresh and frozenthawed dog semen, and the effects of different cryopreservation methods on ost-thaw sperm survival and longevity.** Doctoral thesis, Uppsala, 2000.

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

PETERSON, R.N.; SILVERSTEIN, K.; FREUND, M. A rapid fluorometric method for the determination of DNA in human semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 41, p. 485-488, 1974.

PHILLIPS, P.H., LARDY, H.A. A yolk-buffer for the preservation of bull semen. **Journal of Dairy Science.**, n.23, p.399-404, 1940.

PICKETT, B.W. et al. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v.26, p.167-74, 1975.

PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L.; MACKINNON, A. O. Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination. Fort Collins, CO: Colorado State University, Animal Reproduction Laboratory, 1987. (**Bulletin**, n.3).

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

PURSEL, V. G., JOHNSON, L. A. AND SCHULMAN, L. L.. Fertilizing capacity of boar semen stored at 15 C. **Journal of Animal Science**. v37, p.532-535,1973.

PURSEL, V.G.; SCHULMAN, L.L.; JOHNSON, L.A. Effect of Orvus ES Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. **Journal of Animal Science**, v.47, p.198-202, 1978.

ROMITTO, G.C. **Perfil bidimensional de proteínas do plasma seminal características ligadas ao desempenho reprodutivo de touros de corte**. São Paulo.2003. 192f. Dissertação (Mestrado), FMVZ, USP, São Paulo.

RONCOLETTA, M. **Perfil bidimensional de proteínas de membrana de espermatozoides e plasma seminal, relacionados com a fertilidade e com a congelabilidade do sêmen de touros**. Jaboticabal. 2003. 104f. Tese

(Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E.S.C.; RODRIGUES, L.H.; FRANCESCHINI, P.H.; ESPER, C.R. In: 15th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION. **Proceedings...**, 2004, p.187.

ROTA, A., LINDE-FORSBERG, C., VANNOZZI, J., ROMAGNOLI, S., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H. .Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing/thawing rates. **Reproduction in Domestic Animals**, v.33, p.355–361,1998.

ROYERE, D.; BARTHELEMY, C.; HAMAMAH, S.; LANSAC, J., Cryopreservation of spermatozoa: a review. **Human Reproduction**. , update 2, p. 553-559, 1996.

SAHNI, K.L.; MOHAN, G. A modified method of processing bovine semen for freezing under tropical conditions. **Indian Journal of Animal Science**, v. 58, p. 1075-1076, 1988.

SALHAD, S.A.; MERILAN, C.P. Some effects of collection equipment, glycerolation, and post-thaw re-equilibration times on the motility and survival of bovine spermatozoa. **Animal Reproduction Science** , v.24, p.53-61,1991.

SALISBURY, G.W.; FULLER, H.K.; WILLET, E.L. Preservation of bovine spermatozoa in yolk-citrate diluent and field results from its use. **Journal Dairy Science**, v.24, p.905-910,1941.

SALISBURY, G.W.; VANDEMARK, N.L.; LODGE, J.R. Principles and techniques of freezing spermatozoa. **Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle**. 2. ed. São Francisco: freeman and Company, p.494-554, 1978.

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

SCHMEHL, M.K.; ANDERSON, S.P.; VAZQUEZ, I.A.; GRAHAM, E.F.; The effect of dialysis of extended ram semen prior to freezing on post-thaw survival and fertility. **Cryobiology**, 23, 406-414, 1986.

SHIVAJI, S.; BHARGAVA, P.M. Antifertility factors of mammalian seminal fluid. **Bioassays** v.7, p.13-17,1987

SIMPSON, K.L.; HOLMES, C.H.; Presence of the complement-regulatory protein membrane cofactor protein (MCP, CD46) as a membrane-associated product in seminal plasma. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 102, p.419-424, 1994.

SNEDEKER, W.H.; GAUNYA, W.S. Dimethyl sulfoxide as a cryoprotective agent for freezing bovine semen. **Journal of Animal Science**, v. 30, p. 953 – 956, 1970.

SODERQUIST, L.; LUNDEHEIN, N.; NILSON, B. Assessment of fertility after using different procedures to thaw ram spermatozoa frozen in mini straws. **Reproduction in Domestic Animals**, v.34, p.61-66, 1999.

SOUZA, D.B., BICUDO, S.D., PAPA, F.O. Study of two methods of collect the ram semen (Artificial vagina and eletroejaculation) being used conventional and computerized analysis (HTMA-IVOS-10). *In: 26th WORLD VETERINARY CONGRESS*, 1999. Lion, France.

SQUIRES, E.L., PICKETT, B.W., GRAHAM, J.K., VANDERWALL, D.K., McCUE, P.M., BRUEMMER, J.E. Cooled and frozen stallion semen. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, Colorado State University, Bulletin n. 9, 1999.

STRÖM HOLST, B. **In vitro characterisation of cryopreserved canine spermatozoa with special reference to post-thaw time and zona pellucida binding capacity**. Uppsala, 1999. Doctor's dissertation, Swedish University of Agricultural Sciences.

TANPHAICHITR, N.; ZHENG, Y. S.; KATES, M.; ABDULLAH, N. Cholesterol and phospholipid levels of washed and Percoll gradient centrifuged mouse

sperm: presence of lipids possessing inhibitory effects on sperm motility. **Molecular Reproduction Development**, v.43, p. 187-195, 1996.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine Seminal Plasma phospholipid – binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, v.61, p.590-598, 1999.

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

TYLER, A.; ROTHSCHILD, L. Metabolism of sea urchin spermatozoa in glycine and yolk-citrate diluents at high and low temperature. **Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.**, v.76, p. 52, 1951.

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

VALCARCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A.; PERZ, L.; MOSES, D.F.; BALDASSRRE, H. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.41, p.483-489, 1994.

VAN DEMARK, N.L., MILLER, W.J., KINNEY, W.C.Jr.; et al. The preservation of bull semen at sub-zero temperatures. **Agric. Exp. Stn. Bull.** (III), p.621, 1957.

VAN VOORST, A. ; LEENSTRA, F.R. Effect of dialysis before storage or cryopreservation on fertilizing ability of fowl semen. **Poultry Science**, v. 74, p. 141-146, 1994.

VARNER, D.D., VAUGHAN, S.D., JOHNSIN, L. Use of computerized system for evaluation of equine spermatozoa motility. **Animal Journal Veterinarian Research**, v.52, p.224, 1991.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY, 2002 Foz do Iguaçu. **Proceedings....**Paraná: Brasil, p.149-179, 2002.

VIANA, F. **Correlação entre diferentes tipos de termorresistência e índices de fertilidade com sêmen congelado bovino.** Botucatu, 2004.100p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

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

WALL, R.J.; FOOTE, R.H. Fertility of bull semen frozen and store in clarified egg yolk – Tris-glycerol extender. **Journal Dairy Science**, v. 82, p. 817-21, 1999.

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

WATSON, P.F, MARTIN, I.C. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-1, p.481-92, 2000.

WATSON, P.F. Artificial insemination and the preservation of semen. In:Lamming, G.E. (Ed), **Marshall's Physiology of Reproduction.** Churchill Livingstone, Edinburgh, p.747-869, 1990.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility Development**, v. 7, p. 871-91, 1995.

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

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

WOLFE, J. e BRYANT, G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, v. 24, p.438-450, 2001.

YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSAY, M., TEKELI, T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrossomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, v.54, n. 4, p. 579-585, 2000.

YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 349-355, 2000.

ZAHN, F.S. **Efeito da incorporação de colesterol na membrana plasmática de espermatozoides sobre os parâmetros espermáticos e índice de fertilidade do sêmen congelado na espécie eqüina**. Botucatu, 2002.110p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

ZHANG, B.R., LARSSON, B., LUNDEHEIM, N., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. **International Journal Andrology**, v.21, p.207-16, 1998.

ZÚCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina**. Botucatu, 1998. 121p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

10. Anexos

10. Anexo

10.1 AJUSTE DO HTMA – IVOS – 10 PARA A REALIZAÇÃO DAS ANÁLISES DE SÊMEN BOVINO.

CARACTERÍSTICA	AJUSTE
Número de pontos examinados	30
Contraste das células em relação ao campo	60 pixels
Tamanho mínimo da célula	3 pixels
Contraste para células imóveis	50 pixels
Limite inferior para o índice retilíneo	70%
Referência: Velocidade Média (VAP)	< 40 $\mu\text{m/s}$
Referência: Velocidade lenta (VAP)	< 30 $\mu\text{m/s}$
Referência: Velocidade lenta (VSL)	< 20 $\mu\text{m/s}$
Limite inferior de tamanho	5 pixels
Limite superior de tamanho	3 pixels
Limite inferior de intensidade	0,24
Limite superior de intensidade	1,19
Limite inferior de alongamento	0%
Limite superior de alongamento	100%
Lentos contados como móveis	Não
Magnificação	1,95

10.2 FÓRMULAS DOS DILUENTES UTILIZADOS NA PESQUISA

DILUIDOR TRIS-GEMA – SOLUÇÃO MÃE

CONSTITUINTES	QUANTIDADE
TRIS ³	30,28g
Ácido Cítrico ³	17,30g
Água bidestilada / Deionizada	1000mL/qsp

DILUIDOR TRIS-GEMA – FRAÇÃO A

CONSTITUINTES	QUANTIDADE
Solução Mãe	800mL
Gema de ovo	200mL
Volume Final	1000mL

DILUIDOR TRIS-GEMA – FRAÇÃO B

CONSTITUINTES	QUANTIDADE
Solução Mãe	652mL
Gema de ovo	200mL
Glicose ³	20g
Glicerol ³	128mL
Volume Final	1000mL

Para cada mL de sêmen congelado são acrescentados: 250Mg de gentamicina⁴; 50mg de tilosina⁵; 150mg de lincomicina⁵ e 300mg de espectinimicina⁵.

DILUIDOR GLICINA-GEMA – SOLUÇÃO MÃE A

CONSTITUINTES	QUANTIDADE
Glicose	0,6g
Frutose	0,6g
Água bidestilada / Deionizada	40mL/qsp

DILUIDOR GLICINA-GEMA – SOLUÇÃO MÃE B

CONSTITUINTES	QUANTIDADE
Citrato de sódio	1,0g
Glicina	0,47g
Água bidestilada / Deionizada	40mL/qsp

As soluções A e B foram aquecidas separadamente até 94°C, durante 15 minutos. Prosseguindo o processo após a temperatura abaixar até aproximadamente 40°C.

DILUIDOR GLICINA-GEMA (Solução Final Meio I)

CONSTITUINTES	QUANTIDADE
Solução A	40mL
Solução B	40mL
Penicilina G Sódica	0,033g
Estreptomicina	100mg
OEP	0,4ml
Gema de Ovo	20mL

DILUIDOR M20

CONSTITUINTES	QUANTIDADE
Glicose	14g
Frutose	7g
TRIS	10g
Citrato de Sódio	1,2g
Citrato de potássio	0,5g
Eagle	1,0g
Glicina	2,0g
EDTA	0,2g
Lactose	13g
Amicacina	0,2g
Ac. Cítrico	3,3g
OEP (<i>Ovus es paste</i>)	4,0mL
Gema de Ovo	180mL
H ₂ O	750ml

Para a finalização do diluente a solução mãe deve ser dividida em duas frações: M1 que será acrescida de 14% de H₂O; e MII acrescida de 14% de Glicerol.

10.3 PREPARO DAS SONDAS FLUORESCENTES

SOLUÇÕES DE ESTOQUE

SOLUÇÕES	CONSTITUINTES	QUANTIDADES
Estoque IP	Iodeto de Propídio	10 mg
	Solução Fisiológica	20 mL
Estoque CFDA	Diacetato de 6-Carboxifluoresceína	9,2 mg
	Dimetilsulfóxido	20 mL
Estoque de Formaldeído	Formalina 40%	1 mL
	Solução Fisiológica	79 mL
Estoque de Citrato de Sódio	Citrato de Sódio	3 g
	Solução Fisiológica	100 mL

SOLUÇÃO DE TRABALHO

SOLUÇÕES	QUANTIDADE
Solução de Citrato de Sódio 3%	0,96 MI
Solução de Formaldeído	10 μ l
Solução de Iodeto de Propídeo	10 μ l
Solução de Carboxifluoresceína	20 μ l

AMOSTRAS PARA AVALIAÇÃO

SOLUÇÕES	QUANTIDADE
Sêmen	10 μ l
Solução de trabalho	40 μ l