

SILVA, N.C. et al. Avaliação de dois diluentes e diferentes técnicas de criopreservação de sêmen bovino. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 19, Ed. 166, Art. 1122, 2011.



PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Avaliação de dois diluentes e diferentes técnicas de criopreservação de sêmen bovino¹

Natalia do Carmo Silva²; Karen Martins Leão³; Elen de Paula Matias Moutinho²; Rossane Pereira da Silva²; Moraima Castro Rodrigues²; Marco Antônio Pereira da Silva⁴

¹Trabalho apresentado pela primeira autora como parte das exigências para conclusão do curso de bacharelado de Zootecnia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde

²Zootecnista pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde;

³Médica Veterinária, Profa. Dra. do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde;

⁴Zootecnista, Prof. Dr. do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, e-mail: marcotonyrv@yahoo.com.br

Resumo

A criopreservação de sêmen visa à produção de um banco de células espermáticas utilizadas para biotécnicas da reprodução, que é uma importante ferramenta para potencializar a genética dos animais. O presente trabalho teve como objetivo comparar dois diluentes comerciais de criopreservação, Botubov[®] (BB) e Bovimix[®] (BM) bem como avaliar o efeito de diferentes protocolos de criopreservação sobre a viabilidade espermática do sêmen bovino pós-

descongelação. Foram utilizados quatro ejaculados de cinco reprodutores bovinos, previamente selecionados. Os ejaculados foram diluídos e envasados, e em seguida congelados em oito protocolos diferentes: Protocolo I – BB 1h geladeira e 3cm do nitrogênio; Protocolo II – BB 1h geladeira e 6cm do nitrogênio; Protocolo III – BB 3h geladeira e 3cm do nitrogênio; Protocolo IV – BB 3h geladeira e 6cm do nitrogênio; Protocolo V – BM 1h geladeira e 3cm do nitrogênio; Protocolo VI – BM 1h geladeira e 6cm do nitrogênio; Protocolo VII – BM 3h geladeira e 3cm do nitrogênio; Protocolo VIII – BM 3h geladeira e 6cm do nitrogênio. As amostras foram descongeladas a 37°C por 30 segundos e em seguida (T0) foi avaliado a motilidade total (%), motilidade progressiva (%) e vigor (0-5). As análises foram repetidas após 1 hora (T1) de descongelação. Os resultados demonstraram que os diluentes e os protocolos testados não influenciaram a viabilidade espermática após a descongelação, entretanto, foi observado um efeito animal na congelabilidade do sêmen.

Palavras-chave: criopreservação, protocolos, sêmen, touro.

Evaluation of two diluents and different techniques of cryopreservation of bovine semen

Abstract

The objective of the work was compare two commercial diluents of cryopreservation, Botu-bov® (BB) and Bovimix® (BM) and evaluate the effect of different protocols of cryopreservation on the spermatic viability of the bovine semen after-defrosting. Were used four ejaculates of five bovine reproducers, previously selected. The ejaculates were diluted and envased, and after that congealed in eight different protocols: Protocol I - BB 1h refrigerator and 3cm of nitrogen; Protocol II - BB 1h refrigerator and 6cm of nitrogen; Protocol III - BB 3h refrigerator and 3cm of nitrogen; Protocol IV - BB 3h refrigerator and 6cm of nitrogen; Protocol V - BM 1h refrigerator and 3cm of nitrogen; Protocol VI - BM 1h refrigerator and 6cm of nitrogen; Protocol VII - BM 3h refrigerator and 3cm of nitrogen; Protocol VIII - BM 3h refrigerator

and 6cm of nitrogen. The samples were defrosted at 37°C per 30 seconds and after (T0) was evaluated the total motility (%), progressive motility (%) and vigor (0-5). The analyses were repeated after 1 hour (T1) of defrosting. The results demonstrated that the tested diluents and protocols not influenced the spermatic viability after the defrosting, however, were observed an animal effect in the congelability of the semen.

Keywords: cryopreservation, protocols, semen, bull.

1 INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen é uma tecnologia de grande impacto na indústria agropecuária, principalmente na bovinocultura. Com os avanços da biotecnologia da reprodução animal, a utilização de sêmen criopreservado na inseminação artificial se destaca como importante ferramenta para o melhoramento genético de várias espécies animais. Entretanto, o impacto genético na indústria de inseminação artificial é limitado pelo processo de criopreservação, que danifica as organelas e membranas dos espermatozoides diminuindo a viabilidade espermática, induzindo também mudanças na capacitação espermática, integridade da membrana, potencial da membrana e reação acrossomal (GARNER et al., 2001).

O desenvolvimento de novas técnicas de criopreservação de sêmen possibilitou a obtenção de amostras de sêmen de melhor qualidade e também o desenvolvimento de técnicas de inseminação artificial, as quais permitem a deposição intra-uterina do sêmen, e impulsionaram a aplicação do sêmen congelado em programas de inseminação artificial em bovinos.

A inseminação artificial é a biotécnica mais difundida e importante para o melhoramento genético, pois através dela, um grande número de fêmeas podem ser inseminadas com sêmen de um reprodutor de alto valor genético, possibilitando elevar, a curto prazo a qualidade genética do rebanho.

A utilização do sêmen bovino congelado na inseminação artificial tem uma grande importância, devido a esta técnica garantir o aumento significativo

na qualidade genética do rebanho, desde que seja usada adequadamente, diminuindo desta forma a disseminação de doenças.

A criopreservação de sêmen permite o armazenamento de sêmen de animais que adquiriram problemas reprodutivos, ou que já morreram, além de viabilizar a utilização de sêmen criopreservado em outras biotécnicas da reprodução. O sêmen congelado preserva-se por longo período mantido em nitrogênio líquido e permite a utilização do sêmen de animais geneticamente superiores que se encontram em outros países.

Todavia, pode se dizer que a IA é embasada na criopreservação do sêmen, visando à manutenção da qualidade e fertilidade dos ejaculados após o processamento, estocagem e inseminação. Para isso, a tecnologia da criopreservação vem se aprimorando, buscando novas técnicas e diluidores, na tentativa de minimizar a perda de células viáveis durante estes processos.

Até o momento, não existem métodos de criopreservação e técnicas de inseminação simples, capazes de proporcionar porcentagens de prenhez semelhantes àsquelas encontradas com a monta natural. Portanto, é de suma importância o desenvolvimento de pesquisas que busquem métodos mais eficazes de criopreservação, visando à produção de amostras de sêmen de excelente qualidade, as quais permitiriam a obtenção de bons índices de fertilidade.

A congelação de sêmen serve como banco de reserva genética para animais de alto padrão racial e comercial, propicia maior intercâmbio entre criatórios das mais variadas regiões e países e seleciona indivíduos e linhagens quanto à fertilidade e congelabilidade.

O diluente e o crioprotetor são utilizados com o intuito de proteger os espermatozóides dos choques térmicos e osmóticos que ocorrem durante o processo de congelação/descongelação, pois podem causar danos irreversíveis aos espermatozóides, devido à formação de cristais de gelo intracelular, que afetam a estrutura físico-química da célula causando danos, principalmente à membrana do espermatozóide. O DNA também pode ser afetado, devido à toxicidade do crioprotetor e estresse osmótico, levando a uma redução na

motilidade progressiva e o metabolismo para produção de energia (WATSON, 2000).

O sucesso da criopreservação de sêmen depende da manutenção do potencial fertilizante do espermatozóide, onde deve apresentar integridade e funcionalidade das estruturas celulares. Contudo, o espermatozóide se torna infértil quando um dos seus fatores morfológicos é afetado.

Vários diluentes vêm sendo utilizados e testados *in vitro* e *in vivo* onde se procura, principalmente, a durabilidade e qualidade dos espermatozóides, tentando-se viabilizar ao máximo o material genético do animal.

Para um meio diluente ser considerado completo e eficiente algumas substâncias são necessárias na sua composição como as iônicas e as não iônicas, lipoproteínas, gema de ovo ou leite, glicerol, propanediol, ou dimetilsufoxido (DMSO), agentes intracelulares, glicose ou frutose como fonte de energia e outros aditivos como enzimas e antibióticos (VISHWANATH & SHANNON, 2000).

Apesar de existir uma grande variedade de diluidores para congelação de sêmen bovino, persiste a necessidade de aperfeiçoamento dos protocolos de criopreservação de sêmen. O desenvolvimento de novas técnicas possibilita a obtenção de amostras de sêmen de melhor qualidade impulsionando a aplicação do sêmen congelado em programas de inseminação artificial em bovinos.

A melhoria nas condições de manejo, alimentação e sistemas de criação de bovinos, assim como a exigência de maior produtividade animal tem exigido à crescente necessidade de utilização da inseminação artificial (IA). Esta foi a primeira biotécnica utilizada comercialmente trazendo grande impacto no sistema de produção animal. Dentre inúmeras vantagens de sua aplicação, podemos citar a facilidade de comercialização e transporte, controle de doenças sexualmente transmissíveis e, principalmente, o expressivo ganho genético. Desse modo, a qualidade do sêmen congelado/descongelado é um dos fatores que podem influir sobre o índice de fertilidade de fêmeas bovinas submetidas à inseminação artificial.

Nesse contexto o objetivo da pesquisa foi comparar dois diluentes comerciais de criopreservação, Botu-Bovi[®] (Biotech Ltda, Botucatu-SP), e Bovimix[®] (Nutricell Ltda, Campinas-SP), e avaliar o efeito de diferentes protocolos de criopreservação sobre a viabilidade espermática do sêmen bovino pós-descongelação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características do Espermatozóide e do Sêmen

Os espermatozóides originam-se dos testículos a partir de células primordiais da linhagem espermatogênica localizadas nos túbulos seminíferos, num processo denominado espermatogênese onde tem duração em bovinos em média de 60 dias. Do ponto de vista biológico, os espermatozóides cumprem funções por meio da cauda (motilidade), acrossoma (atividade enzimática preparatória da fecundação) e núcleo (transmissão do patrimônio genético) (MIES FILHO, 1987).

O espermatozóide é uma célula altamente polarizada e especializada. Esse gameta perde a habilidade de biossíntese, reparo, crescimento e divisão celular durante a fase final da espermatogênese. Contudo, a conservação dos espermatozóides requer uma redução ou atraso do metabolismo das células espermáticas para gerar um prolongamento de sua vida (YOSHIDA, 2000).

A característica principal da cabeça do espermatozóide é o núcleo achatado de forma oval, contendo a cromatina altamente compacta. A extremidade anterior do núcleo espermático é recoberta pelo acrossoma, uma fina cobertura com dupla camada de membranas que envolve intimamente o núcleo durante os últimos estágios de formação dos espermatozóides.

A cauda do gameta masculino é composta pelo colo, peça intermediária principal e terminal. A região da cauda entre o colo e o annulus é a peça intermediária. A parte central da peça intermediária junto com o comprimento total da cauda forma o axonema, onde ocorre a transformação de energia química em mecânica. Contudo esse conjunto é recoberto externamente por

varias mitocôndrias dispostas em forma de hélice, que geram a energia necessária para a motilidade espermática (BEDFORD & HOSKINS, 1990).

Os espermatozóides podem ser divididos em duas estruturas distintas: cabeça e a cauda. A cabeça, cuja forma, tamanho e estrutura variam enormemente entre as espécies, possui duas maiores regiões: acrossomal e a pós-acrossomal (SIQUEIRA, 2004).

Sendo o acrossoma ou capa acrossomal uma estrutura de dupla camada de membranas que envolvem intimamente o núcleo, situada entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo. Contem glicoproteínas secretadas pelo retículo endoplasmático e complexo de golgi, que são enzimas responsáveis pela penetração dos espermatozóides no ovócito (SIQUEIRA, 2004).

A membrana plasmática é responsável por envolver todo o espermatozóide e é o componente mais externo. Embora seja contínua sobre a superfície dos espermatozóides, existem algumas diferenças (FLESH & GADELLA, 2000). A membrana plasmática é composta por camadas lipídicas contendo fosfolipídeos, colesterol, glicolipídeos, e diferentes tipos de proteínas (ALBERTS et al., 1997).

As membranas exercem um papel fundamental na manutenção da capacidade fertilizante do espermatozóide. A membrana plasmática é responsável pela manutenção do equilíbrio osmótico, atuando como uma barreira entre o meio intra e extracelular. Lesões nessa estrutura podem levar a perda da homeostase celular, levando à morte celular (FLESH & GADELLA, 2000).

Três partes principais de lipídeos fazem parte das membranas: fosfolipídeos, glicolipídeos e colesterol, sendo que dentre estes, os fosfolipídios são os mais abundantes (ALBERTS et al., 1997). Sendo o colesterol o principal esterol presente nos espermatozóides e nas membranas celulares dos mamíferos, possuindo importante papel de modular a fluidez e a estabilidade da bicamada lipídica através da sua interação estérica com os fosfolipídios de membrana (PARKS, 1997). Em geral, quanto maior a quantidade de colesterol

presente, menos flexível, e/ou menos fluida é a porção da membrana (AMANN & PICKETT, 1987). A resistência ao choque pelo frio é maior nas espécies em que a proporção colesterol: fosfolipídios da membrana plasmática são altos (VALLE & SILVA FILHO, 2001).

A membrana plasmática apresenta cerca de 50% de sua massa constituída por proteínas. Portanto, a parte exterior da célula consiste em grande parte de carboidratos, que formam uma cobertura celular, exercendo função primordial na interação entre a célula e o ovócito (ALBERTS et al., 1997).

Em tratando da estocagem dos espermatozoides para uso em qualquer biotecnologia aplicada à reprodução, é mais relevante considerá-los como constituídos de núcleos e microtúbulos altamente condensados, fibras e estruturas membranosas, devido à resposta diferenciada destes componentes estruturais ao choque térmico, redução de temperatura ou criopreservação (MAGNAGO, 2000).

O sêmen é caracterizado por ser um líquido bem denso, com aspecto cremoso, ligeiramente amarelado e/ou esbranquiçado, sendo que a sua densidade depende da concentração, quando a concentração for menor, terá um aspecto mais líquido. O volume varia entre as diversas espécies e dentro de uma mesma espécie, devido à estação do ano, clima, hora, período de repouso sexual do animal e método de colheita, sendo por vagina artificial e/ou eletroejaculador (ANJOS, 2006).

Fonseca (1999) relata que dentre os aspectos físicos do sêmen, a motilidade espermática progressiva e o vigor espermático são as características mais avaliadas para predizer a qualidade seminal a campo. Segundo o autor, estes parâmetros são de grande importância e pode revelar, por si só, a existência de distúrbios bioquímicos no sêmen, associados ou não com alterações da espermiogênese. Entretanto, Stalhammar et al. (1994), ressaltaram as limitações da análise isolada da motilidade espermática progressiva como critério único de avaliação de sêmen bovino.

A avaliação do sêmen é uma avaliação simples, porém com um alto grau de importância. Alguns parâmetros são utilizados como padrão no mundo inteiro onde se considera normal o ejaculado de um bovino. Com isso, para se considerar um touro fértil, ele deve possuir algumas características como aproximadamente 500 milhões de espermatozoides por mililitro, acima de 50% de espermatozoides móveis com motilidade retilínea e mais de 80% de espermatozoides com morfologia normal (ANJOS, 2006).

Barth & Oko (1989) citaram a importância da morfologia espermática na indicação do estágio de normalidade da motilidade espermática progressiva e da produção espermática. Segundo os autores, a qualidade do sêmen por meio do estudo da morfologia das células espermáticas reflete a saúde dos túbulos seminíferos, epidídimos e glândulas anexas.

Os aspectos físicos do sêmen, rotineiramente examinados para avaliação da capacidade reprodutiva do touro, são a motilidade total, progressiva, o vigor espermático e o turbilhonamento. Os primeiros são as medidas mais antigas usadas para prever a qualidade seminal em condições de fazenda. São muito importantes e pode revelar, por si só, a existência de distúrbios bioquímicos no sêmen, associados ou não com alterações da espermatogênese (MARQUES, 2006).

O turbilhonamento é utilizado em substituição à concentração espermática, uma vez que é a associação da motilidade, do vigor e da concentração. Além do mais facilita a interpretação, pois, a exemplo dos exames em campo, o método de colheita do sêmen é o da eletroejaculação, e pode premiar alguns touros em detrimento de outros, pela facilidade ou dificuldade intrínseca de cada um na emissão do sêmen, mais também pela habilidade do técnico que pode retirar mais sêmen de uns e menos de outros. Contudo o volume do ejaculado é um importante componente na determinação final do total dos espermatozoides (MARQUES, 2006).

A motilidade progressiva é considerada um dos mais importantes aspectos físicos do sêmen em todas as espécies. A motilidade é dada em

porcentagem e significa o número de espermatozóides com motilidade progressiva em cada 100 deles observados (AX, 2004).

O vigor representa a intensidade de movimentação dos espermatozóides e é classificado numa escala de 0 a 5. O vigor está diretamente correlacionado com a motilidade. Normalmente, quando se tem uma motilidade baixa, o vigor está baixo também. No Brasil, o vigor apresentado pelos espermatozóides de touros de raças zebuínas varia entre as estações, sendo maior no inverno ou na estação seca (ANCHIETA et al., 2005).

A avaliação morfológica do sêmen é de grande importância sendo essencial para se avaliar a qualidade do sêmen de determinado animal. Na análise morfológica do sêmen observa-se os defeitos maiores e menores individuais de cada espermatozóide obtendo-se uma proporção que é bem aceita para se poder utilizar o sêmen sem que ocorram perdas significantes. Entretanto, o espermatozóide normal possui três regiões que são as principais na morfologia: a cabeça, a peça intermediária e a cauda, as quais devem estar em bom estado para a fertilização (ANJOS, 2006).

As anormalidades nos espermatozóides podem ser primárias, secundárias ou terciárias. Dos defeitos que são considerados maiores estão às alterações de acrossoma, espermatozóide subdesenvolvido, cabeça isolada patológica, cabeça estreita na base, cabeça piriforme, cabeça pequena anormal, cabeça com *pouch formation*, cauda enrolada, e entre outros. Entretanto, os defeitos considerados menores são o acrossoma desprendido, gota citoplasmática distal, cabeça delgada, cabeça pequena normal, cabeças gigantes, curtas e largas, cabeça isolada normal (AX, 2004).

Dessa forma, é um problema para as indústrias de inseminação artificial, nos animais de produção a diferença encontrada na fertilidade sem que ocorra maior diferença na motilidade e morfologia espermática, e bastante encontrada exceto nos casos mais severos (FAZELI et al., 1997). Tal fato assume grande importância uma vez que, na maioria dos casos, os touros doadores de sêmen têm sido selecionados com base nas características físicas e morfológicas do sêmen (SILVA, 2000).

2.2 Criopreservação de Sêmen

A criopreservação do sêmen bovino teve grandes avanços na década de 40, após a descoberta da função crioprotetora do glicerol, a partir daí o sêmen de uma grande variedade de espécies vem sendo congelado e usado com sucesso na inseminação artificial (POLGE, 1985). Entretanto, mesmo com as melhores técnicas atuais de preservação, obtém-se, em média, 50% de viabilidade da população espermática (Watson, 1995), dependendo de fatores como, qualidade do ejaculado, métodos de congelamento, tipo de diluidor, tipo de envasamento (mini-palheta, palheta média, ampola, pellets) e métodos de congelamento (OHASHI, 2001).

A criopreservação de sêmen trouxe muitos benefícios para a reprodução, permitindo o maior aproveitamento de animais com alto potencial genético e produtivo, o transporte do sêmen a longas distâncias e formação de bancos de germoplasma, tanto de animais em risco de extinção, como daqueles que não podem ser utilizados na reprodução por razões temporárias ou permanentes (BERTOZOO & ZÚCCARI, 2008).

Somente o plasma seminal não é capaz de proteger adequadamente os espermatozóides contra mudanças de temperaturas. Para que o sêmen seja estocado em baixas temperaturas é necessário que sejam diluídos em diluidores especiais e apropriados (SALAMON & MAXWELL, 1995).

Na criopreservação o aspecto mais importante é a necessidade de remover o máximo possível de água das células antes de se proceder a sua congelamento. Não ocorrendo a desidratação, grandes cristais de gelo se formarão lesando a estrutura intracelular, e freqüentemente, morte celular (MUNAR, 1988).

Visando minimizar os efeitos deletérios ocasionados pela criopreservação é necessário controlar a taxa de resfriamento e utilizar diluente contendo lipídeos (gema de ovo). Se o resfriamento for feito de maneira inadequada, o espermatozóide sofre o choque-frio, o qual induz a danos irreversíveis ao espermatozóide que se caracterizam por alterações nos padrões de motilidade,

queda do metabolismo e danos na membrana plasmática e no acrossoma. (GRAHAM, 1996).

A célula espermática parece ser sensível ao estresse osmótico como também a adição e a remoção de crioprotetores. Moran (1992) acredita que o sêmen refrigerado, desde a temperatura corpórea até a temperatura ambiente, parece não apresentar danos ao espermatozóide quando este se encontra diluído em meio adequado. O impacto genético na indústria de inseminação artificial (IA) é limitado pelo processo de criopreservação que danifica as organelas e membranas do espermatozóide, induzindo também mudanças na capacitação espermática e reação acrossomal (GARNER et al., 2001). Conseqüentemente o intuito dos protocolos de congelação visam minimizar esses efeitos deletérios aos espermatozoides (KUMAR et al., 2003).

A criopreservação eleva os níveis intracelulares de cálcio, suspende o metabolismo espermático e a manutenção de suas características por um período de tempo prolongado (WATSON, 2000). Conseqüentemente, a reação acrossomal em espermatozoides provenientes de sêmen congelado/descongelado pode ser realizada em menor tempo que o necessário para sua indução *in natura* nos órgãos genitais da fêmea (O'FLAHERTY et al., 1999).

O sêmen congelado apresenta uma fertilidade significativamente reduzida quando comparado ao semen fresco (WATSON, 2000), devido ao processo de criopreservação, que compreende diluição, resfriamento, adição e penetração do crioprotetor, envase, congelação, armazenamento e descongelação, a célula espermática também passa por uma série de estresses térmico, osmótico e tóxico, além de rápidas alterações de volume celular que causam danos à membrana plasmática (GIRAUD et al., 2000). Sendo esses danos o aumento de volume, rupturas, perda da permeabilidade seletiva, alterações no arranjo e na composição dos fosfolipídios e proteínas, na atividade enzimática e na fluidez da membrana que conseqüentemente diminui a viabilidade espermática (CORMIER et al., 1997).

A célula espermática possui poucas organelas e apresenta características complexas, que devem encontrar-se dentro da normalidade para que o oócito possa ser fecundado (GRAHAM, 2001). Entretanto, um desses atributos é a fluidez da membrana, que é influenciada pela sua composição lipídica, pelo grau de cadeias de ácidos graxos, pelo conteúdo de colesterol e pela relação colesterol:fosfolipídios. Uma alta fluidez da membrana confere ao espermatozóide maior crio-resistência, ao contrário do enrijecimento, que provoca alterações na permeabilidade e na fragilidade em relação ao estresse osmótico (GIRAUD et al., 2000).

Quando a célula é resfriada abaixo de 0°C, cristais de gelo extracelulares são formados, resultando em uma concentração de solutos no líquido remanescente. A facilidade de transporte de água dentro da célula depende da permeabilidade da membrana espermática a qualquer temperatura, determinada pela proporção superfície-volume e pelo índice de congelação. Se a célula for suficientemente permeável à água e os índices de congelação forem suficientemente baixos, a pressão da célula permanece pequena, ocorrendo o aumento da concentração de solutos ao redor dos espermatozóides alternando o gradiente osmótico, resultando em desidratação à medida que a água saia da célula para se congelar no meio extracelular, não sendo capazes de romper a membrana plasmática (JASKO, 1994).

Os efeitos críticos causados a célula são: a adição de proteínas seminais que estimulam a motilidade no momento da colheita e diluição do sêmen; o estresse osmótico que ocorre com a adição de substâncias como leite, gema de ovo e o glicerol; as mudanças na membrana que ocorrem durante a refrigeração a 5°C; as mudanças osmóticas que ocorrem durante a congelação, as condições da estocagem em nitrogênio líquido e as mudanças osmóticas que acontecem no processo de descongelação e da remoção ou não do glicerol antes da inseminação artificial (GRAHAM, 1996).

É durante o período de resfriamento que os espermatozóides interagem com os componentes dos diluentes como, gema de ovo e leite e adquirem

resistência ao choque térmico e a criopreservação (WATSON, 1995), sendo este o principal entrave do congelamento.

A célula espermática não está adaptada para passar pelas variações de temperatura envolvidas no processo de criopreservação (HOLT, 2000a). Pois, ocorrem alterações na motilidade e na estrutura dos espermatozóides nas etapas de congelamento e descongelamento. Quando o resfriamento do sêmen é realizado muito rápido entre 30°C e 0°C induz a estresse letal para algumas células que é proporcional a taxa de resfriamento e ao limite de temperatura. Este fenômeno é denominado choque frio, a qual afeta os espermatozóides de várias espécies (GONZALEZ, 2004).

Entretanto a curva de resfriamento rápida imposta ao sêmen é responsável pela maioria das lesões celulares, em decorrência da alteração das propriedades físicas das membranas espermáticas (WATSON, 1981). O choque térmico, que ocorre durante a fase de transição (entre 20°C e 1°C), caracteriza-se pela passagem da membrana plasmática do estágio líquido para o estágio cristalino (gel), e causa mudanças irreversíveis à membrana plasmática dos espermatozóides, devido à ruptura e perdas celulares (HOLT, 2000b).

As crioinjúrias relacionadas com a formação de cristais de gelo, variam de acordo com a taxa de congelamento. O processo de desidratação acompanhado por um processo de congelamento lento esta potencialmente associada à sobrevivência celular, enquanto que o congelamento a taxas rápidas, a probabilidade de morte celular é maior. Onde os protocolos de criopreservação têm utilizado taxas de congelamento variando entre 10 a 100°C/min, obtendo-se boas taxas de sobrevivência pós-criopreservação (AGCA & CRITSER, 2002).

Um dos aspectos das teorias da crioinjúria é a questão se a lesão na célula ocorre durante o congelamento ou descongelamento. Algumas evidencias sugerem que as células criopreservadas podem ser lesadas pelo descongelamento, devido a recristalização (WATSON, 1995). A recristalização é um fenômeno que ocorre durante o descongelamento, devido à

reorganização intracelular de microcristais para cristais maiores onde são lesivos a célula espermática.

É de extrema importância a velocidade da curva de congelamento, onde se esta for muito rápida, não a tempo de ocorrer à desidratação dos espermatozoides, o que causa a formação de gelo intracelular, que é prejudicial à célula. Já a curva de congelamento lenta haverá a desidratação dos espermatozoides impedindo a formação de gelo intracelular, mas a concentração de solutos também pode causar danos à célula (WATSON, 1995).

O resfriamento das palhetas, em suporte de 4°C ou 5°C deve ser realizado sob ótimas condições já que a maioria dos espermatozoides dos mamíferos são sensíveis a um resfriamento rápido (JANUSKAUSKAS, 1999). Onde essas taxas de resfriamento têm sido testadas nos espermatozoides bovinos tentando determinar a curva de ideal de resfriamento (GONZALEZ, 2004).

Quando o sêmen diluído é resfriado abaixo da temperatura de 5°C, inicialmente o meio diluidor ao redor do espermatozoide, e as próprias células, encontram-se não congeladas, porque os pontos de congelamento dos diluidores devido aos crioprotetores e do líquido intracelular estão abaixo de 0°C. Ocorre então um fenômeno chamado de super-resfriamento. Dependendo da curva de congelamento e do diluidor, entre a temperatura de 5°C e 15°C começa a se formar cristais de gelo no diluente, enquanto os espermatozoides permanecem super-resfriados. Ocorrendo o aumento na concentração de solutos ao redor dos espermatozoides junto com a desidratação das células (SNOECK, 2003).

Os danos causados a membrana plasmática durante o congelamento, também ocorre no processo de aquecimento da célula após a descongelação, onde a membrana passa por uma reorganização estrutural envolvendo proteínas e lipídios e a passagem rápida de água para o interior da célula pode causar rompimento das membranas. Portanto, a fase de descongelação é tão importante quanto à congelação para a integridade das células espermáticas (HOLT, 2000). Sendo o protocolo de descongelação preconizado para bovinos e

de 35° C por no mínimo 30 segundos de acordo com – Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA).

Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de desenvolver um meio em que o mínimo de espermatozóides seja perdido durante o processo de criopreservação e que atenda todas as qualidades como: permitir a preservação da motilidade, a integridade da membrana plasmática dos espermatozóides, estabilizar o pH, proteger os mesmos contra o choque térmico, e ainda inibir o crescimento bacteriano (ENGLAND, 1993).

Há vários anos uma gama de substâncias tem sido utilizada visando fornecer proteção adequada às células espermáticas durante a criopreservação diminuindo os efeitos deletérios. Keith (1998) relata a existência de uma divisão básica que agrega os crioprotetores em penetrantes e não penetrantes.

Na composição lipídica da membrana plasmática existem algumas diferenças entre as espécies, raças e ainda entre indivíduos da mesma espécie, o que pode explicar o maior ou menor efeito protetor de um diluidor aos espermatozóides (HOLT, 2000b), sendo que aqueles animais cujo sêmen tolera os efeitos da criopreservação são denominados de bons congeladores (WATSON, 2000).

As soluções de congelação são compostas por um diluidor e um crioprotetor intracelular, que possuem a função de prevenir as crioinjúrias dos espermatozóides durante os procedimentos de congelamento e de descongelamento, além de manter os espermatozóides imóveis durante o armazenamento. Alguns diluidores podem ser soluções simples à base de glicose, ou soluções mais complexas numa combinação de vários sais e açúcares, (VIVEIROS & GODINHO, 2009).

Os crioprotetores são substâncias capazes de promover a sobrevivência celular durante o resfriamento mantendo ao máximo a viabilidade espermática, e são classificados como: intracelulares e extracelulares (AMANN & PICKETT, 1987). Os crioprotetores intracelulares, caracterizam-se por atravessarem a membrana plasmática e atuarem no meio intracelular. Entre os crioprotetores extracelular, estão: o glicerol, etilenoglicol, acetamida, dimetilsulfóxido. Os

crioprotetores extracelulares não atravessam as membranas plasmáticas, sendo formado por grandes moléculas como as proteínas presentes no leite e gema de ovo, açúcares como lactose entre outros (PICKETT & AMANN, 1993).

Os crioprotetores extracelulares protegem as células através de mecanismos osmóticos, promovendo um meio hipertônico que induz a saída de água das células, levando a desidratação do espermatozóide, reduzindo a probabilidade de formação de cristais de gelo no interior da célula (AMANN & PICKETT, 1987).

Os crioprotetores devem ser substâncias de baixo peso molecular e baixa toxicidade para as células. Adequadas soluções crioprotetoras, taxas de congelamento e descongelamento ótimas, visam manter ao máximo a viabilidade espermática (VIVEIROS, 2005). Embora a utilização dos diluidores em concentrações elevadas todos os crioprotetores se tornam tóxicos para as células (FAHY, 1986).

A estrutura molecular é um parâmetro importante para determinar a eficiência dos crioprotetores, pois possuem afinidade pela água devido à presença de grupamentos amina e hidroxila na composição, os quais favorecem a formação de pontes de hidrogênio com as moléculas de água (BAUDOT et al., 2002). Segundo Dalimata & Graham (1997), estas ligações alteram a orientação das moléculas de água dos cristais de gelo criando um ambiente menos prejudicial às células

O processo de criopreservação causa estresse físico e químico alterando a membrana dos espermatozóides, também diminuindo irreversivelmente a motilidade espermática, aumento da degeneração do DNA e liberação intracelular de enzimas, lipídeos e proteínas (BRANDÃO, 2006).

Os crioprotetores mesmo sendo essenciais para sobrevivência dos espermatozóides no processo da congelação exercem efeitos tóxicos e diminuem as taxas de fertilidade quando presentes em altas concentrações (ROSSI et al., 2003).

Esta sendo bastante pesquisado diferentes concentrações de glicerol e diversas condições de resfriamento que são estabelecidas para uma melhor

criopreservação de sêmen de touros. Entretanto, a fim de melhorar a criopreservação dos espermatozóides, deve-se ter uma maior compreensão das propriedades das células, incluindo sua concentração osmótica, seus limites de tolerância e resposta a adição e remoção dos crioprotetores (GUTHRIE, 2002). Além de características celulares, outras características devem ser consideradas como a osmolaridade da célula, volume da célula, células osmoticamente ativas e entre outros. Sendo que em muitos anos de criopreservação de sêmen de touros, essas propriedades não têm sido rigorosamente investigadas visando melhor viabilidade espermática (GUTHRIE, 2002).

Durante o processo de criopreservação visando menores prejuízos a viabilidade espermática, o sêmen deve ser resfriado da temperatura corpórea (37°C) à temperatura ambiente (20°C), o que parece não causar danos às células quando estas estiverem diluídas em meio adequado (KEITH, 1998). O principal estresse causado aos espermatozóides é a passagem da temperatura ambiente para 5°C (SQUIRES et al., 1999). Isto devido à fase de transição da membrana plasmática do estado líquido cristalino para a fase de gel (GRAHAM, 1996). Entretanto este efeito pode ser minimizado se controlar a taxa de resfriamento entre as temperaturas 19°C e 8°C e pela adição de lipídeos e lipoproteínas ao diluente visando maior proteção a membrana da célula (GRAHAM, 1996), além do uso adequado de curvas de resfriamento lentas (-0,05°C/min), já que se esta for feita de forma inadequada os espermatozóides sofrerão alterações nos padrões normais de motilidade, danos em seu metabolismo, da membrana plasmática e do acrossoma (SQUIRES et al., 1999).

A perda de água e a desidratação são eventos desejáveis, pois reduzem a probabilidade de se formarem grandes cristais de gelo dentro da célula que causariam danos às estruturas internas e/ou da membrana plasmática (SQUIRES et al., 1999).

As temperaturas de aquecimento dependem diretamente da velocidade da curva de congelamento. Se a congelamento for lenta, a descongelamento também

deve ser lenta permitindo assim a fusão dos cristais de gelo extracelulares. A descongelação dos cristais provoca diluição dos solutos e ocorre lentamente a reidratação das células. Se o sêmen for descongelado rapidamente os cristais de gelo extracelulares descongelam-se muito rapidamente e a água invade bruscamente as células, causando ingurgitamento e danos à membrana plasmática (HOLT, 2000).

O principal entrave do sucesso da congelação do sêmen é o período de resfriamento em que os espermatozóides interagem com os componentes da gema do ovo constituída nos diluentes e adquirem resistência ao choque térmico e à criopreservação (WATSON, 1995). Sendo que as mudanças irreversíveis à membrana plasmática dos espermatozóides ocorrem de maneira geral entre 20°C e 5°C (QUINN et al., 1980).

A qualidade do sêmen após os processos de congelamento e de descongelamento depende do tipo e da concentração do crioprotetor intracelular, da sua combinação com diferentes diluidores e da taxa de diluição utilizada (VIVEIROS et al., 2009).

O colesterol é um esteróide que compõe a membrana plasmática e tem papel importante na capacitação espermática, devido ao efluxo de colesterol da membrana com diminuição da relação colesterol:fosfolípidios, desencadeia uma série de reações que resultam na capacitação. A adição do colesterol ao espermatozóide parece ser benéfica, pois aumenta a relação colesterol:fosfolípido, conseqüentemente, conferindo às células maior resistência aos danos que o processo de criopreservação pode provocar (TRAVIS & KOPF, 2002)

Estudos adicionais com espermatozóides de bovinos mostraram que as proteínas e lipídeos presentes na gema de ovo e leite mantêm a sobrevivência espermática durante a criopreservação (AIRES et al., 2003).

A composição dos diluidores de congelação de sêmen pode afetar os resultados do processo de criopreservação. A proteção das células durante a fase de desidratação que ocorre no momento da congelação com o

impedimento da fusão de partículas intramembranas depende das substâncias que compõem o diluidor (CROWE et al., 1987).

Alguns diluidores são mais utilizados dependendo da espécie, onde a maioria possui varias concentrações de gema de ovo, glicerol, açúcares e entre outros. Snoeck, (2007) testou o efeito de diferentes diluentes sobre a viabilidade espermática de sêmen eqüino, e observaram que diluidores com maior osmolaridade tenderam a preservar melhor a viabilidade espermática do sêmen congelado com etilenoglicol ou acetamida.

Diferentes tipos de crioprotetores, vem sendo testados na composição dos diluentes com o objetivo de minimizar cada vez mais os efeitos deletérios da criopreservação, onde usualmente contém gema de ovo, leite em pó, açúcares, tampões, glicerol e entre outros. Lipídeos, lipoproteínas e outros aditivos que previne o "choque frio" e defeitos de refrigeração durante a criopreservação também têm sido adicionado (BRANDÃO, 2006).

Os sistemas tampões são um dos constituintes dos diluidores, com o objetivo que os íons de hidrogênio produzidos pelo metabolismo dos espermatozóides sejam neutralizados, fazendo com que o pH da solução seja mantido próximo à neutralidade (6,8 a 7,1), pH ótimo para os espermatozóides (BORGES, 2003).

Os açúcares são adicionados ao meio diluidor como substratos exógenos de energia, além de componentes osmóticos, Sendo os espermatozóides capazes de metabolizar glicose, frutose e entre outros. Os antibióticos também são acrescentados ao meio diluidor prevenindo contaminações das amostras de sêmen, principalmente, durante a manipulação do mesmo. Os antibióticos comumente utilizados são a penicilina e a estreptomicina que são determinantes na contagem de microorganismos (BORGES, 2003).

A gema de ovo é composta por fosfolipídios, que possuem ação protetora sobre membranas celulares. Devido a uma interação dos fosfolipídios com os constituintes das membranas espermáticas, por meio da ocupação por parte desses lipídios, em sítios específicos da superfície das membranas. Entretanto, tem sido acrescentada aos meios diluidores de várias espécies, com intuito de

conferir maior proteção às membranas dos espermatozóides, durante o processamento do sêmen, no intuito de prevenir as lesões primárias associadas ao choque térmico, principalmente aquelas que alteram a permeabilidade da membrana. Onde a gema de ovo é o agente mais efetivo para proteção do espermatozóide contra o choque frio e melhora as funções espermáticas e preserva a fertilidade após o armazenamento na forma líquida ou congelada (WATSON, 1995).

O diluente Botu-bov[®] e Bovimix[®] vêm sendo utilizado com sucesso nos processos de congelação e criopreservação. No entanto estudos mais detalhados são necessários para o aperfeiçoamento dos protocolos de criopreservação com o intuito de minimizar os efeitos deletérios aos espermatozóides, possibilitando ao produtor possuir um sêmen de melhor qualidade para utilizar em programas de I.A.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As colheitas de sêmen dos touros foram realizadas no período de 15 de fevereiro a 15 de abril de 2010 em animais oriundos de uma propriedade no município de Rio Verde - GO, em que os mesmos foram selecionados por meio de exame andrológico, sendo mantidos sob mesmas condições de manejo, em pastagem de brachiaria brizantha cv. Xaraés (MG5), com água e sal mineral *Ad libitum*.

Foram utilizados cinco touros da raça Nelore de quatro a oito anos de idade, sendo realizadas quatro colheitas de cada animal, através de eletroejaculador. Antes das colheitas o prepúcio era higienizado evitando contaminação das amostras, para criopreservação dos ejaculados em oito protocolos diferentes.

Imediatamente após a colheita avaliou-se a motilidade total (MT-%), motilidade progressiva (MP-%) e vigor espermático (V- 0 a 5), através de uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37°C por meio de microscopia óptica.

O ejaculado era dividido em duas partes, sendo uma parte diluída com meio Botu-bovi[®] (Biotech Botucatu Ltda., Botucatu-SP), e a outra parte diluída com meio Bovimix[®] (Nutricell Ltda., Campinas-SP).

Após a diluição e homogeneização das amostras, as mesmas eram envasadas em palhetas de 0,5 mL, previamente identificadas com o protocolo de criopreservação utilizado. Para refrigeração as palhetas eram colocadas em uma bandeja de tela de arame a qual era mantida em geladeira a 5°C por uma ou três horas, dependendo do protocolo testado.

Após a refrigeração foi colocado nitrogênio em uma caixa de isopor de 45 litros e um suporte que mantinha a bandeja com as palhetas à distância do nitrogênio conforme os protocolos, sendo 3 cm de distância do nitrogênio e 6 cm de distância do nitrogênio, onde deixava-se por 15 minutos com a caixa totalmente tampada. Após serem mantidas por 15 minutos no vapor de nitrogênio as palhetas de todos os protocolos foram mergulhadas no nitrogênio e raqueadas para serem armazenadas em botijão de nitrogênio. Sendo os seguintes protocolos de criopreservação testados: Protocolo I – BB 1h 3 cm – meio Botu-bovi[®], refrigerado por 1 hora a 5°C e congelado no vapor de nitrogênio a uma distância de 3,0 cm acima do nitrogênio; Protocolo II – BB 1h 6 cm - meio Botu-bovi[®], refrigerado por 1 hora a 5°C e congelado no vapor de nitrogênio a uma distância de 6,0 cm acima do nitrogênio; Protocolo III – BB 3h 3 cm – meio Botu-bovi[®], refrigerado por 3 horas a 5°C e congelado no vapor de nitrogênio a uma distância de 3,0 cm acima do nitrogênio; Protocolo IV – BB 3h 6cm – meio Botu-bovi[®], refrigerado por 3 horas a 5°C e congelado no vapor de nitrogênio a uma distância de 6,0 cm acima do nitrogênio; Protocolo V – BM 1h 3cm – meio Bovimix[®], refrigerado por 1 hora a 5°C e congelado no vapor de nitrogênio a uma distância de 3,0 cm acima do nitrogênio; Protocolo VI – BM 1h 6cm – meio Bovimix[®], refrigerado por 1 hora a 5°C e congelado no vapor de nitrogênio a uma distância de 6,0 cm acima do nitrogênio; Protocolo VII – BM 3h 3cm – meio Bovimix[®], refrigerado por 3 horas a 5°C e congelado no vapor de nitrogênio a uma distancia de 3,0 cm

acima do nitrogênio; Protocolo VIII – BM 3h 6cm – meio Bovimix[®], refrigerado por 3 horas a 5°C e congelado no vapor de nitrogênio a uma distância de 6,0 cm acima do nitrogênio.

Para as avaliações das amostras as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Logo após a descongelação (T0) avaliou-se a motilidade total (MT %), motilidade progressiva (MP %), e vigor (V 0-5). As amostras foram mantidas em temperatura ambiente e as análises foram repetidas após uma hora (T1) da descongelação.

Na análise estatística utilizou-se o sistema GLM do programa SAS System, 2002 com delineamento experimental casualizado para comparação dos protocolos e comparação dos animais. O nível de significância utilizado foi de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados apresentados nas Tabelas 1, mostram respectivamente as médias de MT (%), MP(%), e V(0-5) dos protocolos avaliados após a descongelação (T0).

Em todos os parâmetros avaliados não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre os protocolos de criopreservação de sêmen bovino, logo após a descongelação (T0) e uma hora após (T1), mostrando que não houve influência dos diluentes e protocolos testados sobre a viabilidade espermática após a descongelação das amostras. Porém foi observado efeito animal na congelabilidade do sêmen bovino.

Em geral a criopreservação resulta na morte de 40 a 50% dos espermatozoides presentes no ejaculado, com perda da viabilidade e queda na fertilidade dos sobreviventes (WATSON, 2000). O presente trabalho obteve resultados semelhantes, pois observou-se uma MT de 37,7% a 51,7%. Este fato pode ter ocorrido em consequência do tipo de diluente utilizado e danos causados durante e após a descongelação.

TABELA 1. Média da motilidade total (%), motilidade progressiva (%) e vigor (0-5), dos protocolos testados, logo após a descongelação (T0).

Protocolos	MT (%)	MP (%)	V (0-5)
BB 1h3cm	39,25a	35,50a	1,45a
BB 1h6cm	37,75a	33,75a	1,60a
BB 3h3cm	40,25a	35,75a	1,75a
BB 3h6cm	43,00a	38,50a	1,55a
BM 1h3cm	47,00a	42,50a	1,85a
BM 1h6cm	43,00a	38,75a	1,75a
BM 3h3cm	51,75a	46,75a	2,05a
BM 3h6cm	49,75a	45,00a	1,90a
C.V. (%)	32,16	35,75	37,31

*Letras minúsculas nas colunas comparam as médias de cada parâmetro avaliado entre os protocolos. O nível de significância utilizado foi de 5%. C.V – Coeficiente de variação

Os resultados do presente estudo diferem dos resultados observados por Guthrie et al. (2002), que avaliaram três crioprotetores diferentes sendo, glicerol, DMSO e etilenoglicol, e três tempos de exposição dos ejaculados ao diluente e encontraram efeito de diferentes diluentes sobre a qualidade do sêmen congelado e justificaram que essa diferença pode ser em consequência da composição dos diluentes e os crioprotetores utilizados para congelação.

Neste estudo os autores observaram que a concentração dos crioprotetores teve efeito significativo sobre a motilidade total. Entretanto, os crioprotetores não diferiram significativamente entre si, bem como o tempo de exposição aos crioprotetores também não diferiram, concluindo que o diluente com etilenoglicol apresentou mais efeitos nocivos aos espermatozoides.

Os dados apresentados na tabela 2 mostram respectivamente as médias de MT (%), MP (%) e V (0-5) dos protocolos avaliados uma hora após descongelação (T1).

TABELA 2. Média da motilidade total (%), motilidade progressiva (%) e vigor (0-5), dos protocolos testados, logo após a descongelação (T1).

Protocolos	MT (%)	MP (%)	V (0-5)
BB 1h3cm	23,50a	20,00a	1,10a
BB 1h6cm	26,25a	22,90a	1,05a
BB 3h3cm	29,00a	25,50a	1,15a
BB 3h6cm	30,75a	26,50a	1,30a
BM 1h3cm	27,00a	23,25a	1,10a
BM 1h6cm	24,75a	21,00a	1,10a
BM 3h3cm	34,75a	30,50a	1,40a
BM 3h6cm	34,75a	30,75a	1,45a
C.V (%)	59,67	64,82	59,03

*Letras minúsculas nas colunas comparam as médias de cada parâmetro avaliado entre os protocolos. O nível de significância utilizado foi de 5%. C.V – Coeficiente de variação.

Os resultados de MT deste estudo foram inferiores aos encontrados por CRESPILO et al. (2006), quando compararam os diluentes Tris-gema de ovo-frutose (Tris) e o Botu-Bov[®] (BB), esses autores observaram uma boa eficiência dos dois diluentes testados, obtendo uma MT de 71,8% com o meio BB e 67,4% com o Tris.

Alguns trabalhos realizados com bovinos vêm utilizando cada vez mais na criopreservação, diluentes a base de gema de ovo, leite em pó e água de coco visando uma melhor qualidade e capacitação espermática. A gema de ovo possui um mecanismo de ação ainda não muito bem compreendido, mas acredita-se que ela atua na superfície da membrana plasmática, promovendo alguma proteção para o espermatozóide contra o choque térmico durante o resfriamento (JONES, 1976). A quantidade de gema de ovo utilizadas comumente na congelação de sêmen é em média de 15% a 30% do volume total da dose, sendo que os diluentes testados neste trabalho eram constituídos a base de gema de ovo. Porém, as empresas não informaram as concentrações de gema de ovo dos diluentes. Entretanto, diluentes à base de

SILVA, N.C. et al. Avaliação de dois diluentes e diferentes técnicas de criopreservação de sêmen bovino. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 19, Ed. 166, Art. 1122, 2011.

leite também são considerados bons meios para estocagem e para criopreservação do sêmen bovino. Um meio com 10% de leite ou leite desnatado em combinação com 7% de glicerol e antibiótico tem sido utilizado com sucesso para congelação de sêmen bovino (MELROSE, 1962).

A maior desvantagem do meio a base de leite é a dificuldade de visualização do espermatozóide ao microscópio, prejudicando a avaliação do sêmen. É por este motivo que os diluentes a base de gema de ovo em combinação com Tris e Citrato são os mais usados (VISHWANATH & SHANNON, 2000).

A qualidade do sêmen após os processos de congelamento e de descongelamento depende do tipo e da concentração do crioprotetor intracelular, da sua combinação com diferentes diluidores e da taxa de diluição utilizada, entretanto as empresas que comercializam os diluentes utilizados neste trabalho não descreveram no rótulo a concentração e os tipos de crioprotetores utilizados.

De acordo com Schafer-Somi et al. (2006), os protocolos de criopreservação disponíveis variaram quanto ao uso de fatores estabilizantes de membrana, concentração do crioprotetor, taxa de diluições e curvas de congelação e descongelação.

Snoeck et al. (2007) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de gema de ovo, açúcares e tampões nos diluidores sobre a viabilidade espermática do sêmen eqüino, e concluíram que o diluidor com alta concentração de açúcares, tampões e sais e 20% de gema demonstraram potencial para proteção da característica integridade estrutural das membranas plasmática e acrossomal.

Alguns trabalhos realizados com eqüinos obtiveram bons resultados utilizando diferentes diluentes com alta e baixa concentração de gema de ovo e açúcares (GRAHAM, 2000).

Vários trabalhos vêm testando o colesterol sobre a viabilidade espermática como Bertozzo & Zúccari, (2008), que trabalhando com bovinos, constataram que a adição de β -Sitosterol após a descongelação não foi efetiva

em aumentar a sobrevivência dos espermatozóides bovinos, visto que estes já haviam passado por todos os possíveis danos estruturais das membranas plasmática e acrossomais que a criopreservação pode causar.

De acordo com Graham, (1996) ocorrem alterações na membrana plasmática durante a refrigeração a 5°C, isto devido a composição lipídica da membrana e pela relação colesterol:fosfolípidos (GIRAUD et al., 2000). Entretanto, a membrana plasmática não é alterada somente pelos diferentes tipos de refrigeração, mas também por outros processos como as mudanças durante a descongelação e estresse osmótico que ocorre com a adição de substâncias. Porém essas alterações podem ser minimizadas com a utilização de processos de descongelação e diluição adequados.

O tempo em que os espermatozóides ficam expostos ao diluente no momento de refrigeração é de suma importância para a desidratação da célula espermática, antes da temperatura atingir 0°C, para evitar a formação de cristais de gelo intracelular como citado por JASKO (1994).

No momento do resfriamento os espermatozóides interagem com os componentes dos diluentes como a gema de ovo e leite, o que promove ao espermatozóide uma maior resistência à criopreservação (WATSON, 1995).

Na criopreservação ocorrem variações de temperatura a qual a célula espermática não está adaptada, pois ocorrem alterações na motilidade e na estrutura dos espermatozóides diminuindo a sua viabilidade (HOLT, 2000a). Quando o resfriamento é feito rápido entre 30°C e 0°C ocorre alterações letais ao espermatozóide e quando se utiliza resfriamentos muito lentos também induz a alterações na membrana dos espermatozóides sendo observado por Gonzalez (2004). Entretanto, é importante utilizar uma curva de congelamento adequada, pois se o resfriamento for rápido não há tempo da desidratação dos espermatozóides, causando formação de gelo intracelular o qual é prejudicial a célula. Já a curva de congelamento lenta haverá a desidratação dos espermatozóides impedindo a formação de gelo, mas porém a concentração de solutos pode causar danos a célula (WATSON, 1995).

Januskauskas (1999) observou que o resfriamento entre 4°C e 5°C deve ser feito em ótimas condições já que os espermatozóides dos mamíferos são sensíveis a um resfriamento rápido. Entretanto, Snoeck (2002) observou que quando o sêmen é diluído e resfriado a temperaturas abaixo de 5°C o meio diluidor ao redor dos espermatozóides e a célula não se encontram totalmente congelados, devido ao crioprotetor e ao líquido intracelular estarem abaixo de 0°C causando o fenômeno chamado de super-resfriamento. Entretanto, dependendo da curva de congelamento e do diluidor manter a viabilidade do sêmen, pois dependendo da curva de congelamento começa a formação de cristais de gelo no diluente devido aos espermatozóides manter-se super-resfriados aumentando a concentração de solutos ao redor dos espermatozóides.

Contudo não foi observado neste trabalho diferença entre três e seis horas de refrigeração diferente dos resultados encontrados por Watson (1995) o qual observaram alterações nas células quando submetidas ao resfriamento a 5°C.

Os baixos resultados do presente trabalho podem ser em consequência do efeito animal, pois de acordo com De Leeuw et al. (1990) a congelabilidade depende de composição da membrana plasmática dos espermatozóides, fato este que pode ser diferente entre os animais. Embora utilizamos quatro touros, os mesmos podem possuir pouca resistência espermática a congelação.

Corrêa et al., (1997), não observaram diferença entre motilidade espermática progressiva pós-descongelação, em touros com baixa e alta fertilidade.

Os resultados desse trabalho mostraram efeito animal na congelabilidade do sêmen bovino, o mesmo foi observado por Holt et al., (2000a) onde notou que espermatozóides de diferentes indivíduos podem exibir respostas significativamente diferentes a um mesmo protocolo de congelação. Foi observado também que células espermáticas de algumas espécies suportam de maneira mais eficaz a crioinjúria (YU et al. 2002).

SILVA, N.C. et al. Avaliação de dois diluentes e diferentes técnicas de criopreservação de sêmen bovino. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 19, Ed. 166, Art. 1122, 2011.

Entretanto Holt et al., (2000a) sugeriram que deve ser realizado um exame das propriedades criobiológicas dos espermatozoides, bem como um exame da exata natureza das crio-injúrias espécie – específica para se determinar um apropriado protocolo de criopreservação.

Os resultados obtidos com este trabalho não mostraram diferença entre os diluentes testados. Entretanto, as empresas possuem sua composição sob sigilo. Devido ao efeito animal, talvez diferentes composições de diluentes poderiam proporcionar melhores resultados dos parâmetros espermáticos do sêmen congelado dos touros utilizados neste experimento.

5 CONCLUSÃO

Não houve efeito dos diluentes comerciais e técnicas de criopreservação testadas sobre os parâmetros espermáticos avaliados logo após a descongelação (T0), bem como uma hora (T1) pós-descongelação. Entretanto, observou-se que existe variação individual no grau de congelabilidade do sêmen de bovinos.

6 REREFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

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

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia Molecular da célula**. 3º ed. Editora artes médicas, 1997, 1294p.

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

A. M. CRESPILO.; F. O. PAPA.; K. ALBERTI.; E. R. SIQUEIRA FILHO.; A. MARTINS Jr.; J. L. C. NOVAES.; J. A. DELL'AQUA. **Eficiência comparativa entre dois diluidores para a congelação de sêmen bovino sobre os padrões de motilidade e integridade de membrana plasmática**. ARS VETERINARIA, Jaboticabal, SP, Vol. 22, nº3, 229-235, 2006.

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

ANJOS, J. E. A. B. **Trabalho de conclusão de curso na área de reprodução animal**, 54p. 2006. Faculdade Integrada - UPIS Distrito Federal.

ANCHIETA, M. C.; VALE FILHO, V. R.; COLOSIMO, E.; SAMPAIO, I. B. M.; ANDRADE, V. J. Descarte e congelabilidade do sêmen de touros de raças zebuínas e taurinas em central de inseminação artificial no Brasil. **Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 57, n. 2, p.196-204, 2005.

AX, R. L.; DALLY, M. R.; DIDION, B.A.; LENZ, R. W.; LOVE, C.C.; VARNER, D. D.; HAFEZ, B.; BELLIN, M. E.; Avaliação do Semen. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. BARUERI: MANOLE, 2004, 7º ED. Cap.25, p. 369-379.

BARTH, A. D., OKO, R. J. Preparation of semen for morphological evaluation. In: Iowa State University Press. **Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa**. 1 ed. Iowa: Ames, 1989, p. 8-18.

BERTOZZO, B. R, ZÚCCARI, C. E. S. N. **Efeito da adição do colesterol ao meio de incubação do sêmen bovino congelado sobre a integridade das membranas plasmática e acrossomal**.10, 2008. Disponível em: <http://www.propp.ufms.br>. Acesso em 04/06/2010.

BEDFORD, J. M. & HOSKINS, D. D. **The mammalian spermatozoon: morphology, biochemistry and physiology**. In: **Lamming**, G. E. Marshall's Physiology of Reproduction. V.2. London, Churchill Livingstone, 1990. pp. 379-568.

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

BORGES, J. C. **Utilização de antioxidantes associados ou não a emulsificantes na criopreservação do sêmen bovino**. Universidade Federal de Viçosa – UFV. Viçosa, 2003. 57p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).

BRANDÃO, A. C.; ARRUDA, R. P.; MADUREIRA, E. H.; MARTINS, J. F. P.; ASSUMPÇÃO, M. E. O.D.; VISINTIN, J. **A. Influência do glicerol e etilenoglicol e da criopreservação sobre o complexo DNA-Proteína de espermatozóides em garanhões**. Braz. J. vet. Res. anim. Sci., São Paulo, v. 43, suplemento, p. 68-73, 2006.

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

CORREA, J. R.; PACE, M. M.; ZAVOS, P. M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional test and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, v. 48, p. 721 – 731, 1997.

CORMIER, N., SIRARD, M-A., BAILEY J.L. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. **J. Androl.**, v.18, p.461-468, 1997.

DE LEEUW, F.E.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ,A.J. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. In: International Conference on Boar Semen preservation BOAR SEMEN PRESERVATION, 2, 1990, Proceedings p.95-104, 1990.

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.

ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl., n. 47 p. 243-255, 1993.

FAZELI, A.R.; ZHANG, B.R.; STEENWEG, W.; LARSSON, B.; BEYERS, M.M.; VAN DE BROEK, J.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; COLENBRANDER, B. Relationship between sperm-zone pellucida binding assays and the 56-day nonreturn rate of cattle inseminated with frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 48, p. 853-863, 1997.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. **Cryobiol.**, V. 23, p. 1-13, 1986.

FONSECA, V. O. **Fisiologia da Reprodução**. In: Curso de Pós-Graduação "Latu Sensu" Tutoria a Distância Julgamento de Raças Zebuínas-FAZU/ABCZ, I, Uberaba, MG, Módulo V. Uberaba, p.128, 1999.

FLESCH, F.M. e GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochemistry and Biophysic**, v. 1469, p. 197-235, 2000.

GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; GRAVANCE, C.G.; MARSHALL, C.E.; DEJARNETTE, M.J.; ALLEN, C.H. Seminal Plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. **Theriogenology**, v. 56, p. 31-40, 2001.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.12, n.1, p.131-147, 1996.

GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 14., 2000. *Proceedings...* Stockholm, 2000. v.2, p.307.

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

GIRAUD, M.N., MOTTA, C., BOUCHER, D., GRIZARD, G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. **Human Reproduction**, v.15, p.2160- 2164, 2000.

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

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, n. 6, p. 1811-1816, 2002.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-3, p. 03-22, 2000.

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

JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SÖDERQUIST, L.; HAARD, MG.; HAARD, MC.; JOHANNISSON, 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, n. 4, p. 641-658, 1999.

JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **ARS Veterinaria**, v.10, n.2, p.156-165, 1994.

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

KEITH, S.L., **Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa**. 1998. 104p. Tese (Master of Science). Colorado State University Fort Collins, Colorado.

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. **Cryobiol.**, v.46, p.24-53, 2003.

MAGNAGO, L.G.P. **Avaliação física e morfológica do sêmen de cães da raça pastor alemão resfriado a 5°C**. 2000. 79p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária – UFMG - Belo Horizonte,2000.

MARQUES, D. C. **Criação de bovinos**. 7. Ed. ver., atual e ampliada. Belo Horizonte: CVP-Consultoria Veterinária e Publicações, 2006. Cap. 4, p. 269-271.

MELROSE, D. R. Artificial insemination in cattle. In: MAULE, J. P. (Ed.), *The Semen of Animals and Artificial Insemination*. **Commonwealth Agricultura Bureau**, Farnham Royal, Bucks, England, pp. 1-181, 1962.

MIES FILHO, A. Fisiologia do aparelho genital masculino. In: **Reprodução Animal**, 6 ed. Porto Alegre: Sulina, 1987, v. 1, p. 98-132.

MORAN, D.M. **Effects of cooling rate and storage temperature on motion characteristics of stallion spermatozoa**. Fort Collins, 1992. Dissertação (Mestrado) – Colorado State University.

MUNAR, C. J. Criopreservação, tópicos atuais. **Revista do Centro de Ciências Rurais UFSM**, v.18, p. 17-19, dez. 1988.

OHASHI, O. M. Inseminação Artificial de Bubalinos. In: GONSALVES, P. B., FIQUEIREDO, J. R., FREITAS, V. J. F., **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal**. Livraria Varela, p. 97-110, 2001.

O'FLAHERTY, C.M.; BEORLEGUI, N.B.; BECONI, M.T. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. **Theriogenology**, v.52, p.289-301, 1999.

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

PICKETT, B.W., AMANN, R.P. Cryopreservation of semen. In: MCKINNON, A.O., VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. 1. °ed.: Lea e Febiger, Philadelphia. 1993.p. 769-789.

POLGE, C. Sperm freezing: Past, present and future. In: JOHNSON, L.A.; LARSSON, K. (Eds.) **Deeping freezing of boar semen**. Beltsville: USDA, 1985. p.167-173.

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

ROSSI, T.C., PAPAFO., SANTOS, T.B., MACEDO, L.P., ALVARENGA, M.A., MELO, C.M., DELL'AQUA Jr., J.A. Efeito da utilização de diferentes crioprotetores e suas associações no processo de congelação de sêmen eqüino com meio MP50. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.350-352, 2003.

SAS. SAS /SATS User's Guide. Versão 9.1 Cary: SAS Institute, 2002.

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

SCHÄFER-SOMI, S.; KLUGER, S.; KNAPP, E.; KLEIN, D.; AURICH, C. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. **Theriogenology**. *Article in press*. 2006.

SILVA, M.R. **Taxa de gestação e avaliação de sêmen congelado/descongelado de touros da raça Nelore utilizando testes convencionais e de adesão in vitro de espermatozoides à zona pelúcida de ovócitos bovinos imaturos**. 2000. 75p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa – UFV – Viçosa, 2000.

SIQUEIRA, J. B. **Relação da fertilidade de sêmen bovino congelado com teste de avaliação espermática in vitro**. 2004. 91p. Tese (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.

SNOECK, P.P.N. Efeito de três temperaturas de descongelamento sobre os espermatozoides eqüinos congelados com diferentes agentes crioprotetores. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.26, n.3, p.454-5, 2002.

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

SNOECK, P.P.N.; HENRY, M.; MELO, M.I.V. Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós-descongelação em eqüinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.59, n.1, p.56-64, 2007.

SQUIRES E.L.; PICKET, B.W.; GRAHAM, D.K.; VANDERWALL, P.M.; BRUEMMER, J.E. Cooled and frozen stallion semen. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, n.9 p.3-36, 1999.

STALHAMMAR, E.M.; JANSON, L.;PHILIPSSON, J. The impact of sperm motility on nonreturn rate in pre-selected dairy bulls. **Reproduction Nutrition Development**, v. 34, p. 37-45, 1994.

TRAVIS, A.J.; KOPF, G.S. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. **The Journal of Clinical Investigation**., v.110, p.731-736, 2002.

VALLE, G.R.; SILVA FILHO, J.M. Membrana plasmática do espermatozóide. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, n. 36, p. 45-53, 2001.

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

VIVEIROS, A.T.M. Semen cryopreservation in catfish species, with particular emphasis on the African catfish. **Anim. Breed. Abstr.**, v.73, p.1N- 9N, 2005.

VIVEIROS, A.T.M.; GODINHO, H.P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Phys. Bioch.*, v.35, p.137-150, 2009.

VIVEIROS, A.T.M.; ORFÃO, L.H.; MARIA, A.N. et al. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.112, p.293-300, 2009.

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

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

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

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

YU, I.; SONGSASEN, N.; GODKE, R.A.; LEIBO, S.P. Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. **Cryobiology**.v.44.p.62-78. 2002.