



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**INFLUÊNCIA DE SISTEMAS DE REFRIGERAÇÃO SOBRE A
QUALIDADE DO SÊMEN OVINO CRIOPRESERVADO EM
PALHETAS**

LIGIA FREITAS DE LIMA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

BRASÍLIA/DF
Junho/2008

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**INFLUÊNCIA DE SISTEMAS DE REFRIGERAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DO
SÊMEN OVINO CRIOPRESERVADO EM PALHETAS**

LIGIA FREITAS DE LIMA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jairo Pereira Neves
CO-ORIENTADOR: Dr. Rodolfo Rumpf

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PUBLICAÇÃO: 301/2008

BRASÍLIA/DF
Junho/2008

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**INFLUÊNCIA DE SISTEMAS DE REFRIGERAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DO
SÊMEN OVINO CRIOPRESERVADO EM PALHETAS**

Ligia Freitas de Lima

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE DE AGRONOMIA
E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS AGRÁRIAS NA ÁREA DE PRODUÇÃO ANIMAL.**

Rodolfo Rumpf, Doutor, (EMBRAPA-CENARGEN)
(CO-ORIENTADOR) CPF: 295718049-91 E-mail: rodolfo@cenargen.embrapa.br

APROVADA POR:

JAIRO PEREIRA NEVES, Doutor, (FAV/UnB)
(ORIENTADOR) CPF: 065863509-30 E-mail: jpneves@unb.br

Profa. Dra. Carolina Madeira Lucci, (UnB)
(EXAMINADOR INTERNO) CPF: 490390241-20 E-mail: cmlucci@unb.br

Paulo Bayard Dias Gonçalves, Doutor (UFSM - Biorep)
(EXAMINADOR EXTERNO) CPF: 205.995.950.00 E-mail: bayard@biorep.ufsm.br

BRASÍLIA/DF, 19 de junho de 2008.

FICHA CATALOGRÁFICA

Lima, Ligia Freitas de

Influência de Sistemas de Refrigeração Sobre a Qualidade do Sêmen Ovino Criopreservado em Palhetas.

Ligia Freitas de Lima; orientação do Dr. Jairo Pereira Neves, Brasília, 2008.

53 p.:il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2008.

1. ovino, curvas de refrigeração, congelamento, descongelamento.

I. Neves, J.P. II. Dr.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

LIMA, L.F. (2008) **Influência de Sistemas de Refrigeração sobre a Qualidade do Sêmen Ovino Criopreservado em Palhetas.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2008, 53 p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Ligia Freitas de Lima

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Influência de sistemas de refrigeração sobre a qualidade do sêmen ovino criopreservado em palhetas.

GRAU: MESTRE ANO: 2008

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Ligia Freitas de Lima

CPF: 023694419-33

Rua: Frederico Maurer 2721 casa, Hauer

CEP: 81670-020 – Curitiba/Pr, Brasil

Telefone: (41) 30148263 / (61) 81445201 E-mail: ligialima@unb.br

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra primeiramente ao meu pai, Hilton Vieira de Lima, por todo amor e carinho; bem como pelo apoio e suporte, nunca permitindo que me faltasse recursos para realização deste curso de pós-graduação, pelo grande exemplo de vida, força, determinação e sucesso, pelas nossas “briguinhas” e por sempre tentar “fincar os meus pés no chão”.

A minha mãe, Ione Maria de Freitas, por todo amor e carinho, apoio, suporte, educação, valores, dedicação, confiança que sempre depositou em mim, conversas, broncas e compreensão pelos momentos em que não pude estar presente.

Ao meu irmão, Halan Freitas de Lima, pelo amor e carinho, amizade, incentivo e momentos de descontração.

A minha avó, Elvira C. de Freitas, pelo carinho e cuidados, apoio, por sempre torcer por mim.

Ao meu Orientador, Doutor Jairo Pereira Neves, pelo exemplo de profissional, dedicação e presteza na orientação deste trabalho. Pelo apoio e incentivo em todos os momentos e por se encaixar perfeitamente na palavra “amigo”. Com toda certeza, foi um grande privilégio estes dois anos de convivência.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Ao Professor Dr. Jairo Pereira Neves pela orientação, exemplo profissional, imensurável ajuda, pelos ensinamentos, incentivo e apoio nos momentos mais difíceis.

À minha família por toda a compreensão, disponibilidade e cuidados.

À minha querida amiga Viviane Verdolin, pela inestimável amizade, por toda a sua ajuda e “paciência”, pelas suas palavras de incentivo no momento em que quase desisti e por fazer da sua família um pouco minha também.

A minha colega e amiga Priscilla Moura, por todo companheirismo nos trabalhos a campo e laboratoriais, aos estagiários: Pedro Ivo Passos, Diogo Leal e Hetielle, pela ajuda e amizade.

Aos colegas da UFSM/BioRep, Dr. José Francisco Manta Bragança e Dra. Angélica Bertagnolli, por toda a ajuda e incentivo que me deram para que eu ingressasse neste curso de pós-graduação.

Aos doutores Rodolfo Rumpf, Roberto Sartori e Margot N. Dode da Embrapa/Cenargen-DF por disponibilizarem os laboratórios para o processamento e análise do sêmen.

Ao grande amigo, Normandes Vieira (Teco) por toda a ajuda, companheirismo e pela amizade.

Aos amigos e companheiros de alojamento, da fazenda Sucupira, Monique Guardieiro, Michele Bastos, Tiago Diesel, Nádia Simarro e José Carvalho por todo o apoio e momentos de descontração.

Ao colega Alexandre Floriani Ramos por toda a ajuda.

Ao Dr. Rafael Mondadori e a Upis, por toda a ajuda.

Aos amigos e colegas de profissão Dr. Sérgio Nadal, Renatha Ennes e Maria Amélia Oliveira, que mesmo distantes suas presenças se fizeram constantes.

Aos funcionários da fazenda Sucupira, Japão, Weber e Dona Zefa, pela ajuda.

A Capes e ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE

Capítulo	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Os espermatozóides.....	3
2.1.1 Membrana Plasmática.....	4
2.1.2 Capacitação Espermática.....	5
2.1.3 Reação Acrossômica.....	6
2.2 Etapa da Refrigeração do sêmen.....	7
2.3 Etapa da Congelação do sêmen.....	9
2.4 Avaliações do sêmen pós-descongelção.....	12
2.4.1 Motilidade e Vigor.....	13
2.4.2 Morfologia espermática.....	13
2.4.3 Teste de Termo-Resistência.....	14
2.4.4 Teste de Termo-Resistência adaptado por Paganini Filho.....	15
2.4.5 Viabilidade espermática estado acrossomal.....	15
2.4.6 Integridade de Membrana Plasmática.....	15
3. OBJETIVO GERAL.....	16
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
6. CAPÍTULO ÚNICO.....	25
Influência de Sistemas de Refrigeração Sobre a Qualidade do Sêmen Ovino Criopreservado em Palhetas	
6.1 INTRODUÇÃO.....	28
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
6.2.1 Coleta e avaliação do sêmen.....	29

6.2.2	Processamento do sêmen.....	30
6.2.3	Sistemas de refrigeração.....	30
6.2.4	Monitoramento das curvas de refrigeração.....	31
6.2.5	Avaliações do sêmen refrigerado.....	31
6.2.6	Processo de criopreservação.....	32
6.2.7	Descongelamento do sêmen.....	32
6.2.8	Integridade de membrana plasmática.....	32
6.2.9	Teste de Termo Resistência (TTR).....	32
6.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
6.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
6.5	CONCLUSÕES.....	38
6.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela

Página

Capítulo único

1. Médias (\pm desvio-padrão) da motilidade (%), vigor (0-5), percentagem total (%) de defeitos morfológicos dos espermatozóides (DM), espermatozóides vivos com acrossomo íntegro (VI), espermatozóides vivos com acrossomo reagido (VR), espermatozóides mortos com acrossomo íntegro (MI) e mortos com acrossomo reagido (MR) do sêmen ovino refrigerado em diferentes sistemas (refrigerador sem bolsa - RS, refrigerador com bolsa – RC, balcão sem bolsa – BS e balcão com bolsa – BC).....45
2. Médias (\pm desvio-padrão) da motilidade (%), vigor (0-5), percentagem total (%) de defeitos morfológicos dos espermatozóides (DM), percentagens (%) de espermatozóides vivos com acrossomo íntegro (VI), espermatozóides vivos com acrossomo reagido (VR), mortos com acrossomo íntegro (MI), mortos com acrossomo reagido (MR) e percentagem (%) de células com membranas íntegras (IMP) do sêmen ovino refrigerado em diferentes sistemas (refrigerador sem bolsa - RS, refrigerador com bolsa – RC, balcão sem bolsa – BS e balcão com bolsa - BC) e congelado em vapor de N₂.....46
3. Médias (\pm desvio-padrão) da Motilidade (%), Vigor (0-5), percentagem total de defeitos morfológicos dos espermatozóides (DM) e percentagem de células com membranas íntegras (IMP) ao final de 4 horas de Teste de Exaustão.....47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Capítulo único	
1. Fluxograma experimental do processamento do sêmen ovino submetido a diferentes sistemas de refrigeração: refrigerador sem bolsa (RS), refrigerador com bolsa (RC), balcão sem bolsa (BS) e balcão com bolsa (BC).....	42
2. Sistema de refrigeração de sêmen em refrigerador doméstico com bolsas de água (RC) ...	43
3. Curvas de refrigeração do sêmen ovino (°C/min) determinadas para a refrigeração em refrigerador sem bolsa (RS), refrigerador com bolsa (RC), balcão sem bolsa (BS) e balcão com bolsa (BC).....	44
4. Expressão gráfica das médias em percentagem da motilidade espermática total ao final da refrigeração e após a descongelação do sêmen ovino.....	48
5. Expressão gráfica das médias em percentagem de defeitos espermáticos totais ao final da refrigeração e após a descongelação do sêmen ovino.....	49
6. Expressão gráfica das médias em percentagem dos espermatozóides vivos com acrossomo íntegro ao final da refrigeração e após a descongelação do sêmen ovino.....	50
7. Expressão gráfica das médias em percentagem dos espermatozóides mortos com acrossomo íntegro ao final da refrigeração e após a descongelação do sêmen ovino.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

: - para (exemplo 1:1 – uma parte para uma parte)

ATP – Adenosina trifosfato

BC – Balcão com Bolsa

BS – Balcão sem Bolsa

Ca²⁺ - Íon Cálcio

cm - Centímetro

CTC – Clortetraciclina

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DIC – Diacetato de Carboxifluoresceína

FDA – Diacetato de Fluoresceína

FIV – Fertilização *in vitro*

GGL – Glicina-Gema-Leite

IA – Inseminação Artificial

IMP – Integridade de Membrana Plasmática

IP – Iodeto de Propídio

ml - Mililitro

Mot – Motilidade Total

MP – Motilidade Progressiva

N₂ – Nitrogênio

RC – Refrigerador com Bolsa

RS – Refrigerador sem bolsa

SAS – Statistical Analyse System

TRA – Técnicas de Reprodução Assistida

μl – Microlitro

RESUMO

O presente estudo avaliou diferentes sistemas de refrigeração do sêmen ovino, através da aferição e comparação das curvas obtidas assim como seus efeitos sobre a qualidade espermática. Foram avaliados a motilidade, vigor, defeitos morfológicos, viabilidade e estado acrossomal através da coloração dupla trypan-blue/giemsa, ao final dos 90 min de refrigeração, e após a descongelação. Para as análises pós-descongelação foram utilizados os mesmos parâmetros acrescidos da avaliação da integridade da membrana plasmática (IMP) visualizada através das sondas fluorescentes IP e DIC em microscopia de fluorescência e da avaliação do teste de exaustão ao final quatro horas de incubação do sêmen a 37°C. A refrigeração do sêmen foi realizada em refrigerador doméstico e em balcão, a fim de se controlar a queda de temperatura dos dois equipamentos, as palhetas foram dispostas entre bolsas plásticas contendo água aquecida a 32°C, constituindo quatro sistemas RS (refrigerador sem bolsa), RC (refrigerador com bolsa), BS (balcão sem bolsa) e BC (balcão com bolsa). Os diferentes protocolos resultaram quatro taxas médias de refrigeração -1,4°C/min, -0,4°C/min, -2,9°C/min e -0,45°C/min, para RS, RC, BS e BC; respectivamente. Após a refrigeração do sêmen observou-se diferença significativa entre os tratamentos no parâmetro motilidade espermática ($P < 0,05$), com o tratamento BS apresentado a menor percentagem de células móveis (58,1%). As percentagens de espermazóides vivos com acrossoma íntegro e mortos com acrossoma íntegro apresentaram diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$), o tratamento BS obteve a menor média (85,3%) de vivos íntegros e também a maior média de mortos íntegros (14,1%) diferindo dos demais ao final da refrigeração. Houve diferença significativa na percentagem de defeitos morfológicos após a refrigeração ($P < 0,05$), sendo que o tratamento BS foi o que apresentou maior média (15,4%) de defeitos, os sistemas RC (11,5%) e BC (11,1%) apresentaram as menores médias, o RS (13,6%) não diferiu dos demais. Para os demais parâmetros espermáticos pós-refrigeração não foram observadas diferenças significativas. Em relação ao sêmen pós-descongelação, para todos os parâmetros avaliados não foram observadas diferenças significativas. Ao final do teste de exaustão, após quatro horas de incubação, também não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Com base nos resultados concluiu-se que as diferentes taxas de refrigeração, afetaram o sêmen no final da fase de refrigeração. As avaliações pós-descongelação não evidenciaram diferenças significativas entre os protocolos de refrigeração.

Palavras-chaves: ovino, curvas de refrigeração, congelação, descongelação.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the influence of different types of cooling systems upon the post-thawing quality of ram semen, through the measurement and comparison of cooling rates. The parameters were motility, vigor, morphology damages, viability and acrossomal state through the use of Trypan-blue/giemsa coloration, at the end of the 90 minutes of cooling and post-thawing. With regard to the analysis of post-thawed semen, the same parameters were used, in addition to the assessment of the integrity of the plasmatic membrane using de fluorescent stains propidium iodide (PI) and carboxyfluorescein diacetate (CFDA), and the resistant test through incubation of semen at 37° C during 4 hours. The semen refrigeration was carried out in a domestic refrigerator and in a horizontal freezer. To control the fall of temperature of the two equipments, the straws were disposed between plastic bags containing water at 32°C, creating four combinations of cooling procedure: RS (refrigerator without bag), RC (refrigerator with bag), BS (horizontal refrigerator without bag) and BC (horizontal refrigerator with bag). The different protocols resulted in four cooling rates: -1.4°C/min, -0.4°C/min, -2.9°C/min and -0.45°C/min, for RS, RC, BS and BC, respectively. At the end of cooling period, there was a significant difference among the treatments on the sperm motility ($P<0.05$), the BS treatment showed the lowest percentage of sperm motility (58.1%). The percentage of live spermatozoa with intact acrosome was different ($P<0.05$) among treatments, the BS treatment had the lower mean (85.3%). The percentage of dead spermatozoa with intact acrosome was different ($P<0.05$), the BS treatment had the highest mean (14.1%). There was a significant difference on the percentage of morphological defects at the end of cooling ($P<0.05$); the BS treatment had the highest mean (15.4%), the systems RC (11.5%) and BC (11.1%) resulted in the lower means and the RS (13.6%) was identical to others. To the other sperm parameters post-cooling, there were not differences. Regarding frozen-thawed semen, there were no parameters with differences. At the end of the resistant test period, there was no significant difference among the treatments. On basis of these results, it was concluded that the different cooling rates only affected ram semen at the end of cooling stage. The evaluation of frozen-thawed semen does not show any effect on the different cooling protocols.

Key words: ovine, cooling-rates, frozen, thaw.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as biotécnicas aplicadas à reprodução animal, a inseminação artificial (IA) possui papel fundamental nos programas de melhoramento, incrementando a contribuição de indivíduos de alto mérito genético. Para a IA, utiliza-se sêmen fresco pela via cervical superficial ou sêmen congelado intra-uterinamente por laparoscopia (Evans e Maxwell, 1990).

O uso do sêmen congelado apresenta inúmeros benefícios como o melhor aproveitamento dos reprodutores, facilidade no comércio e transporte do material genético, permitindo assim a introdução de novas linhagens nos rebanhos com uma maior segurança sanitária. Porém a utilização do sêmen ovino congelado por via cervical ainda não apresenta resultados satisfatórios de prenhez, devido aos prejuízos causados pela criopreservação como transporte espermático prejudicado e reduzida viabilidade dos mesmos no trato genital da fêmea (Salamon e Maxwell, 1995). A cérvix ovina também significa um entrave para o uso do sêmen congelado devido a suas particularidades anatômicas, como pregas rígidas dispostas em diferentes planos e direções que dificultam sua transposição (Maia, 1999). A IA intra-uterina por laparoscopia viabilizou a exploração do sêmen ovino congelado em animais de elite, porém, o elevado custo desta técnica que requer material e pessoal especializado, inviabiliza sua utilização de forma extensiva a campo.

Outro obstáculo no uso do sêmen ovino congelado é o processo de criopreservação, resultando em fertilidade reduzida, considerando que 40 a 50% da população espermática não sobrevive ao congelamento mesmo utilizando protocolos melhorados (Watson, 2000). A criopreservação do sêmen ovino causa danos ultraestruturais, bioquímicos e funcionais numa proporção expressiva da população espermática. Estas modificações são acompanhadas por redução de motilidade, transporte prejudicado, diminuição da viabilidade dos espermatozóides no trato genital da fêmea e baixas taxas de fertilidade após a inseminação cervical (Salamon e Maxwell, 1995). Os procedimentos envolvidos na congelação do sêmen são conhecidos por danificar as organelas dos espermatozóides principalmente suas membranas (Watson, 1995), e induzir mudanças similares à capacitação e a reação do acrossomo (Bailey et al., 2000; Watson, 1995).

O processo de criopreservação deve ser considerado como uma seqüência de eventos, cada qual possuindo diferentes efeitos sobre as células espermáticas. Desta forma, a queda rápida de temperatura durante a refrigeração do sêmen de +30°C para 0°C causa um tipo específico de estresse, conhecido como choque térmico (Watson, 2000), relacionado a

mudanças de fase nos lipídios da membrana, bastante diferente dos transtornos causados pela congelação e descongelação, os quais incluem estresses mecânicos e osmóticos.

O choque térmico pode diminuir de forma irreversível a motilidade espermática e a sua atividade metabólica (White, 1993), prejudica a permeabilidade seletiva da membrana ao Ca^{2+} (Bailey, 2000). A entrada de Ca^{2+} na célula durante a refrigeração contribui para mudanças semelhantes à capacitação e eventos de fusão entre a membrana plasmática e membrana acrossomal externa, como uma reação desorganizada (Watson, 2000).

O grau de severidade do choque térmico varia conforme as espécies dependendo dos seus componentes de membrana plasmática, sendo inversamente proporcional à quantidade de colesterol. A susceptibilidade ao choque térmico também parece relacionar-se ao grau de saturação das cadeias hidrocarbonadas, desta forma, espermatozoides mais susceptíveis ao choque térmico como o suíno (o mais sensível), ovino e bovino possuem uma taxa mais alta de ácidos graxos insaturados, enquanto que os mais resistentes como os de coelhos, cães e humanos possuem taxas mais baixas. A ocorrência do choque térmico pode ser prevenida controlando a taxa de refrigeração do sêmen e pela adição de componentes protetores aos diluentes (Parks, 1997; Foote, 1984).

Os métodos de criopreservação de sêmen utilizados fora das centrais de congelamento, ou seja, a campo, são sistemas que trabalham com materiais simples como caixas de isopor contendo gelo ou refrigeradores domésticos para a realização da refrigeração e para a congelação utilizam caixas de isopor com nitrogênio líquido (N_2). Esta técnica tem se mostrado viável, porém, de difícil padronização das curvas de refrigeração e congelação, uma vez que dependem do material utilizado (modelo do refrigerador, tipo da caixa de isopor, quantidade de gelo, nível de N_2 e outros). Cada vez mais, vêm sendo introduzidos no mercado brasileiro aparelhos eletrônicos automatizados para criopreservação de sêmen, esses equipamentos apresentam como principal característica a programação de ritmos de refrigeração e congelação homogêneos, assegurando a padronização dessas curvas.

Tendo em vista que o ritmo de refrigeração do sêmen pode minimizar o choque térmico e seus danos às células espermáticas, como a indução prematura da capacitação e reação acrossomal, acredita-se que os resultados da congelação poderiam ser incrementados utilizando-se taxas de refrigeração mais lentas e homogêneas. Rodello (2006) demonstrou êxito no controle da taxa de refrigeração do sêmen ovino utilizando bolsas plásticas contendo água, obtendo uma queda de temperatura média de $0,5^\circ\text{C}/\text{min}$.

O presente estudo tem como objetivo avaliar diferentes sistemas de refrigeração de sêmen ovino e seus efeitos na qualidade do sêmen criopreservado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Os espermatozóides

Os espermatozóides são formados nos testículos (Franca et al., 2005; de Rooij e Russel, 2000) e são maturados nos epidídimos (Dacheux et al., 2005; Dacheux & Dacheux, 2002). Após a ejaculação, os espermatozóides devem alcançar o istmo do oviduto ipsilateral onde ocorreu a ovulação (Rodriguez-Martinez et al., 2005; Blandau, 1973; Hunter, 1996). Neste local, os espermatozóides capacitados podem se ligar à zona pelúcida do oócito (Rath et al., 2005; Dunbar et al., 1994). O local da união induz à reação do acrossomo e os espermatozóides móveis e hiperativos penetrarão na zona pelúcida (Flesch & Gadella, 2000). Finalmente as células espermáticas irão se ligar e se fundir com o oolema (Evans & Florman, 2002). Após a fertilização, o DNA condensado do espermatozóide se desdobra e o pró-núcleo masculino é formado e se funde com o pró-núcleo feminino e desta maneira o genoma diplóide do novo indivíduo é formado (Silva & Gadella, 2005).

Portanto, para se obter sucesso na concepção, os espermatozóides com capacidade fecundante devem possuir membranas e organelas funcionais competentes e um genoma haplóide intacto. Nas técnicas de reprodução assistida (TRA), como a IA e a FIV, os espermatozóides não são introduzidos diretamente no trato genital da fêmea durante a ejaculação, mas são primeiramente coletados em recipientes tanto pelo uso da vagina artificial quanto pela eletroejaculação. O sêmen coletado é lavado, diluído, resfriado, congelado e até mesmo armazenado por longos períodos de tempo até vir a ser depositado no trato genital da fêmea, como no caso da IA.

Todas as etapas do processamento do sêmen podem causar danos no DNA, membranas e organelas. A fim de se alcançar melhores resultados de fertilidade é necessário avaliar a qualidade desses espermatozóides antes da sua utilização nas TRA.

2.1.1 Membrana Plasmática

A membrana plasmática do espermatozóide cerca toda a célula, mantendo suas organelas e componentes intracelulares juntos e, por meio de suas características semi-permeáveis mantém um gradiente químico de íons e outros componentes solúveis.

Segundo Singer e Nicholson (1972), o modelo estrutural básico da membrana espermática é igual ao modelo biológico organizado em um mosaico fluído, formado por duas camadas de fosfolipídios, não sendo uma estrutura contínua seria interrompida por numerosas proteínas integrantes, as quais estariam intercaladas em vários graus dentro dessa estrutura. Na maior parte da membrana, a organização de lipídios, glicolipídios, proteínas e glicoproteínas se apresentam de maneira assimétrica com relação à distribuição de moléculas específicas nas faces externa e interna.

Os lipídios são responsáveis pela integridade estrutural, as proteínas são as principais responsáveis pela ocorrência da maioria dos processos dinâmicos e os carboidratos desempenham importante papel nas interações entre as células (Amann e Graham, 1993). Na superfície extracelular da membrana plasmática existem numerosos carboidratos que são ligados a proteínas da membrana plasmática (glicoproteínas) ou lipídios específicos que são coletivamente conhecidos como glicocálices. Tem sido proposto que os glicocálices possuem papel fundamental na interação espermatozóide-oócito por que é a parte dos espermatozóides que primeiro entra em contato com o oócito (Gadella et al., 2001).

Embora a composição lipídica da membrana plasmática varie consideravelmente entre as diferentes espécies mamíferas, em geral, contém aproximadamente 70% de fosfolipídios, 25% de lipídios neutros e 5% de glicolipídios (Mann e Lutwak-Mann, 1981). Os componentes fosfolipídicos da sua membrana plasmática estão distribuídos assimetricamente entre os dois folhetos da bicamada lipídica (Harrison e Gadella, 1995; Nolan et al., 1995), onde a fosfatidilserina (PS) e a fosfatidiletanolamina (PE) localizam-se na camada interna, ao passo que a esfingomiéline (SM) e a fosfatidilcolina (PC) estão localizadas no folheto externo da membrana (Hammerstedt et al., 1990; Gadella et al., 1999). Variações na composição de lipídios neutros são encontradas entre as diferentes espécies, indivíduos da mesma espécie e ejaculados do mesmo indivíduo. O conteúdo de colesterol da membrana plasmática é o fator mais variável (Flesch e Gadella, 2000), e está diretamente relacionada com a taxa de capacitação, possivelmente porque ele deve ser retirado da mesma durante esse processo (Yanagimachi, 1994; Frits et al., 2000). Os espermatozóides ovinos possuem uma taxa mais

alta de ácidos graxos poliinsaturados e saturados e uma menor proporção de colesterol e fosfolipídios do que as outras espécies (Evans e Maxwell, 1987).

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

A refrigeração do sêmen, como etapa anterior a congelação, implica na exposição dos espermatozóides a uma redução gradual de temperatura, as membranas plasmáticas respondem a esse estresse apresentando uma transição de fase lipídica (Watson, 2000; Holt, 2000). A fase de transição se dá por uma reorganização das cadeias hidrocarbonadas, que de estado fluido e desordenado passam para o estado de gel, com uma organização mais acentuada (Stryer, 1992), tornando as membranas susceptíveis a rupturas.

2.1.2 Capacitação espermática

A membrana plasmática do espermatozóide passa por significativas mudanças bioquímicas durante seu trânsito ao longo do epidídimo. Além da maturação epididimária, os espermatozóides mamíferos devem passar por uma série de modificações bioquímicas e funcionais que ocorrem no trato genital da fêmea conhecida como capacitação espermática (Tulsiani, 1997).

Os principais fenômenos relacionados à fecundação do gameta feminino são: a capacitação espermática e a reação acrossomal. A fertilização é resultado destes eventos moleculares em que os espermatozóides capacitados se ligam ao oócito e realizam uma série de outros eventos programados antes da penetração na zona pelúcida e fusão com o óvulo (Abou-Haila e Tulsiani, 2000). O processo de capacitação ocorre fisiologicamente no útero, especificamente na região do istmo do oviduto (Hafez e Hafez, 2000) e precede a reação do acrossomo. A capacitação é necessária para que os espermatozóides tornem-se capazes de encontrar o oócito, ligarem-se a zona pelúcida e iniciarem a reação do acrossoma (Saling e Storey, 1979).

Os mecanismos da capacitação espermática estão associados com modificações na membrana plasmática e na concentração intracelular de íons. Estas modificações envolvem a remoção ou a inativação de fatores decapacitantes da superfície do espermatozóide; mudanças na localização, estrutura molecular e na mobilidade de proteínas; adsorção espermática de

proteínas do trato da fêmea; alterações na composição lipídica da membrana e em particular na proporção entre colesterol e fosfolípidios; aumento do cálcio, sódio e do pH intracelular; produção de espécies reativas de oxigênio; aumento do AMPc e da fosforilação da proteína tirosina (Medeiros et al., 2002).

A capacitação resulta de mudanças moleculares múltiplas nos componentes protéicos, glicoprotéicos e lipídicos da membrana, que modificam os canais de íons no plasmalema. Estas modificações permitem o fluxo de íons transmembrana, importante no início da capacitação, hipermotilidade e reação acrossomal. (Tulsiani, 1997).

Uma das primeiras etapas da capacitação espermática é a perda de colesterol da membrana plasmática. Este efluxo de colesterol induz a reorganização lipídica da membrana plasmática, aumentando assim sua permeabilidade ao Ca^{2+} , HCO_3^- e K^+ . Quando determinada quantidade de colesterol for removida, a membrana torna-se instável com habilidade de fusão com a membrana acrossomal externa, resultando na reação do acrossoma (Purdy e Graham, 2004).

A taxa de capacitação espermática está relacionada com a taxa de efluxo do colesterol da membrana plasmática. Assim, espermatozoides dos humanos e de bovinos com alto conteúdo de colesterol requerem um maior período para se capacitarem (respectivamente, 8 e 6 horas); por outro lado, os espermatozoides dos suínos e dos ovinos com baixo conteúdo do colesterol, requerem unicamente 1 ou 2 horas para a capacitação (Yanagimachi, 1994; Frits et al., 2000).

2.1.3 Reação Acrossômica

A reação do acrossomo é um processo exocitótico do espermatozoide, absolutamente necessário para que ocorra a fecundação. Somente espermatozoides acrossomos reagidos estão aptos a atravessar a zona pelúcida, ligar-se a membrana plasmática do oócito e se fundir com o gameta feminino. A reação do acrossomo leva a liberação de uma variedade de enzimas hidrolíticas e proteolíticas, principalmente a acrosina e a hialuronidase, as quais são essenciais para a penetração do espermatozoide na zona pelúcida do oócito (Yanagimachi, 1994). A reação acrossomal resulta na modificação de algumas proteínas da membrana plasmática no segmento acrossomal equatorial e pós-equatorial num nível necessário para a fusão com a membrana do oócito (Patrat et al., 2000).

O acrossomo é um derivado de Golgi relativamente largo, semelhante a um lisossoma que recobre o núcleo na região apical da cabeça do espermatozóide (Abou-Haila e Tulsiani, 2000). Embora o acrossomo seja cercado por uma membrana contínua, normalmente ele é descrito como sendo constituído de uma membrana interna e outra externa. A reação do acrossomo envolve múltiplas fusões entre a membrana acrossomal externa e a membrana plasmática da região anterior da cabeça espermática, extensas formações de vesículas na membrana e a exposição da membrana acrossomal interna e dos conteúdos acrossomais (Yanagimachi, 1994).

In vivo, a reação do acrossomo é induzida por uma glicoproteína da zona pelúcida, a ZP3, a qual pode atuar como um ligante para um ou mais receptores da membrana plasmática do espermatozóide (Wassarman, 1999). Embora a zona pelúcida seja o principal indutor fisiológico da reação acrossomal, algumas evidências indicam que a progesterona, secretada pelas células do cumulus e presente no líquido folicular, seja um importante co-fator nesse processo exocitótico (Osman et al., 1986).

O cálcio extracelular é um requerimento absoluto para a reação do acrossomo (Blackmore et al., 1990; Florman et al., 1989). Seu recrutamento é induzido pela zona pelúcida e progesterona, que estimulam um influxo de cálcio para o interior do espermatozóide, levando a um grande e rápido aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} (Patrat, 2000).

Uma vez induzida, a reação do acrossomo é resultado de uma cascata de sinais intracelulares, bem estabelecidos, embora a seqüência exata de eventos ainda não esteja completamente elucidada (Patrat, 2000).

2.2 Etapa da Refrigeração do sêmen

A refrigeração do sêmen diluído parte de temperaturas próximas a $+37^{\circ}C$ para temperaturas entre $+5^{\circ}C$ e $0^{\circ}C$, período este de adaptação do espermatozóide para a redução de seu metabolismo (Mazur, 1984). Tradicionalmente, a fase de equilíbrio tem sido considerada como o tempo total em que o espermatozóide permanece em contato com o glicerol e outros componentes do diluente antes da congelação, estabelecendo um balanço entre o meio intra e extracelular (Salamon e Maxwell, 1995). Quando a diluição do sêmen é realizada em uma única etapa, a glicerolização começa aos $30^{\circ}C$ sendo recomendado um período de 90 a 120 minutos de refrigeração a $5^{\circ}C$ antes da congelação (Evans e Maxwell, 1987).

A maioria dos estudos sobre refrigeração e congelamento de sêmen ovino não citam as taxas de refrigeração utilizadas, portanto, não há uma padronização quanto ao ritmo e tempo de refrigeração, em muitos casos utilizam-se períodos que variam de uma hora (Paulenz et al., 2002), uma hora e meia (Gonzalez, 1996), duas horas (Bag et al., 2002; Gil et al., 2003), quatro horas (Mathur, 1991) e de quatorze horas (El-Alamy e Foote, 2001).

A refrigeração do sêmen pode ser realizada em refrigeradores em temperaturas próximas de +5°C, em garrafas térmicas, caixas de isopor ou em outros recipientes isolados contendo gelo ou água resfriada. No caso do refrigerador, as palhetas são primeiramente colocadas num frasco contendo água a 30°C e então são transferidas para o refrigerador. A taxa de refrigeração pode ser regulada pelo tamanho do frasco e pela quantidade de água que circunda as palhetas. Quando a refrigeração é feita em garrafas térmicas ou em isopor, as palhetas devem ser protegidas por algodão hidrofílico ou papel e então colocadas em bolsas plásticas vedadas a fim de evitar choque térmico nos espermatozoides. A utilização de água congelada em pequenas garrafas constitui um método mais seguro do que o uso de gelo picado (Evans e Maxwell, 1987).

A refrigeração rápida do sêmen de 30°C para temperaturas próximas a 0°C pode induzir a um estresse letal em algumas células, proporcional a taxa de refrigeração, intervalo de temperatura e ao limite de temperatura, conhecido como choque térmico. Portanto, a refrigeração do sêmen deve ser processada de maneira cuidadosa (Watson, 2000). A refrigeração aumenta a permeabilidade das membranas espermáticas, afetando a regulação do cálcio e conseqüentemente a função da célula (Watson, 2000), havendo também redução da motilidade na descongelamento (Medeiros, 2002). A taxa de refrigeração do sêmen diluído pode influenciar significativamente a sobrevivência espermática após a congelamento (Salamon e Maxwell, 2000).

Anel et al., 2003 avaliaram três métodos de congelamento para sêmen ovino, utilizando técnicas de diluição e glicerolização em uma e duas etapas. No primeiro método, o sêmen foi refrigerado à 5°C utilizando-se uma taxa de refrigeração com queda de temperatura de 0,3°C/min, diluição em duas etapas com adição de 4% de glicerol na segunda fração. No segundo, utilizaram na refrigeração uma queda de temperatura de 0,2°C/min, diluição em uma etapa com adição de 3% glicerol à 35°C. No terceiro método o ritmo de refrigeração foi de 0,25°C/min adicionando 2% de glicerol em duas etapas à +35°C e +5°C, totalizando 4%. Nos dois primeiros métodos foi utilizado um período de equilíbrio à 5°C de duas horas e o método três permaneceu estabilizando à 5°C por uma hora. Após o período de refrigeração e equilíbrio, o terceiro método caracterizado por uma curva de refrigeração de 0,25°C

proporcionou uma melhor motilidade espermática ($89,1 \pm 8,0$; $P < 0,05$) em relação aos outros métodos (um $84,3 \pm 8,2$ e dois $87,6 \pm 7,6$).

Rodello (2006) avaliou um sistema automatizado de refrigeração e congelamento de sêmen, TK 3000[®], comparativamente ao sistema de refrigeração e congelamento pelo método geladeira/vapor de nitrogênio líquido. Na refrigeração em geladeira utilizou-se o refrigerador Minitüb[®] 518C, onde as palhetas foram colocadas entre bolsas plásticas contendo água, a fim de controlar o resfriamento gradativo de 32°C para 5°C, totalizando 90 minutos. Para a refrigeração com controle automatizado, utilizou-se o equipamento TK 3000[®] programado para executar uma queda de temperatura de 0,5°C/min, iniciando em 32°C até 5°C com tempo total de refrigeração de 90 minutos. Neste trabalho, as curvas de refrigeração dos dois sistemas foram monitoradas com o uso de um termômetro digital, cujo sensor de temperatura foi inserido dentro da palheta. Verificou-se que os ritmos de refrigeração em geladeira e automatizado, apresentaram queda de temperatura gradativa, com média de 0,5°C/min. Comparando-se os sistemas de refrigeração em geladeira e com controle automatizado após 90 minutos, não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os sistemas para os parâmetros avaliados.

2.3 Etapa da congelamento do sêmen

A criopreservação induz a uma série de estresses osmóticos, químicos e mecânicos (Hammerstedt et. al., 1990). A crioinjúria possui alguns componentes dentre eles, dano direto a célula devido aos cristais de gelo e outro dano causado pelo aumento na concentração de solutos conforme mais gelo vai sendo formado (Pegg, 2002). Quando uma solução é submetida a temperaturas abaixo do ponto de congelamento, cristais de gelo são formados fora da célula, solutos se concentram na fração restante de água o que aumenta a pressão osmótica extracelular. A proporção de água cristalizando e a força osmótica da solução que resta dependem da temperatura, quanto mais baixa a temperatura menor será a fração não congelada e, portanto maior a força osmótica dessa solução. A duração da exposição do espermatozóide a estes eventos pode ser minimizada por uma taxa de congelamento rápida. No entanto, a taxa de congelamento deve ser lenta o suficiente para permitir que a água deixe a célula por osmose prevenindo assim formação intracelular de gelo, a qual é potencialmente letal (Watson, 2000). As membranas espermáticas são altamente sensíveis aos estresses osmóticos. Acredita-se que o importante não seja a permeabilidade à água, mas sim a taxa de

deslocamento requerida pela membrana para se adaptar as mudança de volume e isto pode afetar as ligações com o cito esqueleto (Watson, 1995). Está bem estabelecido que um agente crioprotetor, como o glicerol é indispensável no congelamento de sêmen, pois ele atua primeiramente reduzindo a quantidade de gelo formada em temperaturas logo abaixo de 0°C. Por outro lado, uma concentração muito alta do crioprotetor pode causar danos osmóticos e tóxicos. Os diluentes devem possuir pH e osmolaridade adequados (Salamon e Maxwell, 2000).

Existem várias razões que justificam a diminuição da fertilidade do sêmen congelado, os danos criogênicos podem ser morfológicos ou bioquímicos resultado em disfunção dos espermatozóides, embora o estresse físico nas membranas seja o fator mais limitante. Mudanças volumétricas (Devireddy et. al., 2002), oxidação de lipídios, (Browers et. al., 2005) e prejuízo aos mecanismos de permeabilidade seletiva da membrana espermática são decorrentes dos estresses da congelação. A membrana plasmática e a membrana acrossomal são as regiões mais sensíveis do espermatozóide (Rodriguez-Martinez et. al., 1993; Grondahl et. al., 1994).

No carneiro, alguns aspectos do processo resfriamento-congelamento-descongelamento, tornam a membrana espermática com maturação excessiva, e aumenta a proporção de espermatozóides capacitados e acrossomo reagidos (Salamon e Maxwell, 1995; Holt, 2000). A curva de congelamento ideal deve ser lenta o suficiente para prevenir a formação intracelular de gelo no espermatozóide, mas também tem que ser rápida a ponto de minimizar os efeitos nocivos de uma exposição prolongada a um ambiente hiperosmótico, a altas concentrações de solutos (Holt, 2000). Normalmente, os protocolos de criopreservação de sêmen têm utilizado taxas de congelação que vão desde -10 à -100°C por minuto, conseguindo boas taxas de sobrevivência pós criopreservação (Salamon e Maxwell, 2000).

Watson (2000) citou que as células espermáticas são normalmente congeladas por taxas rápidas com quedas de temperatura entre 15° e 60°C/min, empiricamente determinadas como as curvas de congelamento com os melhores resultados na sobrevivência espermática.

Os espermatozóides ovinos quando envazados em palhetas toleram variações de velocidade de temperaturas. Geralmente, durante os processos de congelamento e descongelamento, os danos de membranas são produzidos entre -15°C e -60°C e, nos espermatozóides ovinos, a maioria dos danos ocorre entre -10°C e -25°C (Salamon e Maxwell, 1995).

O'Neill observou que o sêmen congelado rapidamente entre +5°C positivos até 25°C negativos, num ritmo de congelamento de 5°C/min, apresentou melhor viabilidade, atividade mitocondrial e integridade de acrossoma quando comparado a congelação lenta (-0,5°C).

Byrne et. al. (2000) examinaram os efeitos de duas curvas de congelamento sobre a fertilidade dos espermatozoides ovinos *in vivo* e *in vitro*. Utilizaram congelação automatizada, no primeiro tratamento foi utilizada uma curva lenta partindo de +5°C para 25°C negativos com um descenso de 0,5°C/min e no segundo tratamento uma curva rápida com queda de 5°C/min, quando ambos os tratamentos atingiam a temperatura de -25°C passava-se a se usar um ritmo de congelamento com queda de 50°C/min até 130°C negativos. Observaram na produção *in vitro* de embriões que o sêmen congelado com ritmo rápido produziu uma taxa de clivagem significativamente mais alta do que com o congelamento lento (57% e 26%, respectivamente; $P < 0,001$) e não obtiveram diferença entre os regimes de congelamento na porcentagem de acrossomos intactos, danificados ou reagidos no pós-descongelamento. Na fertilidade *in vivo*, a curva de congelamento rápida aliada à inseminação intrauterina proporcionou 60% de prenhez quando comparada à curva lenta e inseminação intrauterina 40% ($P < 0,001$), ritmo de congelamento rápido associado à inseminação cervical com 13% ($P < 0,001$) e o ritmo lento com inseminação cervical 0%. Ficou evidenciado que a curva de congelamento rápida usada até -25°C aumentou a fertilidade do sêmen ovino. Isto também foi observado por Kumar et. al. (2003) num estudo comparando a eficiência de duas máquinas, um congelador comercial e outro experimental, e o efeito de três curvas de congelamento sobre o sêmen bovino, ovino e suíno. Após a refrigeração até +5°C, as amostras de sêmen passaram por uma queda de temperatura de 5°C/min até -5°C, e de -5°C até atingirem -50°C foram testados três ritmos de congelamento, 1, 30 e 50°C/min. As características do sêmen ovino, viabilidade e integridade acrossomal, diferiram significativamente entre as taxas de congelação, sendo o descenso de 30°C/min o melhor para o sêmen ovino, minimizando os danos da criopreservação.

Anel et al. (2003) avaliaram três métodos de congelamento de sêmen ovino, no primeiro utilizou-se diluição em duas etapas, glicerolização na segunda diluição aos +5°C e congelamento automatizado com uma curva de congelamento com uma queda de 20°C/min. O segundo método constitui de diluição única e uma concentração de glicerol de 3% e congelamento em vapor de nitrogênio líquido a 5 centímetros da sua superfície. No terceiro método realizou-se a adição do glicerol em duas etapas, 2% na primeira fração do diluente e mais 2% na segunda fração totalizando 4% de glicerol e congelamento automatizado com descenso de 20°C/min. O método três apresentou melhores resultados para motilidade total

75,8 ± 7,8% (P<0,05), contra 64,1 ± 10,8% e 63,2 ± 11,1% dos métodos 1 e 2 respectivamente; e motilidade progressiva 55 ± 6,7% (P<0,05) em comparação aos métodos 1 (45,9 ± 9,2) e 2 (45,4 ± 10,5%). A avaliação da viabilidade espermática e do status acrossomal usando sondas fluorescentes não mostrou diferenças entre os métodos (P>0,05), método um (46,5 ± 4,5), dois (47,9 ± 4,9) e três (50,7 ± 9,2). No teste de fertilidade in vivo o método três apresentou as maiores porcentagens de prenhez com 67,28% em comparação aos métodos 1 e 2, com 51,14% e 57,92% respectivamente (P<0,05).

Rodello (2006) avaliou e comparou um sistema automatizado de refrigeração e congelamento de fabricação nacional TK 3000® ao sistema de refrigeração e congelamento pelo método geladeira/vapor de nitrogênio líquido. A congelamento foi realizada em duas fases: de 5°C até 80°C negativos com um ritmo de 15°C/min e de 80°C negativos até 120°C com queda de 10°C, com cerca de nove minutos e trinta segundos de processamento. Ao final da refrigeração em geladeira e com controle automatizado, realizou-se trocas de palhetas entre os sistemas derivando quatro combinações de congelamento. Os tratamentos refrigeração em geladeira e congelamento em vapor de nitrogênio líquido, refrigeração em geladeira e congelamento com controle automatizado, refrigeração com controle automatizado e congelamento no vapor de nitrogênio líquido e refrigeração e congelamento com controle automatizado não diferiram no parâmetro motilidade pós-descongelamento com 50,1 ± 9,9; 42,1 ± 8,1; 46,8 ± 10,4; 50,3 ± 10,7 (P>0,05), respectivamente. Os quatro tratamentos também não diferiram no vigor pós-descongelamento com 2,2 ± 0,3; 2,3 ± 0,3; 2,2±0,3; 2,2±0,3 (P>0,05), respectivamente, para refrigeração em geladeira e congelamento em vapor de nitrogênio líquido, refrigeração em geladeira e congelamento com controle automatizado, refrigeração com controle automatizado e congelamento no vapor de nitrogênio líquido e refrigeração e congelamento com controle automatizado. A avaliação da integridade das membranas espermáticas, através do uso de sondas fluorescentes, não apresentou diferenças entre os quatro métodos de congelamento (P>0,05). O sistema automatizado obteve qualidade seminal equivalente ao processado no sistema geladeira/vapor de nitrogênio líquido.

2.4 Avaliações do sêmen pós-descongelamento

A avaliação da qualidade do sêmen pós-descongelamento tem o objetivo de prever seu potencial fecundante, sendo na prática, de grande valia. O método ideal para a avaliação do sêmen congelado seria sua utilização na fecundação in vivo, através da IA e posterior

verificação do índice de prenhez. Porém, o tempo necessário para essa avaliação, seus custos, assim como as possíveis interações do rebanho, limitam sua aplicação como rotina.

Várias características, tais como, motilidade, viabilidade, modificações ultra-estruturais e bioquímicas dos espermatozóides descongelados, têm sido relacionadas à fertilidade com graus variáveis de sucesso. Nenhum teste utilizado de forma isolada é confiável, mas a partir da combinação de vários testes, torna-se possível estimar com maior acuidade o potencial fecundante do sêmen descongelado. Testes de motilidade e viabilidade do sêmen descongelado são os mais utilizados, pois fornecem uma adequada estimativa da qualidade do sêmen (Evans e Maxwell, 1987).

2.4.1 Motilidade e vigor

A motilidade e vigor são testes rotineiramente utilizados para avaliar a viabilidade dos espermatozóides. Para o sêmen ovino congelado, uma amostra é considerada dentro do padrão quando apresentar motilidade progressiva igual ou superior a 40% e vigor igual ou superior a 3 na pós-descongelação (CBRA, 1998).

Estas avaliações consistem de estimativas subjetivas por meio de microscopia. Este método é simples e de baixo custo, no entanto, apresenta algumas desvantagens como o fato da estimativa variar entre examinadores, a concentração espermática pode prejudicar a estimativa e a porcentagem de células móveis diminuir em função da temperatura (Malmgren, 1997).

2.4.2 Morfologia espermática

Os defeitos dos espermatozóides podem ser estimados em maiores ou menores. Esta classificação coloca menos ênfase no local onde surgem os defeitos, mas focaliza os seus efeitos sobre a fertilidade. Desta forma, os defeitos maiores são aqueles associados com um maior prejuízo potencial fecundante, enquanto os defeitos menores possuem menor efeito sobre a fertilidade (Blom, 1973).

É pouco provável que a criopreservação induza defeitos maiores na morfologia do espermatozóide. Porém, técnicas com manipulação e condições de temperatura inadequadas na refrigeração e congelamento, podem induzir mudanças irreversíveis como dano acrossomal ou defeitos da cauda do espermatozóide (Graham, 1996).

Para a avaliação das características morfológicas dos espermatozoides podem ser utilizados esfregaços corados ou preparações úmidas, as mais indicadas. De forma complementar, pode-se empregar colorações específicas para determinadas partes do espermatozoide, a fim de melhorar a acuidade do exame. Na avaliação da morfologia do sêmen ovino pós-descongelamento, considera-se uma amostra dentro dos padrões quando esta apresentar menos de 20% de defeitos totais e menos de 10% de defeitos maiores (CBRA, 1998).

2.4.3 Teste de Termo-Resistência

Este teste consiste em submeter uma amostra de sêmen descongelado a incubação em temperatura de 38°C durante cinco horas, para posterior avaliação da motilidade progressiva (Dimitropoulos, 1967). Na avaliação do sêmen bovino, os testes de termo- resistência lento (5 horas de incubação a 38°C), rápido (30 minutos a 46°C) e estressado (24 horas a 5°C) demonstram correlação entre o número de espermatozoides ativos após o teste e a taxa de fecundação, permitindo com isso a eliminação prévia de amostras de sêmen inadequadas, ou seja, as que apresentam motilidade inferior a 20% ao final da incubação (Dimitropoulos, 1967; Jondet et al., 1978). Moraes (1996) verificou que, diferentemente dos bovinos, os testes de termoresistência lento e rápido não são equivalentes para avaliação do sêmen ovino congelado.

Em ovinos, quando se utiliza o teste de termoresistência lento (5 horas de incubação a 37°C), é aconselhável utilizar sêmen com no mínimo 30% de espermatozoides com motilidade progressiva no final da incubação (CBRA, 1998; Evans e Maxwell, 1987). Neste sentido, Luz et al.(2000) verificaram o valor de alguns atributos para a avaliação da qualidade do sêmen ovino congelado em pellets, através da prenhez de ovelhas inseminadas intrauterinamente por laparoscopia. Para isso, utilizaram amostras de sêmen com diferentes padrões de qualidade como a média da motilidade progressiva (MP) durante as 5 horas de incubação (0,1,2,3,4 e 5 horas) a 37°C e MP ao final de 5 horas de incubação. Seus resultados indicaram que os percentuais de células com motilidade progressiva média, bem como a motilidade progressiva no final do período de incubação, afetam significativamente os resultados de prenhez, obtendo percentuais de prenhez entre 64,4 e 72,3% quando as amostras de sêmen apresentaram uma MP média entre 20% e acima de 40% e, 61,1 e 78,5% de prenhez com MP superior a 10% e 30% após 5 horas de incubação.

2.4.4 Teste de Termo-Resistência adaptado por Paganini Filho

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

2.4.5 Avaliação da viabilidade espermática e estado acrossomal com o uso da coloração dupla Trypan blue e Giemsa

Um dos métodos mais utilizados que permite avaliar a viabilidade e o status acrossômico é o uso da coloração dupla associando o corante Giemsa e o Trypan blue. Nesse método, o Trypan blue detecta a população de espermatozoides vivos e mortos, e o Giemsa verifica a presença ou ausência do acrossomo (Didion et al., 1989). Os espermatozoides vivos não se coram e os mortos se coram em azul na região pós-acrossomal. Nas células onde o acrossomo está presente este se cora de roxo escuro brilhante e aquelas sem acrossomo não se coram.

A avaliação do status acrossomal do sêmen criopreservado, é necessária para verificar os danos causados pelo processo de criopreservação nas células espermáticas. Segundo Zúccari (2002) a análise do percentual de retenção do acrossomo tem boa correlação com a fertilidade. Além disso, esse autor ressalta equivalência entre a percentagem de espermatozoides móveis e o número de células com acrossomo intacto.

As vantagens da coloração dupla são: avaliação do esfregaço sob microscopia de campo claro, fixação simples e rápida ao ar, com boa preservação da membrana plasmática íntegra e os esfregaços são permanentes podendo ser estocados e posteriormente avaliados.

2.4.6 Integridade da membrana plasmática

A integridade da membrana plasmática do espermatozoide é um requisito fundamental para a sua viabilidade e, conseqüentemente, para uma predição do potencial de fecundação.

Geralmente, viabilidade espermática era avaliada por meio de colorações supra-vitais, as quais consistem exclusivamente de eosina ou esta combinada com nigrosina. Estas não são

apropriadas para avaliações em amostras de sêmen criopreservado, devido à presença do crioprotetor glicerol, o qual interfere na coloração (Garner et al., 1986).

Existem muitas técnicas para a avaliação das membranas, utilizando sondas fluorescentes permeáveis e impermeáveis à membrana, detectando assim as membranas danificadas. A combinação das sondas fluorescentes e microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo tem provado ser avaliações objetivas e acuradas (Harrison e Vickers, 1990; Garner et. al, 1995).

Os corantes fluorescentes com afinidade para DNA, não são permeáveis às células com membranas intactas e, portanto, coram apenas as células mortas de vermelho. Fazem parte deste grupo o brometo de etídeo, iodeto de propídio (IP) e hidroetidine, entre outros (Zúccari, 1998). O diacetato de carboxifluoresceína é um corante permeável à membrana, o qual é rapidamente convertido pelas esterases intracelulares num derivado verde fluorescente. Quando usados em combinação, as células com membranas danificadas coram-se de vermelho conforme o IP penetra na célula enquanto as esterases intracelulares deixam a mesma, deste modo, o FDA não é convertido no seu derivado verde. As células com membranas intactas fluorescem de verde, pois permitem que suas esterases convertam o FDA enquanto evitam a entrada do IP (Graham e Mocé, 2005).

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar diferentes sistemas de refrigeração e seus efeitos na qualidade do sêmen ovino criopreservado em palhetas.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as taxas de refrigeração do sêmen obtidas em diferentes sistemas.
- Comparar o desempenho de um balcão refrigerador frente à refrigeração realizada em refrigerador doméstico, na qualidade do sêmen ovino in vitro.
- Avaliar o efeito de um sistema isolante com água na refrigeração do sêmen ovino realizada em balcão refrigerador e em refrigerad

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abou-Haila, A., Tulsiani, D.R.P. Mammalian Sperm Acrosome: Formation, Contents, and Function. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 2000; 379(2): 173-182.

Amann, R.P., Graham, J.K. Spermatozoal function. **Equine reproduction** 1993: 715-745.

Anel, L., de Paz, P., Alvarez, M., Chamorro, C.A., Boixo, J.C. et. al. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. **Theriogenology** 2003; 60:1293-1308.

Bag, S., Joshi, A., Naqvi, S.M.K., Rawat, P.S., Mittal, J.P. Effect of freezing temperature, at which straws were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrossomal status of ram spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.** 2002; 72:175-183.

Bailey, J.L., Bilodeau, J.F., Cormier, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **J. Androl.** 2000; 21:1-6.

Blackmore, P.F., Beebe, S.J., Danforth, D.R., Alexander, N.J. Progesterone and 17 α hydroxyprogesterone: novel stimulators of calcium influx in human sperm. **J. Biol. Chem.** 1990; 265:1376-1380.

Blandau, R.J. **Gamete Transport in the female mammal.** In: Handbook of physiology, Sect. 7, Endocrinology, vol. II; 1973 (chapter 38).

Blom, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nord. Vet. Med.** 1973;25:382-391.

Brouwers, J.F., Silva, P.F., Gadella, B.M. New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. **Theriogenology** 2005; 63, 458-469.

Byrne, G.P., Lonergan, P., Wade, M., Duffy, P., Donovan, A., Hanrahan, J.P., Boland, M.P. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. **Anim Reprod. Sci.** 2000; 62:265-275.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual de exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2ed, Belo Horizonte, CBRA, 1998.

Dacheux, J.L., Castella, S., Gatti, J.L., Dacheux, F. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. **Theriogenology** 2005; 63:319-41.

Dacheux, J.L., Dacheux, F. **Protein secretion in the epididymis.** In: Robaire B, Hilton BT, editors. The epididymis: from molecules to clinical practice. A comprehensive survey of the efferent ducts, the epididymis and the vas deferens. New York: Kluwer Academic/Plenun Publishers 2002:151-68.

De Rooij, D.G., Russell, L.D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. **J Androl** 2000; 21:776-98.

Didion, B.A., Dobrinsky, J.R, Giles, J.R., Graves, C.N. Staining procedure to detect viability and the true acrossome reaction inspermatozoa of various species. **Gamet Res.**, 1989;22(1):51-57.

Dimitropoulos, E. La signification du test de la thermoresistance dans l'apreciation de la valuer fecondant e du sperme congelé. **Annales de Medecine Veterinaire** 1967; 4: 215-24.

Devireddy, R.V., Swanlund, D.J., Alghamdi, A.S., Duoos, L.A., Troedsson, M.H., Bischof, J.C., Roberts, K.P. **Measured effect of collection and cooling conditions on the motility and the water transport parameters at subzero temperatures of equine spermatozoa.** *Reproduction.* 2002; 124: 643–648.

Dunbar, B.S., Avery, S., Lee, V., Prasad, S., Schwahn, D., Schwoebel, E., et al. The mammalian zona pelucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology, and developmental expression. **Reprod Fertil Dev.** 1994; 6: 331-47.

El-Alamy, M.A., Foote, R.H. Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. **Anim Reprod Sci.** 2001; 65: 245-254.

Evans, J.P., Florman, H.M. The state of the union: the cell biology of fertilization. **Nat Cell Biol.** 2002; 4 (Suppl.):s57-63.

Evans, G., Maxwell, W. M. C. **Salamon inseminación artificial de ovejas y cabras.** Zaragoza: Acribia, 1990. 191p.

Evans, G., and Maxwell, W. M. C. “**Salamon’s Artificial Insemination of Sheep and Goats,**” Butterworths & Co. Ltd., London, 1987, 194p.

Flesch, F.M., Gadella, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochim. Biophys. Acta** 2000; 1469: 197-235.

Florman, H.M., Tombes, R.M., First, N.L., Babcock, D.F. An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevations in internal Ca²⁺ and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis. **Dev. Biol.** 1989; 135:133–146.

Franca, L.R., Avelar, G.F., Almeida, F.F. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology** 2005; 63: 300-18.

Frits, M., Flesch, F.M., Gadella, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta.** 2000; 1469:197-235.

Garner, D.L., Pnkel, D., Jonson, L.A., et al. Assessment function using dual fluorescent staining and flow cytometric analices. **Biology of Reproduction** 1986; 34:127-38.

Garner, D.L., Johnson, L. A. Viability Assessment of Mammalian Sperm Using SYBR-14 and Propidium Iodide **Biology of Reproduction** 1995;53:276-284.

Gadella, B.M., Rathi, R., Brouwers, J.F.H.M. et al. Capacitation and the acrossome reaction in equine sperm. **Anim. Reprod. Sci.** 2001; 68: 249-265.

Gadella, B.M., Miller, N.G.A., Colenbrander, B., van Golde, L.M.G., Harrison, R.A.P. Flow cytometric detection of transbilayer movement of fluorescent phospholipid analogues across the boar sperm plasma membrane: elimination of labeling artifacts. **Mol Reprod Dev** 1999;53:108–25.

Gil, J., Rodríguez-Iraozqui, M., Lundeheim, N., Söderquist, L., Rodríguez-Martínez, H. Fertility of ram semen frozen in Bioexell[®] and used for cervical artificial insemination. **Theriogenology** 2003; 59:1157-1170.

Gonzalez, C.I.M. **Avaliação “in vitro” e “in vivo” de sêmen ovino (*Ovis aries*) congelado em palhetas e “pellets” com diferentes diluidores.** Botucatu, 1996. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Graham, J.K., Mocé, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology** 2005; 64: 492-504.

Graham, J.K. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. **Vet Clin North Am Equine Pract.** 1996; 12(1):119-29.

Grondahl, C., Grondahl, M.L., Hyttel, P., Greve, T. Acrosomal status in fresh and frozen/thawed stallion spermatozoa evaluated by scanning electron microscopy. **Anat. Embryol.** 1994; 190(2):195-200.

Hafez, E.S.E., Hafez, B. **Reproduction in Farm Animals.** 7 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000:509p.

Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., Nolan, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **J Androl** 1990; 11(1):73–88.

Harrison, R.A. & Vickers, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **J. Reprod. Fertil** 1990;88(1):343-52.

Harrison, R.A.P., Gadella, M.B. **Membrane changes during capacitation with special reference to lipid architecture.** In: Fénichel P., Parinaud J., editors. Human sperm acrosome reaction. Paris and Montrouge, France: Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. 1995:45-65.

Holt, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Anim. Reprod. Sci.** 2000; 62:2-33.

Hunter, R.F.H. How, when and where do spermatozoa gain their fertilizing ability in vivo? **Reprod Domest Anim** 1996; 31 51-5.

Jondet, R., Mies Filho, A., Rabadeux, Y. L'épreuve de thermorésistance dans l'appréciation de la valeur du sperm bovin congelé. **Comptes Rendus des Séns de la Société de Biologie,** 1978; 4:764.

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.** 2003; 46:246-253.

Luz, S.L.N., Neves, J.P., Gonçalves, P.B.D. Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica. **Brazilian journal of Veterinary Research and Animal Science.** 2000; 37(2). Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962000000200010&lng=en&nrm=iso

Acesso em: 05/06/2007.

Malmgren, L. Assessing The Quality of Raw Semen: A Review. **Theriogenology** 1997;48:523-530.

Mann, T., Lutwak-Mann, C. **Male Reproductive Function and Semen,** Springer, Berlin, 1981.

Mathur, A.K. Effect of extension rate on the cryosurvival of ram spermatozoa. **Int. J. Anim. Sci.** 1991; 6:82-83.

Mazur, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **Am. J. Physiol. Cell.** 1984; 247(3):125-142.

Medeiros, C.M.O., Forell, F., Oliveira, A.T.D., Rodrigues, J.L. Current Status of Sperm Cryopreservation: Why isn't it Better? **Theriogenology** 2002; 57:327-344.

Mies Filho, A. **Inseminação Artificial**, 6ed. Porto Alegre: Sulina, 1987, v.2, 750p.

Moraes, C.N. **Métodos alternativos para congelamento, descongelamento e avaliação do sêmen ovino em pellets**. Rio Grande do Sul, 1996. 57p. Dissertação (Mestrado). Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.

Nolan, J.P., Magargee, S.F., Posner, R.G., Hammerstedt, R.H. Flow cytometric analysis of transmembrane phospholipid movement in bull sperm. **Biochemistry** 1995;28(34):3907–15.

O'Neill, D.J. **Studies on the cryopreservation of ram spermatozoa**. MSc Agr. Thesis, National University of Ireland, 1998.

Osman, R.A., Andria, M.L., Jones, A.D. Steroids induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1986;160:828–833.

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

Patrat, C., Serres, C., Jouannet, P. The acrosome reaction in human spermatozoa. **Biology of the Cell** 2000;92:255-266.

Paulenz, H., Söderquist, L., Pérez-Pé, R., Berg, K.A. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. **Theriogenology** 2002;57:823-836,2002.

Pegg, D.E. The history and principles of cryopreservation. **Semin. Reprod. Med.** 2002;20 (1), 5–13.

Purdy, P.H., Graham, J.K. Effect of Adding Cholesterol to Bull Sperm Membranes on Sperm Capacitation, the Acrosome Reaction, and Fertility. **Biology of Reproduction** 2004;71:522-527.

Rath, D., Topfer-Petersen, E., Michelmann, H.W., Schwartz, P., Ebeling, S. Zona Pellucida characteristics and sperm-binding patterns of in vivo and in vitro produced porcine oocytes inseminated with differently prepared spermatozoa. **Theriogenology** 2005; 63: 352-62.

Rodello, L. **Validação de Sistema Automatizado de Refrigeração e Congelação de Sêmen Ovino**. Botucatu, 2006. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista-UNESP.

Rodriguez-Martinez, H., Saravia, F., Wallgren, M., Tienthai, P., Johannisson, A., Vazquez, J.M., et al. Boar spermatozoa in the oviduct. **Theriogenology** 2005; 63: 514-35.

Rodriguez-Martinez, H., Ekwall, H., Linde-Forsberg, C. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** 1993; 47, 279–285.

Salamon, S., Maxwell, W.M.C. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Anim. Reprod. Sci.**, 1995; 37:185-249.

Salamon, S., Maxwell, W.M.C. Storage of ram semen. **Anim. Reprod. Sci.** 2000; 62:77-111.

Saling, P.M., Storey, B.T. Mouse gamete interactions during fertilization in vitro: chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrossome reaction. **J. Cell. Biol.** 1979 ;83: 544-555.

Silva, P.F.N., Gadella, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology** 2005;65:958-978.

Singer, S.J., Nicholson, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cells membranes. **Science.** 1972; 175:720-731.

Stryer, L. **Introdução ao estudo das membranas biológicas**. In: __. Bioquímica. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. cap. 12, p. 230-56.

Tulsiani, D.R.P., Yoshida-Komiya, H., Araki, Y. Mammalian Fertilization: A Carbohydrate-Mediated Event. **Biology of Reproduction** 1997;57:487-494.

Watson, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.** 2000; 60-61: 481-492.

Watson, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod. Fert. Develop.** 1995; 7: 871–891.

Wassarman, P.M. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. **Cell** 1999; 96:175–183.

Yanagimachi, R. **Mammalian Fertilization**. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), The physiology of reproduction, Raven Press, New York, 1994;2:189-317.

Zúccari, C. E. S. N. **Avaliação *in vitro* da fertilidade de touros: integridade estrutural da célula espermática**. In ZÚCCARI, C. E. S. N., MARTINS, C. F., DODE, M. A. N., SILVA, A. E. D. F., PIMENTEL, C. A., MELO, N. S. S., Apostila do Curso de Andrologia, Brasília: Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2002: 220.

Zúccari, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina**. Tese de doutorado apresentada em Botucatu, SP, 1998.

6. CAPÍTULO ÚNICO

INFLUÊNCIA DE SISTEMAS DE REFRIGERAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN OVINO CRIOPRESERVADO EM PALHETAS.

Ligia Freitas de Lima^{I*}, Priscilla Moura^{II}, Pedro Ivo Braga Passos^{III}, Diogo Ramos Leal^{III},
Rodolfo Rumpf^{IV}, Jairo Pereira Neves^V

^{I*} Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Produção Animal, da Faculdade de Agronomia e Veterinária – FAV/UnB; Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília – DF, CEP 70 910-900; ligialima@unb.br Autor para correspondência.

^{II} Pós-Graduação na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – FAV/UnB.

^{III} Graduação na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – FAV/UnB.

^{IV} Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia – Cenargen.

^V Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – FAV/UnB.

Trabalho submetido à publicação na revista Ciência Animal Brasileira da UFG, Brasil.

RESUMO

O presente estudo avaliou diferentes sistemas de refrigeração do sêmen ovino, através da aferição e comparação das curvas obtidas assim como seus efeitos sobre a qualidade espermática. Foram avaliados a motilidade, vigor, defeitos morfológicos, viabilidade e estado acrossomal através da coloração dupla trypan-blue/giemsa, ao final dos 90 min de refrigeração, e após a descongelação. Para as análises pós-descongelação, foram utilizados os mesmos parâmetros acrescidos da avaliação da integridade da membrana plasmática (IMP) visualizada através das sondas fluorescentes IP e DIC em microscopia de fluorescência e da avaliação do teste de exaustão ao final quatro horas de incubação do sêmen a 37°C. A refrigeração do sêmen foi realizada em refrigerador doméstico e em balcão, a fim de se controlar a queda de temperatura dos dois equipamentos, as palhetas foram dispostas entre bolsas plásticas contendo água aquecida a 32°C, constituindo quatro sistemas RS (refrigerador sem bolsa), RC (refrigerador com bolsa), BS (balcão sem bolsa) e BC (balcão com bolsa). Os diferentes protocolos resultaram quatro taxas médias de refrigeração -1,4°C/min, -0,4°C/min, -2,9°C/min e -0,45°C/min para RS, RC, BS e BC; respectivamente. Após a refrigeração do sêmen observou-se diferença significativa entre os tratamentos no parâmetro motilidade espermática ($P < 0,05$), com o tratamento BS apresentado a menor percentagem de células móveis (58,1%). As percentagens de espermazóides vivos com acrossomo íntegro e mortos com acrossomo íntegro apresentaram diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$), o tratamento BS obteve a menor média (85,3%) de vivos íntegros e também a maior média de mortos íntegros (14,1%) diferindo dos demais ao final da refrigeração. Houve diferença significativa na percentagem de defeitos morfológicos após a refrigeração ($P < 0,05$), sendo que o tratamento BS foi o que apresentou maior média (15,4%) de defeitos, os sistemas RC (11,5%) e BC (11,1%) apresentaram as menores médias, o RS (13,6%) não diferiu dos demais. Para os demais parâmetros espermáticos pós-refrigeração não foram observadas diferenças significativas. Em relação ao sêmen pós-descongelação, para todos os parâmetros avaliados não foram observadas diferenças significativas. Ao final do teste de exaustão, após quatro horas de incubação, também não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Com base nos resultados concluiu-se que as diferentes taxas de refrigeração, afetaram o sêmen no final da fase de refrigeração. As avaliações pós-descongelação não evidenciaram diferenças significativas entre os protocolos de refrigeração.

Palavras-chaves: ovino, curvas de refrigeração, congelação, descongelação.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the influence of different types of cooling systems upon the post-thawing quality of ram semen, through the measurement and comparison of cooling rates. The parameters were motility, vigor, morphology damages, viability and acrossomal state through the use of Trypan-blue/giemsa coloration, at the end of the 90 minutes of cooling and post-thawing. With regard to the analysis of post-thawed semen, the same parameters were used, in addition to the assessment of the integrity of the plasmatic membrane using de fluorescent stains propidium iodide (PI) and carboxyfluorescein diacetate (CFDA), and the resistant test through incubation of semen at 37° C during 4 hours. The semen refrigeration was carried out in a domestic refrigerator and in a horizontal refrigerator. To control the fall of temperature of the two equipments, the straws were disposed between plastic bags containing water at 32°C, creating four combinations of cooling procedure: RS (refrigerator without bag), RC (refrigerator with bag), BS (horizontal refrigerator without bag) and BC (horizontal refrigerator with bag). The different protocols resulted in four cooling rates: -1.4°C/min, -0.4°C/min, -2.9°C/min and -0.45°C/min, for RS, RC, BS and BC, respectively. At the end of cooling period there was a significant difference among the treatments on the sperm motility, the BS treatment showed the lowest percentage of sperm motility (58.1%). The percentage of live spermatozoa with intact acrosome was different ($P<0.05$) among treatments, the BS treatment had the lower mean (85.3%). The percentage of dead spermatozoa with intact acrosome was,, different ($P<0.05$), the BS treatment had the highest mean (14.1%). There was a significant difference on the percentage of morphological defects at the end of cooling ($P<0.05$); the BS treatment had the highest mean (15.4%), the systems RC (11.5%) and BC (11.1%) resulted in the lower means and the RS (13.6%) was identical to others. To the other sperm parameters post-cooling, there were not differences. Regarding frozen-thawed semen, there were no parameters with differences. At the end of the resistant test period, there was no significant difference among the treatments. On basis of these results, it was concluded that the different cooling rates only affected ram semen at the end of cooling stage. The evaluation of frozen-thawed semen does not show any effect on the different cooling protocols.

Key words: ovine, cooling - rates, frozen, thaw.

6.1 INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (I.A.) aliada à utilização do sêmen congelado é uma biotecnologia que oferece inúmeras vantagens aos sistemas de produção animal, principalmente para os programas de reprodução que visam à multiplicação de indivíduos de alto mérito genético, por conseguinte de alto valor comercial. Embora o sêmen congelado venha sendo utilizado ao longo de 50 anos na indústria bovina, sua utilização na espécie ovina continua sendo limitada (Curry, 2000; Holt, 2000).

Atualmente nas fêmeas ovinas, os melhores índices de fertilidade com sêmen congelado são obtidos após I.A. por via laparoscópica, com deposição do sêmen diretamente no útero. Esta técnica é considerada como a responsável pela expansão do uso do sêmen na espécie (Eppleston e Maxwell, 1993). Por outro lado, tal técnica apresenta limitada aplicação a campo de forma rotineira, pois requer instrumentais de custo elevado e mão-de-obra especializada. A técnica de I.A. cervical surge como alternativa, pois permitiria um uso mais expressivo do sêmen ovino congelado, por ser de baixo custo e de fácil execução. Entretanto, a aplicação cervical também possui suas limitações, como a difícil transposição da cérvix da ovelha com seus anéis tortuosos, inabilidade dos espermatozóides criopreservados em atravessar a cérvix devido à motilidade e viabilidade reduzida no trato genital da fêmea, maturação excessiva das membranas espermáticas, oriundas do processo de criopreservação, o qual promove aumento na população de espermatozóides capacitados e acrossomos reagidos (Salamon e Maxwell, 2000; Maxwell e Watson, 1996).

O processo de criopreservação requer a exposição dos espermatozóides a diversos fatores estressantes, como redução de temperatura, desidratação celular, congelação, descongelação e reidratação. Os métodos utilizados a campo para a criopreservação de sêmen utilizam materiais simples como caixas de isopor com gelo ou refrigeradores para a refrigeração e caixas de isopor com nitrogênio líquido para a congelação. Embora viáveis, apresentam variações nas curvas de refrigeração e congelação. Nos últimos anos vem sendo testados aparelhos automatizados para a criopreservação de sêmen, os quais possuem como principal proposta o fato de proporcionarem curvas de temperatura programáveis e homogêneas. Um ritmo homogêneo e constante é importante não apenas para se evitar o choque térmico nos espermatozóides, como também para a padronização das técnicas e obtenção de partidas mais homogêneas. Rodello (2006), utilizando bolsas de água durante a

refrigeração do sêmen ovino em geladeira, obteve qualidade espermática e queda de temperatura (-0,5°C/min), semelhantes às conseguidas em sistema automatizado.

O processo de congelamento é uma seqüência de eventos (diluição, refrigeração, congelamento e descongelamento) com diferentes fatores prejudiciais aos espermatozoides. Desta forma, a refrigeração causa um tipo específico de alteração relacionada com a mudança de fase dos lipídios da membrana plasmática, diferente das que ocorrem durante a congelamento como estresses osmóticos e mecânicos sobre as células.

Este trabalho teve como objetivo determinar as taxas de refrigeração do sêmen ovino conseguidas em diferentes sistemas, utilizando refrigerador comum e um balcão refrigerador horizontal, avaliar e comparar os efeitos da utilização de bolsas de água durante a refrigeração do sêmen ovino em palhetas na proteção contra o choque térmico e seus efeitos sobre a viabilidade espermática.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

As coletas e as criopreservações de sêmen foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizada na Fazenda Experimental Sucupira, Brasília, DF. Foram utilizados três carneiros da raça Santa Inês, em idade adulta e boa condição corporal, clinicamente sadios e com o mesmo regime de alimentação (feno de coast-cross, silagem e sal mineral).

Antes do início do programa de criopreservação, os animais foram submetidos a um exame andrológico, sendo que todos apresentaram características espermáticas acima dos padrões mínimos preconizados para congelamento, conforme estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (1998).

6.2.1 Coleta e avaliação do sêmen

Cada reprodutor foi submetido a um total de 10 coletas, as quais foram realizadas duas vezes por semana. Para a coleta do sêmen, utilizou-se vagina artificial com água aquecida a 42°C, tendo como manequim uma fêmea contida. Os ejaculados foram analisados considerando os seguintes itens: volume, aspecto, turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática. Os ejaculados que ingressaram no programa de criopreservação foram aqueles que apresentaram os seguintes padrões mínimos: volume 0,5 ml, motilidade espermática de 70%, vigor 3 e concentração espermática de 3×10^9 spz/ml.

6.2.2. Processamento do sêmen

Após as avaliações iniciais dos ejaculados, procedeu-se a pré-diluição na proporção de 1:1 (sêmen/meio diluidor) em meio de congelação Glicina-Gema-Leite (GGL) (Gonzalez, 1996) em temperatura de 32°C, após essa diluição os ejaculados foram misturados, formando-se um pool dos três carneiros. O sêmen foi então rediluído ajustando-se a uma concentração final de 100×10^6 espermatozóides totais/doses e envazado em palhetas de 0,25ml. As palhetas foram refrigeradas distribuindo-as de acordo com a técnica de refrigeração (refrigerador sem bolsa de água - RS, refrigerador com bolsa de água - RC, balcão sem bolsa de água - BS e balcão com bolsa de água - BC) (Figura 1).

6.2.3. Sistemas de Refrigeração

Na refrigeração do sêmen em refrigerador doméstico utilizou-se um aparelho compacto foram realizados dois sistemas de refrigeração: o primeiro consistia no sistema convencional de refrigeração (RS), onde o suporte com as palhetas dispostas horizontalmente, era colocado diretamente no mesmo, no segundo as palhetas foram dispostas entre bolsas plásticas contendo água (RC), confeccionadas artesanalmente com sacos plásticos com medidas de 37 cm de comprimento por 15 cm de largura, conforme as dimensões do suporte (Figura 2). Para o processo de refrigeração foram utilizadas duas bolsas com volume de 200 ml e uma bolsa de 400 ml de água, dispostas e retiradas da seguinte maneira: após as bolsas estarem aquecidas à 32°C, a bolsa de 400 ml ficava em baixo do suporte e as outras duas por cima; após 35 minutos de refrigeração retirava-se a primeira bolsa de cima, aos 50 minutos era removida a segunda bolsa e por último a bolsa de 400 ml era retirada com 60 minutos de refrigeração, completando 90 minutos. Para a refrigeração em balcão, utilizou-se um modelo horizontal com circulação forçada de ar e monitor de temperatura (ELO800/SPE). Utilizou-se dois sistemas de refrigeração, sem bolsas (BS) e com bolsas de água (BC) e um período de 90 minutos. No entanto, as medidas dessas bolsas diferiram daquelas usadas no refrigerador, considerando o modelo do suporte de palhetas utilizados no balcão, com 18 cm de comprimento e 15 cm de largura; utilizou-se duas bolsas de 250ml em cima do suporte com as palhetas e uma bolsa de 400ml em baixo; passados 35 minutos de refrigeração retirou-se a

primeira bolsa de cima, aos 57 minutos foi removida a segunda bolsa de cima aos 60 minutos a terceira bolsa de baixo.

6.2.4. Monitoramento das curvas de Refrigeração

As temperaturas das curvas de refrigeração obtidas nos sistemas, refrigerador, refrigerador com bolsa, balcão e balcão com bolsa foram aferidas com o uso de um termômetro digital HD 8802 modelo IT18 (Delta OHM) com sensor tipo K, o sensor foi inserido dentro de uma palheta contendo sêmen e o meio de congelação GGL (Glicina-Gema-Leite). As aferições foram realizadas em 10 repetições.

6.2.5. Avaliações do sêmen refrigerado

Ao final da refrigeração do sêmen, três palhetas de cada tratamento (RS, RC, BS e BC) foram reaquecidas a 37°C por 30 segundos e avaliadas subjetivamente quanto à motilidade (0-100%) e vigor (0-5) por microscopia de luz. Vinte microlitros de sêmen de cada palheta eram diluídos em 1 ml de solução formol-salina, para a análise da morfologia espermática e armazenados em tubos eppendorfs de 1,5ml a 5°C para posterior leitura em microscopia de contraste de fase.

A avaliação da viabilidade e integridade do acrossomo foi determinada por microscopia de campo claro através da coloração dupla (Trypan-blue + Giemsa) segundo Didion (1989), na qual se acrescentou 20µl de sêmen a 20 µl de Trypan-blue em tubo eppendorf por 12 minutos. Desta amostra foi feito um esfregaço, que foi fixado em metanol por 5 minutos e, depois de seco foi imerso em Giemsa por 8 a 24 horas.

Foram contadas 200 células por lâmina e os espermatozóides encontrados foram classificados conforme a descrição abaixo:

- Espermatozóide vivo com acrossomo íntegro – cabeça rosada e acrossomo rosado escuro;
- Espermatozóide vivo com acrossomo reagido – cabeça toda rosada e acrossomo rosado (descorado);
- Espermatozóide morto íntegro – cabeça azul e acrossomo rosado escuro;

- Espermatozóide morto reagido – cabeça toda azul acrossomo azul (descorado).

6.2.6. Processo de criopreservação

As bandejas contendo as palhetas foram transferidas para uma caixa de polietileno (isopor) contendo nitrogênio líquido a uma distância de 5,5 cm acima do nível no nitrogênio, permanecendo por 20 minutos, sendo, então mergulhadas em nitrogênio líquido, acondicionadas em raques e armazenadas em botijão criogênico a -196°C.

6.2.7. Descongelação do sêmen

As amostras foram descongeladas a 37°C durante 30 segundos e depositadas em tubos de vidro de 5ml mantidos aquecidos à 37°C, sendo as amostras utilizadas para a realização das mesmas avaliações descritas no item 6.2.5, acrescidas de outros 2 testes: integridade de membrana plasmática (IMP) e teste de termo resistência. Foram analisadas três palhetas de cada sistema de refrigeração/ congelamento por partida.

6.2.8 Integridade de Membrana Plasmática

A integridade da membrana plasmática foi avaliada utilizando-se uma combinação das sondas fluorescentes Diacetato de Carboxifluoresceína (DIC) e o Iodeto de Propídio (IP) como descrito por Zúccari (1998). Adicionando-se 10µl de sêmen descongelado a 40µl de uma solução preparada com a combinação de 10µl de formol salina tamponada, 10µl de DIC e 5µl de IP para 480µl de citrato de sódio a 2,94%. Após a incubação por 15 minutos à temperatura ambiente, 10µl dessa suspensão foram depositados entre lâmina e lamínula. Duzentas células foram contadas através de um microscópio de epifluorescência, os espermatozoides foram considerados com membrana íntegra quando corados com verde ou com membrana lesada quando corados de vermelho ou verde e vermelho.

6.2.9. Teste de Termo Resistência (TTR)

As palhetas descongeladas foram submetidas ao teste de exaustão a 37°C durante 240 minutos (Paganini Filho, 1999), não sendo acrescentado em nenhum momento meio de

congelamento. As análises foram realizadas no momento da descongelamento (hora 0) e aos 240 minutos (hora 4) de incubação.

6.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a realização da análise estatística utilizou-se o procedimento GLM (análise de variância), num delineamento fatorial 2x2, considerando os efeitos dos sistemas de refrigeração, presença ou não das bolsas de água e as interações entre eles. Quando algum efeito foi observado utilizou-se a comparação de médias pelo teste de Duncan. Para as análises, utilizou-se o Statistical Analysis System – SAS (SAS, Edição 2.0 - 2004, Institute Inc., Cary, NC 27513, USA), considerando nível de significância de $P < 0,05$.

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou diferentes sistemas de refrigeração do sêmen ovino, através da aferição e comparação das curvas obtidas e avaliou também seus efeitos sobre parâmetros espermáticos após a criopreservação.

O sistema de refrigeração em refrigerador doméstico sem bolsas de água (RS), grupo controle, apresentou um descenso de temperatura brusco, no primeiro minuto de refrigeração caiu -18°C tendo como queda média $-1,4^{\circ}\text{C}/\text{min}$, atingiu $+5^{\circ}\text{C}$ após 19 minutos onde permaneceu estabilizando por mais 71 minutos, completando os 90 minutos de refrigeração e estabilização (Figura 3). Esta taxa esta de acordo com Rodello (2006), o qual relatou uma queda de temperatura de $-19,3^{\circ}\text{C}$ no primeiro minuto de refrigeração de sêmen ovino realizada em refrigerador.

O ritmo obtido no sistema refrigerador com bolsa (RC) proporcionou uma queda média de $-0,4^{\circ}\text{C}/\text{min}$, a qual alcançou $+5^{\circ}\text{C}$ após 65 minutos, onde permaneceu estabilizando durante 25 minutos (Figura 3). Esta taxa é semelhante à encontrada por Rodello (2006) na refrigeração em geladeira Minitub 518C com bolsas de água, o qual conseguiu um ritmo médio de $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

O sistema de refrigeração em balcão sem bolsas (BS) de água apresentou uma queda de temperatura ainda mais rápida, caindo 21°C no primeiro minuto, em média teve uma taxa

de $-2,9^{\circ}\text{C}/\text{min}$, atingiu $+5^{\circ}\text{C}$ após nove minutos, permaneceu estabilizando durante 81 minutos (Figura 3).

A taxa de refrigeração média conseguida no sistema balcão com bolsa foi de $-0,45^{\circ}\text{C}/\text{min}$, alcançando $+5^{\circ}\text{C}$ depois de 59 minutos, estabilizando a essa temperatura por 31 minutos (Figura 3).

Para todos os parâmetros avaliados, não foram observadas interações entre sistema de refrigeração (Refrigerador e Balcão) x sistema isolante (Com Bolsa e Sem Bolsa).

Comparando-se os quatro sistemas ao final do período de refrigeração do sêmen, foi observada diferença significativa ($P<0,05$) na motilidade espermática (Tabela 1). O grupo controle RS e os tratamentos RC e BC não diferiram entre si em relação à motilidade 63,8%, 67,5%, 67,8%; respectivamente, no entanto o tratamento BS teve a menor média com 58,1% (Tabela 1). Esta diferença na motilidade ocorreu em função da utilização das bolsas de água ($P<0,05$) e não pelo tipo de sistema refrigerador (refrigerador ou balcão). O sistema BS foi o que apresentou a queda de temperatura mais rápida e possivelmente o sêmen refrigerado neste método possa ter sido prejudicado. É sabido que a refrigeração rápida do sêmen de 30°C para 0°C (Watson, 2000) e até mesmo a redução de temperatura de 37°C para 5°C (López, 1999), induzem um estresse letal em algumas células, proporcional a taxa de refrigeração, intervalo de temperatura e ao limite de temperatura, conhecido como choque térmico. O choque térmico pode gerar rupturas na membrana plasmática que possibilitam a perda de cátions e enzimas dos espermatozoides, diminuindo de forma irreversível sua motilidade e atividade metabólica (White, 1993), as alterações também incluem o decréscimo da glicólise e frutólise e conseqüentemente da respiração celular, aumento da degeneração do ácido desoxirribonucléico (Rodello, 2006). Estes dados estão de acordo com Ollero et al.(1998) que utilizaram uma taxa de refrigeração de $-0,25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ no estudo dos efeitos da refrigeração, congelamento e descongelamento e da habilidade crioprotetora de quatro diluentes sobre o espermatozoide ovino, os quais obtiveram uma motilidade espermática subjetiva média pós refrigeração de 62% em meio Tryladil-gema.

Para a característica vigor espermático não houve diferença significativa entre os tratamentos após a refrigeração (Tabela 1).

A percentagem de espermatozoides vivos com acrossomo íntegro no final dos 90 min de refrigeração apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($P<0,05$), o método BS (85%) teve menor média de vivos íntegros em relação aos demais, também houve diferença significativa para o parâmetro mortos com acrossomo íntegro, sendo o tratamento BS aquele que obteve a maior média de espermatozoides mortos íntegros (14,1%) (Tabela 1). Observa-

se que a percentagem de vivos íntegros seguiu uma tendência da motilidade, reforçando a idéia de que o sistema BS possa ter diminuído a qualidade espermática devido à queda brusca de temperatura. As diferenças em relação às médias de espermatozóides VI e MI foram em função do uso das bolsas de água ($P < 0,05$). Os quatro tratamentos não mostraram diferenças significativas quanto à percentagem de espermatozóides vivos com acrossomo reagido e percentagem de mortos com acrossomo reagido (Tabela 1).

A percentagem de defeitos de morfologia no sêmen fresco foi de $9,4 \pm 2,2\%$, e após a refrigeração observou-se um aumento de defeitos nos 4 sistemas com diferença significativa entre os mesmos ($P < 0,05$), sendo que o tratamento BS obteve a maior média de defeitos pós-refrigeração (15,4%), enquanto que, os tratamentos que utilizavam bolsas de água RC e BC tiveram as menores médias de defeitos morfológicos, 11,5% e 11,1%; respectivamente, já o grupo controle RS (13,6%) foi semelhante aos outros 3 tratamentos (Tabela 1). As transições de fase da membrana plasmática decorrentes da refrigeração rápida são responsáveis pelo aumento das alterações acrossomais e de defeitos de cauda (Parks e Graham, 1992). Segundo Bateman (2001), o qual avaliou os efeitos de diluentes e métodos de refrigeração sobre a função do espermatozóide canino, a refrigeração do sêmen resulta num aumento de defeitos morfológicos principalmente da cauda do espermatozóide.

Após a descongelação do sêmen, não foi observada diferença significativa na motilidade e no vigor espermático entre os quatro tratamentos (Figura 4; Tabela 2). Este resultado sugere que o ritmo utilizado durante a refrigeração não exerceu efeito no sêmen após o processo de congelação, corroborando com Januskauskas et al (1999) os quais também não observaram diferenças entre duas taxas de refrigeração no sêmen bovino, lenta ($-0,1^\circ\text{C}/\text{min}$) e rápida ($-4,2^\circ\text{C}/\text{min}$), sobre a motilidade subjetiva após congelação automatizada. Estando de acordo também com Bittencourt et al (2006), os quais não observaram diferença significativa nos parâmetros motilidade progressiva e total do sêmen caprino descongelado após utilizarem a combinação entre duas taxas de refrigeração ($-0,46^\circ\text{C}/\text{min}$ e $-1,07^\circ\text{C}/\text{min}$) e dois tempos de equilíbrio a 5°C (1 hora e 2 horas). Mas diferem dos achados de Rovay (2001) o qual avaliou o efeito de dois protocolos de resfriamento para o sêmen caprino, usando dois ritmos de descenso ($-0,12^\circ\text{C}/\text{min}$ e $-0,4^\circ\text{C}/\text{min}$), obtendo maior motilidade total pós-descongelação (54%) com a curva $-0,4^\circ\text{C}/\text{min}$.

A integridade da membrana plasmática (IMP) do espermatozóide indica sua viabilidade, e a maioria de suas avaliações verificam se a membrana está intacta ou não. A fim de fecundar o oócito, o espermatozóide deve possuir uma membrana plasmática intacta e competente. Quando o espermatozóide é submetido à diminuição de temperatura durante as

etapas da criopreservação, ocorre a desestabilização e até mesmo a ruptura da membrana devido à transição de fase da mesma, que passa de estado líquido para o de gel. Uma das conseqüências do rompimento da membrana é a perda de componentes intracelulares, tais como enzimas metabólicas e ATP, levando a morte da célula. Para os resultados da avaliação da IMP pós-descongelção, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos RS, RC, BS e BC ($16,8 \pm 5,1\%$, $13,4 \pm 4,9\%$, $13,8 \pm 4,2\%$, $13,6 \pm 4,9\%$, respectivamente) (Tabela 2). Segundo Salamon e Maxwell (2000), após o processo de criopreservação a motilidade espermática pode variar entre 40 a 60%, mas somente cerca de 20 a 30% dos espermatozoides mantêm-se com as membranas íntegras. No estudo realizado por Rodello (2006) valores semelhantes, aos dos autores anteriormente citados, para percentuais de células móveis (50,1%, 42,1%, 46,8% e 50,3%) e íntegras (27,2%, 23,3%, 25,5% e 27,4%), pós-descongelção foram obtidos. O presente trabalho, no entanto, observou diferença considerável em relação a esses autores, pois a percentagem de células com membranas intactas foi menor que a metade da de células móveis. Tais resultados sugerem que durante a criopreservação, as membranas dos espermatozoides são submetidas a diversas condições desfavoráveis que afetam a membrana muito antes de afetar sua capacidade de se movimentar.

Em relação à percentagem de defeitos morfológicos após a descongelção do sêmen não foi observada diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 2). No entanto, observou-se um aumento na percentagem de defeitos dos tratamentos com bolsa (RC e BC, 14,9% e 15,3%; respectivamente) quando comparados aos valores após a refrigeração (Figura 5). Segundo Bateman (2001), a percentagem de espermatozoides com morfologia normal é diminuída levemente após a descongelção, concomitantemente com um aumento dos defeitos de cauda, sugerindo que a congelação e a descongelção tornam mais aparentes principalmente, os defeitos de cauda gerados pela refrigeração.

É sabido que os processos refrigeração, congelação e descongelção aceleram a maturação das membranas espermáticas, aumentando assim a proporção de espermatozoides capacitados e acrossomos reagidos (Salamon e Maxwell, 2000), tal fato leva a uma diminuição da longevidade da célula espermática no genital da fêmea, podendo comprometer a fertilidade. Pérez et al. (1996), usando a coloração CTC, demonstraram que os espermatozoides ovinos sofrem a capacitação mais rapidamente do que o sêmen fresco, Gillan et al. (1997) relataram achados similares, com 61% de padrão F (não capacitado), 18% para o padrão B (capcitado) e 21% padrão AR (acrossomo reagido) para o sêmen ovino fresco, comparando com 7,2% (F), 66% (B) e 26% (AR) para o sêmen congelado-descongelado. No

presente estudo não foi observada diferença significativa na percentagem de espermatozóides vivos com acrossomo íntegro após a descongelação, com os tratamentos RS, RC, BS e BC apresentando $51,9 \pm 7,6\%$, $46,4 \pm 8,1\%$, $54 \pm 7,7\%$ e $49,7 \pm 8,7\%$, respectivamente (Tabela 2). Ficou evidenciada uma diminuição no número de vivos íntegros no sêmen descongelado quando comparado ao sêmen refrigerado (Figura 6). Também não houve diferença significativa entre os tratamentos, nos percentuais de espermatozóides mortos com acrossomo íntegro (Tabela 2), mas como era de se esperar ocorreu um aumento considerável de mortos íntegros nos quatro tratamentos após a congelação (Figura 7). Quanto às percentagens de espermatozóides vivos com acrossomo reagido e mortos reagidos pós-descongelação não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 2). Estes resultados estão de acordo com os estudos de Pérez et al (1996) e Gillan et al. (1997), os quais sugerem que as etapas de congelação e descongelação aumentam o número de espermatozóides capacitados, mas possuem menor efeito sobre o número de acrossomos reagidos.

O grau de dano espermático que ocorre nos espermatozóides durante o processo de criopreservação torna-se aparente durante a sua incubação; quanto maior esse dano, menor é a longevidade dessa célula no trato genital da fêmea (Bag et al., 2004).

Dos resultados do teste de exaustão não foram observadas diferenças significativas na percentagem da motilidade e no vigor entre os quatro tratamentos ao final das 4 horas de incubação (Tabela 3). No entanto, notaram-se valores muito baixos para a motilidade espermática dos tratamentos, isto já era esperado, devido ao fato das membranas espermáticas estarem muito lesadas no momento da descongelação. Estes resultados diferem de Rodello (2006), o qual relatou ao final do teste de exaustão do sêmen refrigerado em refrigerador e congelado em vapor de N_2 líquido valor para motilidade de 32,1%. Após a descongelação do sêmen ovino, a integridade de membrana é drasticamente reduzida, enquanto que o efeito na motilidade não é tão evidente. A análise simultânea da integridade de membrana e da motilidade revelou a existência de uma grande população de espermatozóides com danos de membrana que se apresentam móveis imediatamente após a descongelação. Os espermatozóides com membrana lesada embora viáveis perdem rapidamente a motilidade dentro de poucas horas de incubação a $37^\circ C$ (Valcárcel et al., 1994). A diminuição da motilidade durante a incubação também pode estar ligada ao declínio na produção espermática de ATP devido a danos mitocondriais, ou pelo efeito tóxico da enzima aminoácido oxidase aromática, liberada pelos espermatozóides mortos. Ao final do período de incubação também não se observou diferença significativa na percentagem de células com membranas íntegras entre os tratamentos (Tabela 3). A produção de radicais livres durante a

estocagem do sêmen tem sido apontada como a principal causa da diminuição de motilidade e integridade espermática (Viswanath e Shannon, 1997), declínio no metabolismo energético e desnaturação do DNA do espermatozóide (Baumber et al., 2000). É sabido que dentro de um sistema aeróbico ou parcialmente aeróbico, a produção de espécies reativas de oxigênios (ROS) é inevitável. Os radicais livres ânion superóxido (O_2^-), peróxido (H_2O_2) e hidroxil (OH) são os mais nocivos e as reações que geram estes radicais parecem mais ativas em temperaturas mais altas (Bag et al., 2004), sendo a temperatura utilizada no teste de exaustão bastante favorável. No presente estudo, a incubação do sêmen a 37°C foi realizada após o descongelamento de uma palheta de 0,25ml em um tubo de vidro de 5ml, e possivelmente o espaço entre a tampa do tubo e a superfície do sêmen proporcionou condições para o estabelecimento de um sistema aeróbico, esse fato pode ter contribuído para baixos resultados no final da incubação.

A percentagem de defeitos de morfologia ao final do teste de exaustão também não apresentou diferença significativa entre os quatro tratamentos (Tabela 3). No entanto, notou-se um leve aumento de defeitos, de forma semelhante, nos quatro tratamentos RS, RC, BS e BC (15,6 %, 16,3%, 17,3%, 16,5%) quando comparados ao momento da descongelação do sêmen.

6.5 CONCLUSÕES

Diante das condições experimentais e com base nos resultados obtidos, concluí-se que:

- A utilização das bolsas plásticas contendo água foi eficiente em controlar o descenso de temperatura tanto no refrigerador quanto no balcão.
- As diferentes taxas de refrigeração obtidas somente influenciaram o sêmen após o período de refrigeração.
- As avaliações pós-descongelação não evidenciaram nenhum efeito dos protocolos de refrigeração sobre a qualidade do sêmen ovino criopreservado

6.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bag, S., Joshi, A., Naqvi, S.M.K., Mittal, J.P. Effect of post-thaw incubation on sperm Kinematics and acrossomal integrity of ram spermatozoa cryopreserved in medium-sized French straws. **Theriogenology** 2004; 62: 415-424.

Bateman, H.L. **Effect of semen extenders composition and cooling methods on canine sperm function and cryo-survival**. Ottawa/Canada, 2001 Thesis, Faculty of Graduate Studies of the University of Guelph.

Baumber, J., Ball, B.A., Gravance, C.G., Medina, V., Davies-Morel, M.C. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrossomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. **J. Andrology** 2000; 21:895-902.

Bittencourt, R.F., Ribeiro-Filho, A.L., Alves, S.G.G., Biscarde, C.E., Vasconcelos, M.F., Oba, E. O efeito do tempo de Equilíbrio sobre a qualidade do sêmen caprino criopreservado. **Ver. Brás. Saúde Prod. An.** 2006; 7:27-37.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual de exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2ed, Belo Horizonte, CBRA, 1998.

Curry, M.R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Reviews of Reproduction** 2000; 5:46-52.

Didion, B.A., Dobrinsky, J.R, Giles, J.R., Graves, C.N. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. **Gamet Res.** 1989;22(1):51-57.

Douglas-Hamilton, D.H., Osol, R., Osol, G. A field study of the fertility transported equine semen. **Theriogenology** 1994; 22(3):291-304.

Eppleston, J., Maxwell, W.M.C. Recent attempts to improve the fertility of frozen ram semen inseminated into the cervix. **Wool Tech. Sheep Breed.** Kensington 1993; 41:291-302.

Gillan, L., Evans, G., Maxwell, M.C. Capacitation status of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development** 1997; 9(5):481-488.

Gonzalez, C.I.M. **Avaliação “in vitro” e “in vivo” de sêmen ovino (*Ovis aries*) congelado em palhetas e “pellets” com diferentes diluidores.** Botucatu, 1996. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Holt, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Anim. Reprod. Sci.** 2000; 62:2-33.

Januskauskas, A., Gil, J., Söderquist, L., Håård, M.G.M., Håård, M. Ch., 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** 1999; 52:641-658.

López, A., Söderquist, L., Rodriguez-Martinez, H. Sperm viability in ram semen diluted and stored in three different extenders. **Acta Vet. Scand.** 1999; 40(1):1-9.

Maxwell, W.M.C.; Watson, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science** 1996; 42:55-65.

Medeiros, C.M.O., Forell, F., Oliveira, A.T.D., Rodrigues, J.L. Current Status of Sperm Cryopreservation: Why isn't it Better? **Theriogenology** 2002; 57:327-344.

Ollero, M., Perez-Pe, R., Muiño-Blanco, T., Cebrian-Perez, J.A. Improvement of Ram Sperm Cryopreservation Protocols Assessed by Sperm Quality Parameters and Heterogeneity Analysis **Cryobiology** 1998; 37:1-12.

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

Parks, J.E., Graham, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology** 1992; 38:209-222.

Pérez, L. J., Valcárcel, A., de las Heras, M.A., Moses, D., Baldassare, H. Evidence That Frozen/Thawed Ram Spermatozoa Show Accelerated Capacitation In Vitro As Assessed By Chlortetracycline Assay. **Theriogenology** 1996;46:131-140.

Rodello, L. **Validação de Sistema Automatizado de Refrigeração e Congelamento de Sêmen Ovino**. Botucatu, 2006. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista-UNESP.

Rovay, H. **Efeito de Diferentes Curvas de Resfriamento, Tempos de Equilíbrio e Crioprotetores Permeáveis no congelamento de Espermatozóides de Caprinos**. Viçosa, 2006. Tese (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Viçosa-UFV.

Salamon, S., Maxwell, W.M.C. Storage of ram semen. **Anim. Reprod. Sci.** 2000; 62:77-111.

Valcárcel, A., Heras, M.A., Pérez, L., Moses, D.F., Baldassare, H. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa **Theriogenology** 1994;41: 483-489.

Vishwanath, R., Shannon, P. Do sperm cells age? A review of the physiological change in sperm during storage at ambient temperature. **Reprod. Fertile. Dev.** 1997;9:321-331.

Watson, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.** 2000; 60(61): 481-492.

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

Zúccari, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina**. Tese de doutorado apresentada em Botucatu, SP, 1998.

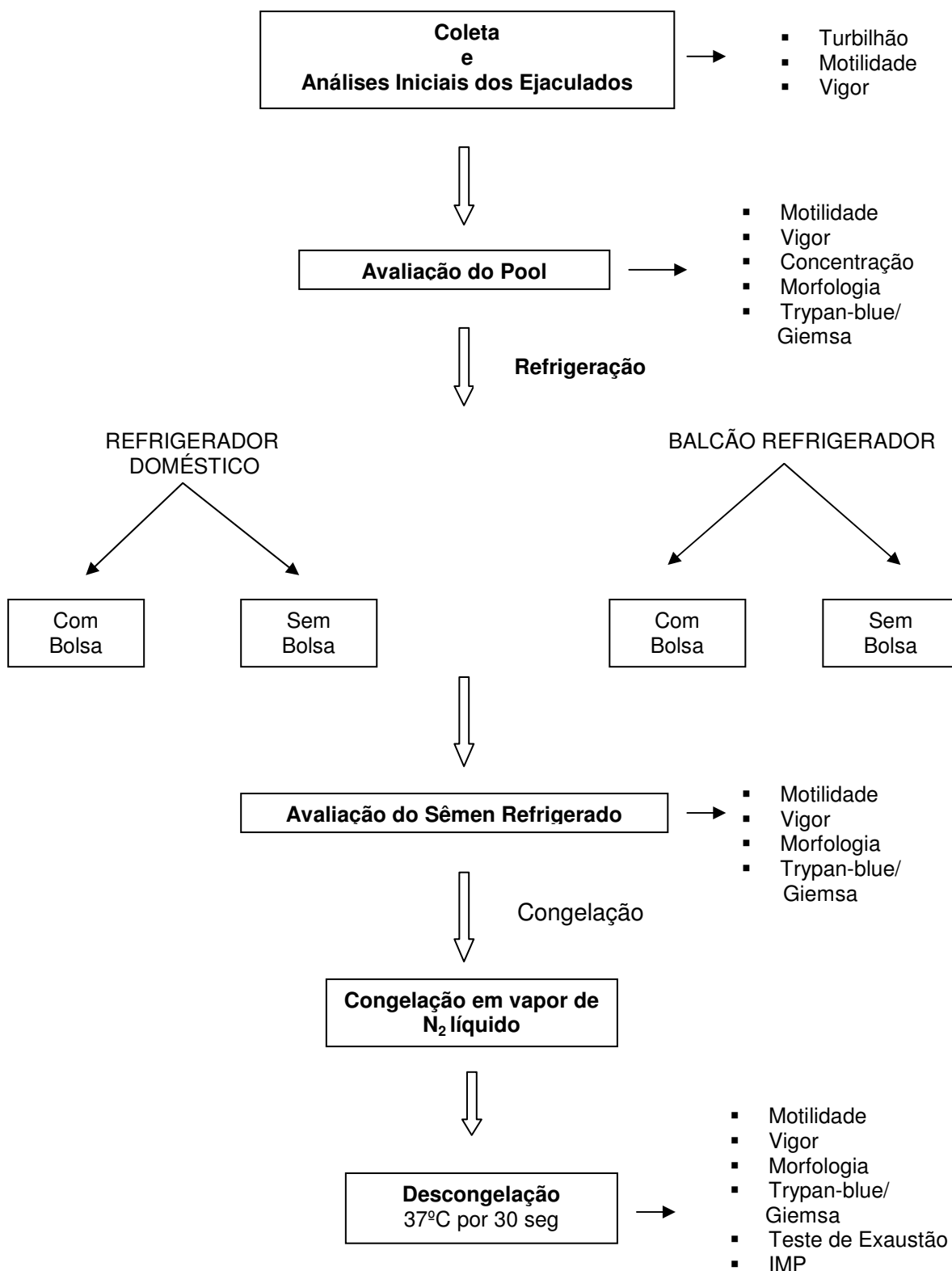


Figura 1. Fluxograma Experimental.



Figura 2. Sistema de refrigeração de sêmen em refrigerador doméstico com bolsas de água (RC).

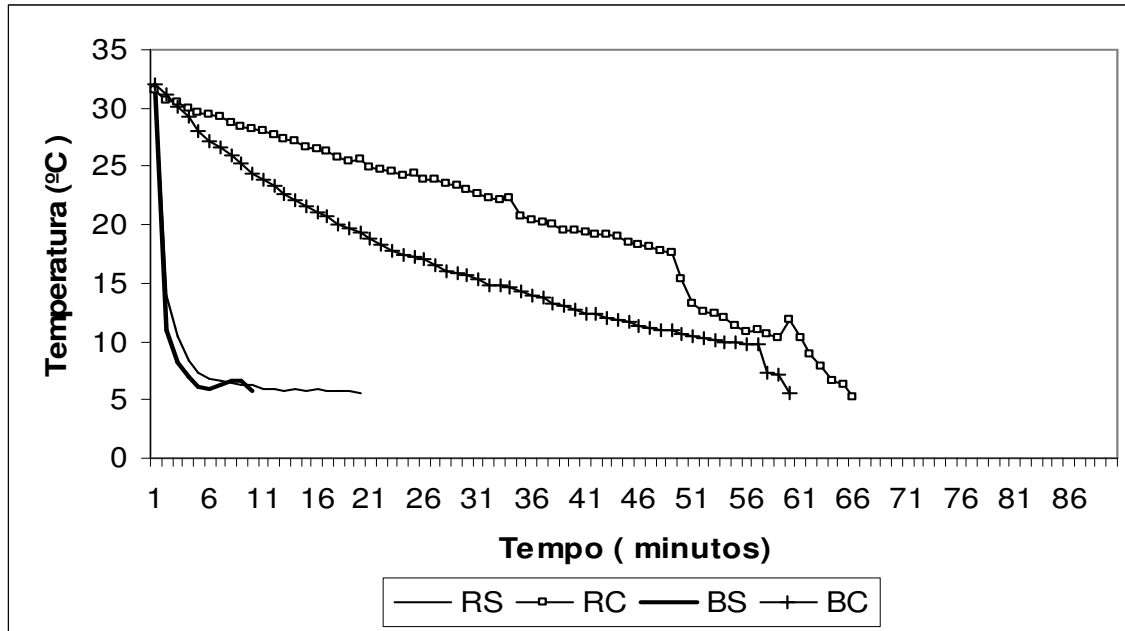


Figura 3. Curvas de refrigeração do sêmen ovino (°C/min) determinadas para a refrigeração em refrigerador sem bolsa (RS), refrigerador com bolsa (RC), balcão sem bolsa (BS) e balcão com bolsa (BC).

Tabela 1 – Médias (\pm desvio-padrão) da Motilidade (%), Vigor (0-5), percentagem total de defeitos morfológicos dos espermatozóides (DM), percentagem de espermatozóides vivos com acrossomo íntegro (VI), vivos com acrossomo reagido (VR), mortos com acrossomo íntegro (MI) e mortos com acrossomo reagido (MR) do sêmen ovino refrigerado em diferentes sistemas (RS - refrigerador sem bolsa , RC - refrigerador com bolsa , BS - balcão sem bolsa e BC - balcão com bolsa).

	Mot (%)	Vigor (0-5)	DM (%)	VI (%)	VR (%)	MI (%)	MR (%)
RS	63,8 \pm 2,7 ^a	3 \pm 1,6	13,6 \pm 3,3 ^{a,b}	87,3 \pm 4,0 ^{a,b}	0,1 \pm 0,2	11,7 \pm 4,1 ^{a,b}	0,9 \pm 0,4
RC	67,5 \pm 4,9 ^a	3,1 \pm 1,6	11,5 \pm 2,6 ^b	90,4 \pm 2,4 ^a	0,1 \pm 0,1	9,7 \pm 3,6 ^b	0,8 \pm 0,5
BS	58,1 \pm 9,5 ^b	3 \pm 1,6	15,4 \pm 3,8 ^a	85,3 \pm 5,6 ^b	0,1 \pm 0,1	14,1 \pm 5,5 ^a	1,2 \pm 2,1
BC	67,8 \pm 4,9 ^a	3,9 \pm 0,3	11,1 \pm 2,3 ^b	90 \pm 3,5 ^a	0,02 \pm 0,1	9,3 \pm 3,4 ^b	1,3 \pm 2,0

^{a,b} Médias, dentro da mesma coluna, seguidas de letras diferentes, diferem entre si ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Médias (\pm desvio-padrão) da Motilidade (%), Vigor (0-5), percentagem total de defeitos morfológicos dos espermatozóides (DM), percentagem de espermatozóides vivos com acrossomo íntegro (VI), vivos com acrossomo reagido (VR), mortos com acrossomo íntegro (MI), mortos com acrossomo reagido (MR) e percentagem de células com membranas íntegras (IMP), do sêmen ovino refrigerado em diferentes sistemas (RS - refrigerador sem bolsa, RC - refrigerador com bolsa, BS - balcão sem bolsa e BC - balcão com bolsa) e congelado em vapor de N₂, logo após a descongelação.

	Mot (%)	Vigor (0-5)	DM (%)	VI (%)	VR (%)	MI (%)	MR (%)	IMP (%)
RS	41,2 \pm 6,2	3 \pm 0	13,5 \pm 1,5	51,9 \pm 7,6	0,1 \pm 0,2	44,9 \pm 7,7	3,2 \pm 0,9	16,8 \pm 5,1
RC	35,3 \pm 9,9	2,9 \pm 0,1	14,9 \pm 2,4	46,4 \pm 8,1	0,1 \pm 0,2	50,1 \pm 8	3,4 \pm 0,7	13,4 \pm 4,9
BS	40,2 \pm 5,7	3 \pm 0,1	15,3 \pm 2	54 \pm 7,7	0,3 \pm 0,4	41,9 \pm 7,9	3,7 \pm 1,7	13,8 \pm 4,2
BC	38,2 \pm 7,7	3 \pm 0,1	15,3 \pm 2,6	49,7 \pm 8,7	0,1 \pm 0,2	47,6 \pm 9,2	2,6 \pm 1,4	13,6 \pm 4,9

Tabela 3 – Médias (\pm desvio-padrão) da Motilidade (%), Vigor (0-5), percentagem total de defeitos morfológicos dos espermatozóides (DM) e percentagem de células com membranas íntegras (IMP) ao final de 4 horas de Teste de Exaustão.

	Mot (%)	Vigor (0-5)	DM (%)	IMP (%)
RS	0,8 \pm 1	0,4 \pm 0,5	15,6 \pm 2,6	10,6 \pm 3,5
RC	1 \pm 1	0,5 \pm 0,4	16,3 \pm 2,8	9,3 \pm 3,4
BS	5,1 \pm 7,6	1 \pm 1,3	17,3 \pm 2,2	8,9 \pm 3
BC	1,3 \pm 1,7	0,5 \pm 0,6	16,5 \pm 2,8	9,3 \pm 3,3

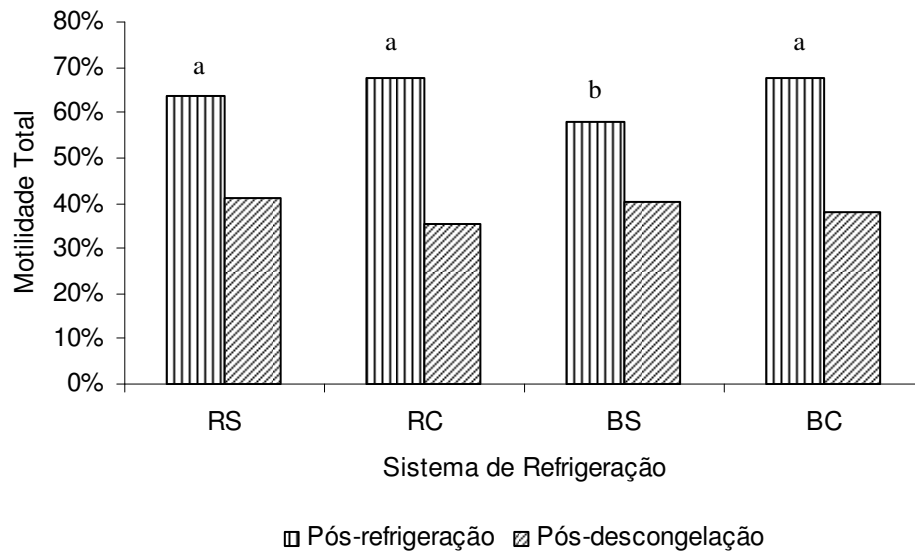


Figura 4. Expressão gráfica das médias em percentagem da motilidade espermática total ao final da refrigeração e após a descongelamento do sêmen ovino.

^{a,b} Colunas seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

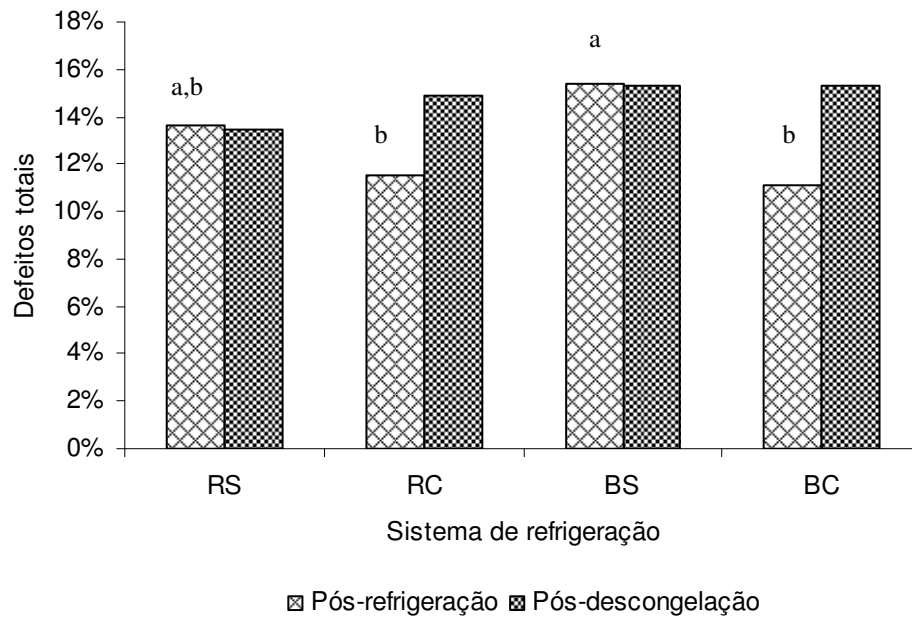


Figura 5. Expressão gráfica das médias em percentagem de defeitos espermáticos totais ao final da refrigeração e após a descongelação do sêmen ovino.

^{a,b} Colunas seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

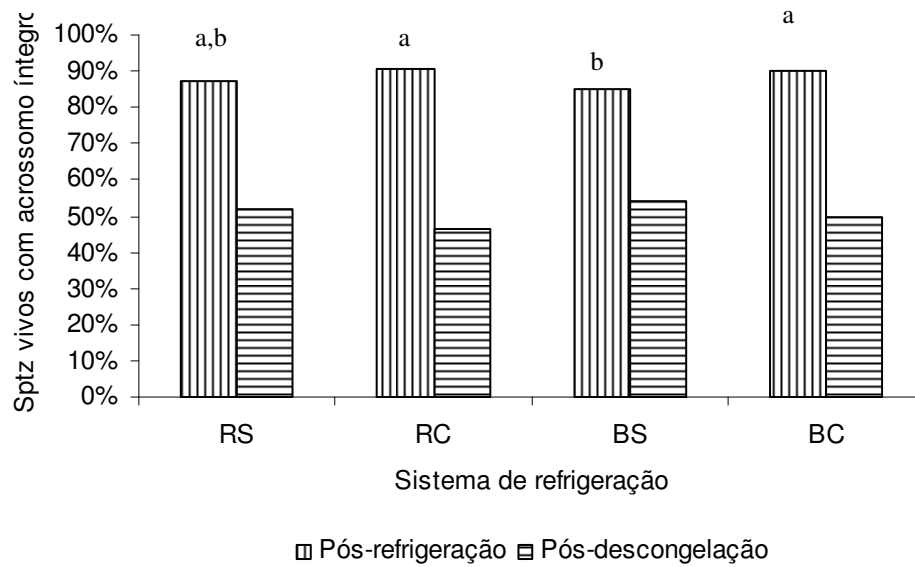


Figura 6. Expressão gráfica das médias em percentagem dos espermatozóides vivos com acrossomo íntegro ao final da refrigeração e após a descongelação do sêmen ovino.

^{a,b} Colunas seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

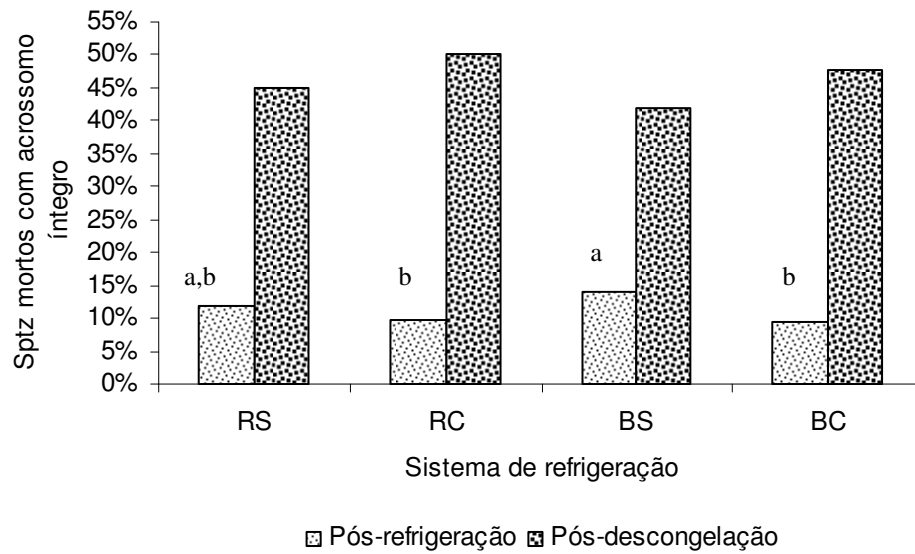


Figura 7. Expressão gráfica das médias em percentagem dos espermatozoides mortos com acrossomo íntegro ao final da refrigeração e após a descongelação do sêmen ovino.

^{a,b} Colunas seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

