RODRIGO ALONSO FORERO GONZALEZ

EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO USANDO DIFERENTES TÉCNICAS DE
CONGELAÇÃO E CRIOPROTETORES SOBRE PARÂMETROS
ESPERMÁTICOS E A INTEGRIDADE DE MEMBRANAS DO
ESPERMATOZÓIDE BOVINO

Pirassununga
2004

RODRIGO ALONSO FORERO GONZALEZ

EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO USANDO DIFERENTES TÉCNICAS DE
CONGELAÇÃO E CRIOPROTETORES SOBRE PARÂMETROS
ESPERMÁTICOS E A INTEGRIDADE DE MEMBRANAS DO
ESPERMATOZÓIDE BOVINO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:
Reprodução Animal.

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda.

Pirassununga
2004

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1361 FMVZ	<p>Gonzalez, Rodrigo Alonso Forero</p> <p>Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino / Rodrigo Alonso Forero Gonzalez – Pirassununga : R. A. F. Gonzalez, 2004. 92 f. : il.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2004.</p> <p>Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.</p> <p>Área de concentração: Reprodução Animal.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda.</p> <p>1. Bovinos. 2. Sêmen animal. 3. Espermatozóides. 4. Criopreservação. 5. Crioprotetor animal. I. Título.</p>
----------------	---

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GONZALEZ, Rodrigo Alonso Forero

Título: Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Dedico este trabalho à minha esposa Renata
e aos nossos filhos Eduardo e Andrés que
são o que eu mais amo.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, que me iluminou.
- Aos meus pais, José e Gilma, que sempre foram meu exemplo de vida, pelo apoio que me deram mesmo estando longe.
- Ao Prof. Rubens por ter me aceito como orientado e pelo apoio e força nos momentos difíceis, quando eu quase desisti.
- À Eneiva Carla por sua amizade e fundamental apoio na realização deste trabalho.
- À Norma Lúcia por sua amizade e noites de desvelo na elaboração da Tese.
- Ao Prof. Flávio Meirelles pela sua prontidão em facilitar o uso do microscópio de epifluorescência do Laboratório de Morfologia Molecular e Desenvolvimento.
- Aos meus companheiros de Doutorado: Luís e Alexandre, por sua amizade e prontidão para ajudar.
- Aos meus sogros, Eduardo e Lenita, que sempre me fizeram sentir como um filho e me deram suporte na família quando eu me ausentava.
- A Cláudia e Ricardo pelo carinho, amizade e apoio à minha esposa e, principalmente, aos meus filhos durante os períodos de viagem.
- Aos estagiários, em especial, Cláudia Fernandes e Fernando Rebelatto, por sua contribuição no desenvolvimento prático deste trabalho.
- Aos Professores Ed Hoffman, Mário Binelli e Anelise Traldi (Kiki), pelo exemplo de profissionalismo, pela amizade e disposição em discutir assuntos técnicos e profissionais.
- Ao engenheiro eletrônico Motta e a TK.Tecnologia em congelação pelo apoio técnico e a disponibilização do aparelho programável automatizado,
- Ao Departamento de Reprodução Animal representado pelos professores, funcionários, alunos de Pós-Graduação e estagiários.

- A todos aqueles que, por puro esquecimento, não foram aqui mencionados, mas que direta ou indiretamente me auxiliaram a vencer mais uma etapa da minha vida.

A vida é uma sobreposição de idéias, um conjunto de forças, onde o que conta é o ser fiel, a nós, ao que construímos e ao que acreditamos. É na caminhada da vida que passamos a achar o sentido dela. A melhor maneira de compreender é fazer.

Kant

RESUMO

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

Durante o processo de criopreservação o espermatozóide passa por mudanças estruturais nas membranas que resulta em diminuição da fertilidade. Este estudo foi realizado para comparar os efeitos de duas técnicas de congelação (técnica convencional e técnica automatizada), curvas de congelação e o uso de três crioprotetores (glicerol, etilenoglicol e dimetilformamida) sobre a motilidade, vigor e integridade das membranas espermáticas (plasmática, acrossomal e mitocondrial) do sêmen bovino. Foram utilizados cinco touros da raça Simental, coletados semanalmente por seis semanas. O sêmen foi avaliado e diluído em tris-gema (fração única), preparado previamente com os seguintes crioprotetores:- dimetilformamida (3%), etilenoglicol (7%) ou glicerol (7%). A metade das doses foi congelada pela técnica convencional (TC), da seguinte maneira:- seis quilogramas de gelo moído foi colocado em uma de uma caixa de isopor de 15 litros, quando então as palhetas a serem congeladas foram colocadas sobre um suporte, na posição horizontal, por 90 minutos (curva de resfriamento, $-0,55^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Imediatamente após, o suporte com as palhetas foi transferido para outra caixa de isopor onde as palhetas permaneceram em vapor de nitrogênio (3cm), por 15 minutos (curva de congelação, $-19,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$). A outra metade das palhetas foi criopreservada pela técnica automatizada (TA), utilizando-se um aparelho programável portátil de controle eletrônico (TK2000), com taxa de resfriamento de $-0,23^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ e taxa de congelação de $-15,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$. Após a congelação as palhetas foram mantidas em botijões criogênicos e descongeladas para avaliação da motilidade (%) e vigor (1-5) por microscopia óptica. A integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial foi avaliada

utilizando-se o iodeto de propídio (PI); aglutinina de *Pisum sativum* conjugada a fluoresceína (FITC-PSA) e MitoTracker Green FM (MITO), respectivamente, por microscopia de epifluorescência. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do Programa StatView[®] (SAS Institute, Cary, NC, USA). Não houve diferenças significativas entre as técnicas e nem interação entre crioprotetor e técnica de congelamento ($P>0,05$) para os parâmetros avaliados. Houve diferença entre os crioprotetores ($P<0,05$), sendo que o glicerol preservou melhor a motilidade, o vigor e a integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial dos espermatozoides quando comparado ao etilenoglicol e a dimetilformamida. O etilenoglicol foi superior à dimetilformamida para as avaliações da motilidade e da integridade das membranas plasmática e mitocondrial ($P<0,05$). Uma vez que, 85% dos espermatozoides apresentaram algum grau de lesão, isto nos conduz a inferir que pesquisas são necessárias para que se obtenha melhoria nos resultados após a criopreservação do sêmen bovino.

Palavras chaves: Bovinos. Sêmen animal. Espermatozoides. Criopreservação. Crioprotetor animal.

ABSTRACT

GONZALEZ, R.A.F. **Effect of cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotectants on sperm parameters and membranes integrity of bovine spermatozoa.** [Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino]. 2004. 92 f. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.

During cryopreservation, spermatozoa undergo many changes leading to membrane damage which result in decreased fertility. This study was designed to compare the effects of two freezing techniques (conventional and automated), their freezing curves and the use of three cryoprotectants (glycerol, ethylene glycol and dimethylformamide) on the motility, vigor and integrity of spermatic membranes (plasmatic, acrosomal, and mitochondrial) of bovine semen. Five Simmental bulls ranging from 24 to 36 months age were submitted one a week to semen collection for six weeks. Semen samples were evaluated and diluted in TRIS-yolk medium (one step). Each semen collection dilutors were prepared previously with each of following cryoprotectants:- glycerol (7%), ethylene glycol (7%) or dimethylformamide (3%). Half of the amount of straws (0.5 mL) was frozen by a conventional manual technique (TC), as in following protocol:- six kilograms of ground ice were placed in the bottom of a thermal box (15 L), straws were cooled on a grid placed horizontally for 90 minutes (cooling rate, -0.55°C/min), immediately transferred to another thermal box and frozen in static liquid nitrogen vapor (15 min) on the same grid placed 3 cm above the liquid nitrogen (freezing rate, -19.1°C/min). The other half of straws was frozen by automated technique (TA). TA was performed using an electronic controlled programmed machine (TK2000) which cooling rate was -0.23°C/min and freezing rate was -15.5°C/min. Straws were plunged into liquid nitrogen and stored at -196°C. The motility (%) and vigor (1-5) were assessed using optic microscopy. The integrity of plasmatic, acrosomal and mitochondrial membranes were evaluated using

propidium iodide (PI), fluorescein conjugated *Pisum sativum* agglutinin (FITC-PSA) and MitoTracker Green FM (MITO), respectively, by fluorescence microscopy. Effects of treatment were analyzed by StatView[®] Program, (SAS Institute, Cary, NC, USA). There were no significant differences ($P>0.05$) between the two freezing techniques and no interaction among cryoprotectant and freezing techniques for all assessed parameters. Glycerol showed better results ($P<0.05$) than other two cryoprotectants for motility, vigor, and integrity of plasmatic, acrosomal and mitochondrial membranes. Ethylene glycol was superior ($P<0.05$) than dimethylformamide in preserve motility, and integrity of plasmatic and mitochondrial membranes. Because 85% of spermatozoa showed some kind of post thawing injury, further studies are required to improve cryopreservation techniques used routinely for bovine semen

Key words: Bovine. Animal semen. Spermatozoa. Cryopreservation. Animal cryoprotectant.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: ANOVA.....	56
Tabela 2: Valores de motilidade espermática média e erros padrão (%) do sêmen bovino criopreservado utilizando-se as técnicas de congelação convencional (TC) e automatizada (TA), em diluidores com diferentes crioprotetores: Dimetilformamida, Etilenoglicol e Glicerol.....	58
Tabela 3: Valores médios de vigor espermático e erros padrão (1-5) do sêmen bovino criopreservado utilizando-se as técnicas de congelação convencional (TC) e automatizada (TA), em diluidores com diferentes crioprotetores: Dimetilformamida, Etilenoglicol e Glicerol.....	59
Tabela 4: Características espermáticas (%) do sêmen bovino criopreservado utilizando-se as técnicas de congelação convencional (TC) e automatizada (TA) com diferentes crioprotetores: Dimetilformamida (DFM), Etilenoglicol (EG) e Glicerol (G).....	62
Tabela 5: Valores médios e erros padrão (%) de espermatozóides com membrana plasmática intacta em sêmen bovino criopreservado utilizando-se as técnicas de congelação convencional (TC) e automatizada (TA), em diluidores com diferentes crioprotetores: Dimetilformamida, Etilenoglicol e Glicerol.....	63
Tabela 6: Valores médios e erros padrão (%) de espermatozóides com acrossomo lesado em sêmen bovino criopreservado utilizando-se as técnicas de congelação convencional (TC) e automatizada (TA), em diluidores com diferentes crioprotetores: Dimetilformamida, Etilenoglicol e Glicerol.....	64
Tabela 7: Valores médios e erros padrão (%) de espermatozóides com função mitocondrial em sêmen bovino criopreservado utilizando-se as técnicas de congelação convencional (TC) e automatizada (TA), em diluidores com diferentes crioprotetores: Dimetilformamida, Etilenoglicol e Glicerol.....	65
Tabela 8: Coeficientes de correlação linear observados entre as características espermáticas analisadas em sêmen bovino criopreservado e técnicas de congelação convencional (TC) e automatizada (TA).....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Caixa de isopor com gelo picado e o suporte com as palhetas de sêmen para o resfriamento.....	50
Figura 2:	Aparelho programável automatizado para criopreservação de sêmen (Tetakon, TK-2000).....	52
Figura 3:	Curvas de resfriamento do sêmen (°C/min.) determinadas para as técnicas automatizada (TA) e convencional (TC).....	52
Figura 4:	Curvas de congelação do sêmen (°C/min.) determinadas para as técnicas automatizada (TA) e convencional (TC).....	53
Figura 5:	Esquema Experimental.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A23187:	Cálcio ionóforo
ACP:	Agente crioprotetor penetrante
CTC :	Corante Clortetraciclina
CASA:	Computer-assisted semen analyses
DIC	Micoscópio de interferencia de contraste diferencial
DMF:	Dimetilformamida
DMSO:	Dimetilsulfoxido
Ea :	Energia de ativação
EDTA:	Ácido etilenodiamino tetra acético
EG:	Etilenoglicol
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína
G:	Glicerol
GOT:	Glutâmico-oxalacético-transferase
H258:	Corante Hoechst 33258
INRA82:	Diluidor para sêmen de bovinos
JC-1:	Iodeto de 5,5',6,6'-tetracoloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
Lp :	Coeficiente de permeabilidade de membrana à água
IIC:.	Espermatozóide com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com potencial mitocondrial
IIS:	Espermatozóide com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e sem potencial mitocondrial.
ILC:	Espermatozóide com membrana intacta, acrossomo lesado e com potencial

mitochondrial.

ILS: Espermatozóide com membrana intacta, acrossomo lesado e sem potencial mitochondrial.

MITO: Mito Tracker green FM.

LIC: Espermatozóide com membrana lesada, acrossomo intacto e com potencial mitochondrial.

LIS: Espermatozóide com membrana lesada, acrossomo intacto e sem potencial mitochondrial.

LLC: Espermatozóide com membrana lesada, acrossomo lesado e com potencial mitochondrial.

LLS: Espermatozóide com membrana lesada, acrossomo lesado e sem potencial mitochondrial.

OTL: Limite de tolerância osmótica.

PI: Iodeto de propídio.

P_{PCA}: Coeficiente de permeabilidade da membrana para o crioprotetor.

PSA: Aglutinina de *Pisum sativum*.

R123: Rodamina 123.

SYBR: Corante verde para ácido nucléico.

TA: Técnica automatizada.

TC: Técnica convencional.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	BASES DA CRIOBIOLOGIA DOS ESPERMATOZÓIDES	22
2.1.1	Taxas de Resfriamento.....	28
2.1.2	Osmolaridade.....	29
2.1.3	Taxas de Congelação.....	30
2.1.4	Métodos de Congelação.....	31
2.2	CRIOPROTETORES EXTRACELULARES (NÃO PENETRANTES)	33
2.3	CRIOPROTETORES INTRACELULARES (PENETRANTES)	34
2.3.1	Glicerol	35
2.3.2	Etilenoglicol	37
2.3.3	Dimetilformamida	38
2.4	AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA, ACROSSOMAL E MITOCONDRIAL DOS ESPERMATOZÓIDES	40
3	MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1	LOCAL E PERÍODO	47
3.2	ANIMAIS E MANEJO	47
3.3	COLHEITA DO SÊMEN	48
3.4	ANÁLISES DO SÊMEN FRESCO	48

3.5	DILUIÇÃO DO SÊMEN EM DILUIDOR CONTENDO GLICEROL, ETILENOGLICOL E DOMETILFORMAMIDA COMO CRIOPROTETORES.....	49
3.6	CONGELAÇÃO DO SÊMEN PELAS TÉCNICAS DE CONGELAÇÃO CONVENCIONAL (TC) E AUTOMATIZADA (TA)	49
3.6.1	Técnica de congelação convencional (TC)	49
3.6.2	Técnica de congelação automatizada (TA)	51
3.7	DESCONGELAÇÃO E ANÁLISES DAS AMOSTRAS.....	53
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
4	RESULTADOS	57
5	DISCUSSÃO.....	67
5.1	AVALIAÇÃO DOS CRIOPROTETORES SOBRE A CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN BOVINO.....	68
5.2	AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN BOVINO.....	75
6	CONCLUSÕES.....	78
7	REFERÊNCIAS	80
	ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O setor agropecuário tem hoje uma grande importância para o equilíbrio da balança comercial do Brasil. A alta produtividade de nossos solos e a capacidade tecnológica da agricultura estão quebrando recordes de produção e exportação de soja, milho, açúcar, etc. Este fato está criando um ambiente de competitividade entre agricultura e pecuária pelo uso da terra, pressionando ou exigindo do pecuarista um maior profissionalismo e eficiência visando produtividade.

Em resposta a isso existem dois tipos de tendências, uma que leva os produtores a se deslocarem para novas fronteiras, onde as terras são mais baratas, sem se preocupar com o desempenho e melhoramento animal e outra em que os produtores preferem investir em tecnologias que incrementam a produção das pastagens e a base genética de seu rebanho. Para os dois casos, o uso de biotecnologias como inseminação artificial, transferência de embriões e, a mais recente, a fertilização “*in vitro*”, podem proporcionar algumas vantagens e facilidades para tornarem-se mais competitivos com a agricultura. A inseminação artificial é a biotecnologia mais prática e econômica (quando bem utilizada), seu conhecimento é de fácil acesso, com isso, é possível a obtenção de grande número de pessoal técnico e profissional capacitado. O potencial é grande considerando que aproximadamente 6% das fêmeas do rebanho nacional são inseminadas por ano, quantidade muito baixa quando comparada com os índices de outros países (ASBIA, 2003).

Todavia, o processo de criopreservação das células espermáticas resulta em diminuição da fertilidade quando comparada com sêmen fresco. Este prejuízo surge da combinação de dois aspectos, morte celular e danos na capacidade funcional dos espermatozóides sobreviventes. A motilidade e a estrutura dos espermatozóides são afetadas

de diferentes formas, uma vez que ocorrem injúrias simultaneamente ou nas diferentes etapas da congelação e descongelação. É bem conhecido que o resfriamento rápido do sêmen de 20 para 5°C induz a um estresse letal para algumas células, este estresse é proporcional à taxa de resfriamento, intervalo de temperatura e ao limite de temperatura. Este processo é conhecido como choque frio, o qual afeta variavelmente a célula espermática.

Existem no Brasil importantes centrais que coletam, envasam e congelam sêmen dos melhores exemplares de cada raça bovina e para isso utilizam as mais modernas tecnologias de congelação. Alguns bons exemplares bovinos que apresentam qualidades genéticas melhoradoras, não têm acesso às centrais e encorajam seus proprietários para preservar seu material genético, para isso, têm-se procurado técnicos especializados que realizam esse trabalho na fazenda. Usualmente os técnicos, a campo, trabalham com materiais simples como: caixas de isopor ou de metal adicionadas de gelo ou usam geladeiras das propriedades para realizar a curva de resfriamento, e congelam em caixa de isopor com nitrogênio líquido. Esta técnica tem se mostrado viável, porém, é difícil padronizar as curvas de resfriamento e de congelação, uma vez que dependem da qualidade do material utilizado (vedação da geladeira, tipo de caixa de isopor, quantidade de gelo, nível de nitrogênio e outros).

Empresas brasileiras têm desenvolvido sistemas eletrônicos automatizados, portáteis, de baixo custo para o controle da congelação do sêmen. Esse tipo de equipamento permite programar um ou vários tipos de curvas de resfriamento e de congelação, o que assegura homogeneidade e padronização da curva utilizada.

Além do processo de congelação, o tipo de crioprotetor influencia diretamente o resultado da congelação do sêmen. No caso da congelação do sêmen bovino, o glicerol tem sido mais freqüentemente utilizado como crioprotetor e em muitos trabalhos tem-se mostrado sua eficiência, que, no entanto, é influenciada pela curva de congelação. Recentemente, as

amidas, principalmente a dimetilformamida, têm sido adicionadas como crioprotetores nos meios de diluição do sêmen eqüino com bastante êxito (ALVARENGA, 2000; MEDEIROS, 2003); entretanto, são poucos os trabalhos que utilizam esse crioprotetor para sêmen bovino.

Nagase et al. (1972) encontraram boa crioproteção com o uso de formamida e lactamida no sêmen de bovinos. O etilenoglicol tem sido usado com sucesso em sêmen eqüino (ARRUDA, 2000) e em pequena escala em sêmen bovino, sendo que alguns trabalhos mostraram vantagens frente ao glicerol e ao dimetilsulfoxido, devido a seu pequeno efeito osmótico, mantendo o tamanho ou volume celular durante a criopreservação e evitando perda de motilidade (GUTHRIE et al., 2002).

O presente estudo teve como objetivos avaliar o efeito da criopreservação do sêmen bovino utilizando duas técnicas de congelção (convencional e automatizada) e suas respectivas curvas, além do uso de três crioprotetores (glicerol, etilenoglicol e dimetilformamida) sobre a motilidade, vigor e integridade das membranas espermáticas (plasmática, acrossomal e mitocondrial) utilizando sondas fluorescentes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BASES DA CRIOBIOLOGIA DOS ESPERMATOZÓIDES

O processo de criopreservação das células espermáticas resulta em diminuição da fertilidade quando comparada com sêmen fresco. Este prejuízo surge da combinação de dois aspectos, perda da viabilidade espermática ou danos na capacidade funcional dos espermatozóides sobreviventes (WATSON, 2000).

Salamon e Maxwell (1995) afirmaram que apesar de 40 a 60% dos espermatozóides do sêmen de carneiros apresentarem motilidade pós-descongelação, somente 20 a 30% deles permanecem biologicamente inalterados. Os danos básicos que os espermatozóides sofrem durante o processo de congelação podem ser ultra-estruturais ou físicos, bioquímicos ou funcionais. O espermatozóide pode ser móvel mas estar danificado, de tal maneira que a penetração e fertilização do oócito seja improvável. Taresson et al. (1977) afirmaram que após a congelação do sêmen a motilidade é melhor preservada que a integridade acrossomal dos espermatozóides. Nath (1972) reportou que 40 a 50% dos espermatozóides após a congelação e descongelação tiveram danos mitocondriais e a estrutura do axonema foi prejudicada, sendo que esta última alteração morfológica pode ser devida à despolimerização parcial dos microtúbulos.

Deve ser ressaltado que o processo da criopreservação exerce efeitos negativos principalmente sobre a membrana celular, particularmente vulnerável a este processo. Existem três membranas no espermatozóide: membrana plasmática, membrana do acrossomo e membrana mitocondrial, com exceção da última, as outras apresentam diferenças em domínios na sua estrutura e comportamento (PARKS; GRAHAM, 1992; WATSON, 1995).

O modelo estrutural básico da membrana espermática é igual ao modelo biológico clássico formado por duas camadas de fosfolípidios com proteínas integrais e glicoproteínas de superfície de ligação e glicolipídios organizados em um mosaico fluído (SINGER; NICHOLSON, 1972).

Contudo, se sabe que nos espermatozóides da maioria das espécies há, de maneira particular, fosfolípidios, glicolipídios e esteróides (WATSON, 1995). Parks e Lynch (1992) determinaram a composição e comportamento na fase termotrófica dos lipídios de membrana de espermatozóides de cachorro, touro, garanhão e galo, de acordo com uma classificação baseada no grau de sensibilidade ao choque frio. Lipídios do sêmen total e da membrana plasmática foram divididos em lipídios neutros, glicolipídios e fração de fosfolípidios, além de esteróides livres e fosfolípidios ligados a ácidos graxos. O colesterol foi o esteróide encontrado em maior quantidade dentre os lipídios espermáticos nas espécies estudadas. Dos fosfolípidios encontrados em maior frequência tem-se: esfingomielina, fosfatidil-colina e fosfatidil-etanolamina. Dos ácidos graxos ligados a fosfolípidios foi caracterizada uma alta proporção de grupos docosapentanóicos e de docosahexanóicos nos espermatozóides das espécies de mamíferos e de ácidos graxos de cadeia menor com maior número de saturações no espermatozóide de galo. Os glicolipídios correspondem a menos que 10 % do total de lipídios polares das membranas espermáticas nas espécies estudadas, observando-se que o maior glicolipídio encontrado no espermatozóide do galo é diferente do encontrado nos espermatozóides de mamíferos, o que tem relação à maior tolerância do espermatozóide de galo ao rápido resfriamento. Espermatozóides de carneiros são mais sensíveis a criopreservação que de touros (WATSON; MARTIN, 1972). Diferenças entre as membranas da célula espermática de carneiros foram observadas por Holt e North (1985).

Dentro do conceito de assimetria de fosfolipídio, na qual cada tipo de fosfolipídio tem uma preferência na sua orientação específica dentro da bicamada, existe também o fato

que a quantidade e tipo de fosfolipídio muda de acordo com a espécie animal, tudo isso pode, de certa forma, estar relacionado à estabilidade da membrana celular (HAMMERSTED et al., 1990).

A assimetria da bicamada lipídica é importante para a função da membrana celular. No caso das hemácias, esta assimetria é devida à polaridade dos fosfolipídios de membrana que estão concentrados em sua grande maioria na camada interna, devido à ação da enzima aminofosfolipide-translocase (VERHOVEN et al., 1992). Nas células espermáticas este sistema seria semelhante (MULLER et al., 1994), sendo que a alteração da assimetria seria a responsável pelo aumento da fluidez da camada externa dos espermatozóides durante a capacitação. Segundo estas informações e sabendo que as enzimas são dependentes da temperatura, podemos pensar que a congelação e descongelação podem provocar a quebra da assimetria da membrana em parte por esta via enzimática devido a alterações da função da enzima aminofosfolipide-transferase (WATSON, 1995).

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

A integridade da membrana do acrossomo é indispensável para a fertilidade, pois são necessários vários espermatozóides com acrossomos inalterados para gerar uma prenhez.

Chan et al. (1996) corroboraram estes fundamentos quando encontraram correlação positiva ($r=0,43$; $p<0,05$) entre a porcentagem de espermatozóides com acrossomo intacto avaliados pelo corante Spermac e a porcentagem de espermatozóides que penetraram oócitos “zona-free” de hamster, sendo esta última, também correlacionada positivamente com a velocidade linear dos espermatozóides ($r=0,34$). Estes dados mostram que a integridade da membrana acrossomal pode estar relacionada também com a integridade de outras membranas e também com a motilidade celular.

As membranas celulares ancoram-se no citoesqueleto, desta forma, qualquer alteração nessa estrutura pode, de alguma maneira, repercutir negativamente na função celular. O resfriamento de embriões bovinos com etilenoglicol como crioprotetor causou despolimerização prematura dos filamentos de actina (SAUNDERS; PARKS, 1999), o que pode ser explicado baseado no fato de que muitas destas proteínas apresentam despolimerização e repolimerização de acordo com a temperatura a que são submetidas, o que traz importantes implicações na criopreservação dos espermatozóides (WATSON, 1995).

Spungin et al. (1995) propuseram que a despolimerização da F-actina do citoesqueleto é um passo necessário para permitir a aproximação do plasmalema à membrana do folheto externo acrossomal para produzir a exocitose, portanto, a despolimerização e repolimerização de acordo com a temperatura do resfriamento e criopreservação poderia contribuir com a uma fusão desorganizada.

O declínio na motilidade observado após congelação e descongelação da célula espermática pode ser explicado, em parte, pelas mudanças no transporte ativo e permeabilidade da membrana plasmática na região da cauda, sendo que também pode ser devido à disponibilidade de energia ou danos nos elementos do axonema (WATSON, 1995). No entanto, Holt et al. (1992) não detectaram efeitos negativos da congelação sobre as estruturas dos microtúbulos flagelares de espermatozóides de carneiro.

Counters et al. (1989) observaram mudanças na arquitetura mitocondrial após a criopreservação. Alterações nas mitocôndrias durante o resfriamento a 5°C foram descritas como mudanças na estrutura, que incluem condensação e perda de material mitocondrial (JONES; MARTIN, 1973) ou alterações na forma da mitocondria (WOOLLEY; RICHARDSON, 1978). Após o choque frio, Quinn et al. (1969) reportaram alterações mitocondriais que incluíam aparência mais clara e perda de proteínas, confirmadas histoquimicamente.

Watson (1995) relatou que espermatozóides submetidos a congelação apresentam grandes cristais de gelo nas mitocôndrias e após a descongelação perdas de conteúdo estrutural. Portanto, como a fosforilação oxidativa e o transporte de prótons são realizados na membrana, é provável que a produção de adenosinatrifosfato (ATP) seja prejudicada nesse processo.

Dentre os compartimentos sobre os quais a criopreservação pode causar algum tipo de efeito negativo na célula espermática, o núcleo pode ser considerado um elemento importante no contexto, mas tem sido considerado sempre como um elemento estável e menos afetado pela congelação e a descongelação. Têm sido mostradas mudanças em espermatozóides suínos corados pela técnica de “Feulgen” nos quais foi observada maior intensidade do corante em áreas nucleares após a congelação (HAMAMAH et al., 1990). Também foi observada perda de fertilidade de amostras de sêmen humano congeladas e descongeladas quando comparadas com amostras que não sofreram tal processo, sugerindo uma maior condensação da cromatina que pode estar ligada ao resultado de fertilidade (ROYERE et al., 1991).

O grau de desnaturação do DNA durante a criopreservação pode ser influenciado pelo diluente, tendo efeito negativo na subsequente fertilidade (KARABINUS et al., 1991). No entanto, segundo Watson, (1995) o amplo uso da inseminação em décadas passadas, tem

mostrado poucos sinais de dano no genoma haplóide do espermatozóide. Posteriores avanços têm mostrado uma maior contribuição do espermatozóide para o desenvolvimento do zigoto que a de simples portador da metade do genoma e o surgimento da possibilidade de o espermatozóide fornecer elementos importantes para união genômica como é o caso de microtúbulos do centrossomo espermático (NAVARA et al., 1995), o que implicaria em efeitos mais delicados e às vezes imperceptíveis nos quais a função do espermatozóide pode ser de alguma maneira afetada pela criopreservação (WATSON, 2000).

Alterações na motilidade e na estrutura dos espermatozoides ocorrem simultaneamente nas diferentes etapas de congelamento e descongelamento. É bem conhecido que o resfriamento rápido do sêmen dos ungulados de 30 para 0°C induz a um estresse letal para algumas células, esse estresse é proporcional à taxa de resfriamento, intervalo de temperatura e ao limite de temperatura. Este processo é conhecido como choque frio, o qual afeta variavelmente as espécies (WATSON, 2000). O efeito deste processo é manifestado no espermatozóide com motilidade espermática alterada (movimento em círculos ou retrógrado, presença de peças intermediárias dobradas) e muitos destes processos são considerados irreversíveis.

O rápido resfriamento do espermatozóide na ausência de diluidores leva a danos tanto da membrana plasmática como acrossomal (BALL, 1998). Mesmo no resfriamento lento a mudança da temperatura determina estresse sobre a membrana, sendo provável que este processo seja devido à mudança de fase dos lipídios da bicamada e alteração do estado funcional da membrana. Sabe-se que em sêmen bovino, a maior mudança de fase ocorre entre 5 a 15°C, intervalo de temperatura onde é produzida a injúria (AGCA; CRITSER, 2002; De LEEW et al., 1990; WATSON, 2000).

Outro efeito importante durante o resfriamento é produzido quando elementos da membrana, como proteínas integrais, são agrupados pela separação da fase lipídica, processo

pelo qual as funções dessas proteínas terminam sendo afetadas, como por exemplo, os canais iônicos (cálcio). Deve-se a isto, o fato que a permeabilidade da membrana aumenta após o resfriamento (ROBERTSON; WATSON, 1986). A regulação do cálcio é claramente afetada pelo resfriamento e isto tem, indubitavelmente, sérios efeitos sobre a função celular. A saída de cálcio tem implicações na capacitação e fusão entre a membrana plasmática e a porção externa da membrana do acrossomo. Existe similaridade entre dano da membrana durante o resfriamento e a reação acrossomal (AGCA; CRITSER, 2002; BALL, 1998). A saída do cálcio durante o resfriamento contribui para mudanças relacionadas à capacitação e eventos de fusão entre as membranas plasmática e a porção interna da membrana acrossomal externa, o que seria uma versão desorganizada da reação acrossomal (WATSON, 2000).

2.1.1 Taxas de Resfriamento

As taxas de resfriamento e o tempo de equilíbrio têm sido testados no espermatozóide bovino tentando empiricamente determinar a curva ideal de resfriamento. Januskauskas et al. (1999) compararam o efeito de duas taxas de resfriamento (0,1 °C/min vs. 4,2 °C/min) sobre a viabilidade espermática *in vitro* e fertilidade após a inseminação artificial. Eles não observaram nenhuma diferença estatística para a motilidade pós descongelação avaliada por microscopia óptica, a integridade da membrana plasmática, a integridade acrossomal, e a capacitação (corante de clortetraciclina ou ensaio CTC), avaliados por microscopia de epifluorescência e taxa de fertilidade. No entanto, os parâmetros de motilidade e cinética, avaliados pelo sistema automatizado de avaliação da motilidade espermática (CASA), foram estatisticamente diferentes para os tratamentos sendo menos vigorosos, menos lineares e menos progressivos quando a taxa de resfriamento foi menor.

Também, Dhami e Sahni (1993) avaliaram a congelação com diferentes taxas de

resfriamento, períodos de equilíbrio e efeitos do diluidor sob a perda de enzimas (transaminase - GOT) e fertilidade de touros. Eles encontraram que taxas de resfriamento lenta, partindo de 30 até 5°C por duas horas, resultaram em melhor motilidade pré e pós congelação, melhor taxa de fertilidade e menos perdas de enzimas GOT do que quando as células foram mantidas por um período de uma hora, ou quando partia-se de 10 até 5°C por duas horas ou uma hora. O período de equilíbrio a 5°C, por duas horas manteve melhores taxas de motilidade espermática pós-descongelação e melhores taxas de fertilidade do que sem período de equilíbrio.

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

2.1.2 Osmolaridade

Quando uma solução é submetida a temperaturas abaixo do ponto de congelação, cristais de gelo são formados fora da célula, o que aumenta a pressão osmótica extracelular pela concentração de solutos na água não congelada. No caso de temperatura baixa, haverá pouco líquido não congelado e alta pressão osmótica, tornando o ambiente não apropriado para a célula. Como consequência de tudo isso deve ser utilizada uma rápida taxa de resfriamento entre 15 a 60°C/min, o que tem sido estabelecido empiricamente como responsável por melhores taxas de sobrevivência (WATSON, 2000).

Watson (1995) propõe que ótima taxa de resfriamento pode ser determinada segundo a sensibilidade do espermatozóide ao estresse osmótico. Acredita-se que o importante não seja

a permeabilidade à água, mas sim a taxa de deslocamento da água requerida pela membrana para se adaptar à mudança de volume e isto pode afetar as ligações com o citoesqueleto.

Fraser, Gorszczaruk e Strzezek, (2001) avaliaram a relação entre a motilidade espermática de sêmen de suínos e integridade de membrana seguida à exposição a meios anisomóticos e constataram queda nas concentrações de ATP e consequente diminuição da motilidade sob essas condições. Gao et al (1995) também observaram diminuição da motilidade e perda da integridade da membrana em espermatozóides humanos submetidos a meios anisomóticos. A quantidade de ATP no sêmen de touros a fresco e após a criopreservação tem sido correlacionada positivamente com a porcentagem de motilidade (JANUSKAUSKAS; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1995).

O limite de tolerância osmótica (OTL) que a célula espermática suporta, ou seja, o quanto a célula pode encolher ou expandir segundo as mudanças de osmolaridade, varia entre as espécies, sendo o espermatozóide do homem o que apresenta maior capacidade de OTL, quando comparado aos espermatozóides de suíno, bovino e camundongo. É possível utilizar o OTL como limiar para determinar a quantidade e o tempo requerido para a adição e a remoção do crioprotetor de modo a manter as células dentro de sua margem de tolerância de volume (AGCA; CRISTER, 2002).

2.1.3 Taxas de Congelação

Normalmente os protocolos de criopreservação de sêmen têm utilizado taxas de congelação que vão desde 10 a 100°C/min, obtendo-se boas taxas de sobrevivência pós criopreservação (AGCA; CRITSER, 2002).

Chen et al. (1993) testaram o efeito do super-resfriamento (-13 ou -14°C antes da congelação até -196°C) e da formação de cristais de gelo no sêmen de touros sobre a

motilidade pós-descongelação de sêmen em diluidores à base de tris-gema e leite total. Este trabalho permitiu demonstrar que os espermatozóides são mais sensíveis às mudanças de temperaturas quando congelados com leite total do que em tris-gema. Taxas de congelamento de -15, -25 e -35°C/min causaram índices de sobrevivência similares e foram superiores à congelamento a -5°C/min.

Agca e Critser (2002) relataram que recentes pesquisas têm sido direcionadas no sentido de otimizar os protocolos de criopreservação quantificando alguns parâmetros biofísicos como o coeficiente de permeabilidade da membrana celular para água (L_p), para o crioprotetor (P_{CPA}) assim como sua energia de ativação (E_a). Estes parâmetros têm sido determinados em espermatozóides de várias espécies de mamíferos e utilizados para prever o tipo e a concentração ótima do crioprotetor, a velocidade de adição e de retirada do crioprotetor, além da taxa de congelamento e descongelamento. A permeabilidade da membrana celular dos espermatozóides de várias espécies à água é considerada alta quando comparada com a de outros tipos celulares (GILMORE, 1996; NOILES et al., 1993; NOILES et al., 1997; WATSON, 2000). Todavia, os resultados obtidos têm deixado dúvidas a respeito da importância da velocidade de passagem da água na determinação da taxa de resfriamento ideal, já que as técnicas utilizadas superestimam os valores e estes dados podem não representar a realidade em toda a célula, uma vez que existe regionalização da membrana plasmática do espermatozóide, além do fluxo de água ser influenciado pela temperatura; abaixo de zero grau Celsius o fluxo tende a ser menor (DEVIREDDY et al., 1999; GILMORE et al., 2000).

2.1.4 Métodos de Congelamento

Todos os critérios anteriores são importantes para estabelecer taxas e curvas de

resfriamento e congelação, mas é importante também entender como esses conhecimentos estão sendo aplicados nas técnicas de processamento de sêmen utilizando sistemas programados ou automatizados. A congelação em aparelho automatizado foi inicialmente descrita por Almquist e Wiggins (1973), posteriormente Landa e Almquist (1979) estudaram mais a fundo a técnica de congelação automatizada, não encontrando nenhum efeito negativo da criopreservação de grande número de palhetas no aparelho de congelação automatizado (injeção forçada de nitrogênio) sobre a retenção de acrossomos e motilidade pós-descongelação, comparada com congelação em pequenas partidas (estáticas) nos vapores de nitrogênio de sêmen bovino. No entanto, Almquist et al. (1982) observaram que a taxa de não retorno de vacas inseminadas com sêmen processado, em grande escala, no aparelho automatizado, foi inferior a de sêmen bovino congelado em pequenas partidas no vapor de nitrogênio, provavelmente pela baixa temperatura (-100°C) alcançada antes de ser mergulhada no nitrogênio líquido, valor acima do ideal (-80°C). A vantagem da congelação no vapor de nitrogênio (estática), está em que todas as palhetas permanecem durante todo o processo de congelação submetidas às mesmas condições ou taxas de congelação, mesmo que o sêmen esteja sujeito a condições de congelação menos controladas (depende da distância entre o suporte das palhetas e o nível de nitrogênio líquido).

Em congeladores programáveis, as palhetas estão localizadas em mais que um nível e isto contribui para que aconteçam consideráveis variações na taxa de congelação individual de cada palheta dentro de um ciclo de congelação (VISHWANATH; SHANNON, 2000). No entanto, a central de congelação de sêmen Lagoa da Serra utiliza um aparelho automatizado que congela 5.000 doses (palhetas de 0,25 mL) em fração única do diluidor TRIS-glicerol-gema e o nitrogênio injetado até atingir 140°C negativos, obtendo bons resultados de fertilidade a campo (comunicação pessoal, 2003).

2.2 CRIOPROTETORES EXTRACELULARES (NÃO PENETRANTES)

Os agentes crioprotetores não penetrantes aumentam a osmolaridade do meio extracelular, são responsáveis pela passagem da água do interior da célula espermática para o meio extracelular impedindo assim a formação de cristais de gelo de seu interior durante a congelação. São moléculas de alto peso molecular como açúcares, lipoproteínas da gema de ovo, proteínas do leite e em alguns casos, aminoácidos (AMANN; PICKETT, 1987). Substâncias iônicas ou não, que contribuem para manter a osmolaridade e o pH (tampão) ou também aditivos como enzimas e antibióticos, podem ser adicionados ao meio de congelação, (VISHWANATH; SHANNON, 2000).

Os componentes hidroxila das moléculas de açúcares têm a capacidade de proteger as células das injúrias causadas pela congelação eutética do meio biológico, pela sua habilidade em capturar sais como o NaCl em um meio viscoso ou mesmo em uma fase cristalizada (NICOLAISEN; HVIDT, 1994). Trabalhos mais recentes mostraram que meios diluidores com trealose e sacarose (hiperosmóticos) contribuem para a proteção do espermatozóide bovino contra as taxas de congelação acima da ideal (-74 a -140°C/min) (WOELDERS et.al., 1997).

Depois que Phillips e Lardy (1940) reportaram que a gema de ovo protegia o espermatozóide dos efeitos do rápido resfriamento, ou choque frio, tem-se utilizado amplamente a gema de ovo na conservação dos espermatozóides de mamíferos. As lipoproteínas de baixa densidade da gema de ovo, especificamente os fosfolipídios, têm sido determinadas como componentes efetivos na preservação e proteção do espermatozóide. É conhecido que a perda de fosfolipídios pela membrana da célula espermática é uma das causas da diminuição da viabilidade, é fácil aceitar que a adição da gema de ovo deve prevenir ou modular tais efeitos (PARKS; GRAHAM, 1992). A gema de ovo é também um

tampão osmótico e sua presença permite suportar qualquer meio hiper ou hiposmótico (JONES; MARTIN, 1973). Moussa et al. (2002) comprovaram que crioprotetores adicionados de 8% de lipoproteínas de baixa densidade extraídas da gema de ovo foram mais eficientes na conservação do sêmen que os crioprotetores comerciais que continham gema de ovo (Triladyl®) e extrato de soja (Biociphos®).

2.3 CRIOPROTETORES INTRACELULARES (PENETRANTES)

Os agentes crioprotetores penetrantes (ACP) são substâncias ou fármacos que diminuem as lesões de origem química ou mecânica que a congelação causa sobre a célula (KAROW, 2001). As características físico-químicas ideais que um ACP deve possuir são: baixo peso molecular; alta solubilidade em meio aquoso e principalmente uma baixa toxicidade celular (NASH, 1966). Os ACPs agem reduzindo o dano celular causado pelos efeitos da concentração dos sais no meio (PEGG, 2002). Possuem estruturas que lhes permitem fazer ligações de hidrogênio com a molécula de água, diminuindo assim a formação de cristais de gelo, reduzindo o aumento de tamanho desses cristais e diminuindo a concentração de soluto nos meios extra e intra-celulares (DALIMATA; GRAHAM, 1997). Estas ligações de hidrogênio também promovem uma estabilização da estrutura quaternária das proteínas de membrana preservando-as da desidratação (KAROW, 2001).

A habilidade de um crioprotetor de se ligar ao hidrogênio da molécula de água é a mais importante característica de um bom crioprotetor (NASH, 1966). Karow (2001) estabeleceu a diferença da toxicidade dos ACPs por efeitos farmacológicos e bioquímicos e por injúrias físicas como a osmolaridade. A toxicidade de um ACP está influenciada por sua concentração, momento de adição e temperatura em que é realizada a exposição da célula ao agente.

Ashwood-Smith (1987) resumiu os diferentes componentes que podem ser usados como agentes crioprotetores para o congelamento de sêmen, como os álcoois etanol, etilenoglicol, glicerol, metanol e polietilenoglicol e também as amidas, incluindo a acetamida, formamida, lactamida, bem como o dimetilsulfoxido (DMSO). O uso de crioprotetores para os quais as células têm alta permeabilidade resulta em boa sobrevivência celular. No caso do espermatozóide do homem, quantidades de 1M de etilenoglicol ou de glicerol permitiram boas taxas de motilidade espermática após a criopreservação (GILMORE; 1997).

2.3.1 Glicerol

O glicerol é quimicamente considerado um álcool que contém três grupos funcionais de hidroxilas que podem aceitar um hidrogênio da molécula de água em seis sítios diferentes conforme figura abaixo.

Foi o primeiro crioprotetor a ser utilizado em espermatozóides (POLGE et al, 1949) e tem sido amplamente utilizado para o sêmen de bovino, sendo que seu efeito crioprotetor se relaciona à sua capacidade de ligação com a água e à baixa dissociação com sais, portanto, diminuindo a osmolaridade do meio de congelação. Estas propriedades são favorecidas por sua capacidade de atravessar facilmente a membrana celular, mantendo a osmolaridade interna e externa.

Kundu et al. (2000) formularam a hipótese que o mecanismo de proteção desta molécula se deve à capacidade de ligação dos átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila com os átomos de oxigênio dos grupos fosfato dos fosfolípidios da membrana do espermatozóide, promovendo assim a estabilização da membrana durante o processo de criopreservação.

Parks e Graham (1992) resumiram alguns efeitos do glicerol sobre a membrana plasmática: ligação com fosfolipídios reduzindo a fluidez da membrana, interagindo com proteínas e glicoproteínas e formando agrupamentos intramembrana; redução da capacidade elétrica provavelmente pela promoção de reorganizações, em grande escala, na estrutura de membrana que inclui a formação de junções semelhantes às junções Gap; formação de interdigitações dos folhetos da bicamada alterando a fluidez pela organização do interior das cadeias de ácidos graxos.

A concentração de glicerol utilizada como crioprotetor é limitada pela sua toxicidade, a qual depende da taxa de resfriamento, velocidade de congelação, composição do diluidor e método de adição do glicerol (FAHY, 1986; WOELDERS, 1997). Alterações nos microtúbulos do citoesqueleto têm sido relacionadas ao glicerol, tais processos podem afetar a interação com proteínas e desta maneira mudar as transduções de sinal ou mesmo causar quebras de domínios (PARKS; GRAHAM, 1992), o glicerol induz ou acelera a reação acrossomal em espermatozóides de carneiros, isto está relacionado a baixas taxas de prenhez (Slavik, 1987). O glicerol tem mostrado sua toxicidade para espermatozóides de camundongo (KATKOV et al., 1998) e homem (CRITSER et al., 1988).

Métodos convencionais de congelação em palhetas de 0,25 mL e 0,5 mL têm utilizado quantidades de 7% de glicerol como concentração ótima para diluidores à base de citrato-gema ou tris-gema (De LEEW et al., 1993). As concentrações de glicerol para congelação do sêmen bovino têm estado entre 0,25 M (2,25 %) e 1 M (9 %), sendo que esta última concentração tem mostrado toxicidade (FAHY, 1986). O glicerol pode ser ligeiramente tóxico aos espermatozóides mesmo na concentração de 4% (FISER; FAIRFULL, 1984) e seu efeito prejudicial é menor quando sua adição é feita a temperaturas próximas a 0°C. A explicação possível desta toxicidade é o efeito osmótico imediato causado pela adição abrupta ao sêmen (MAZUR, 1985). Sabe-se que os espermatozóides do homem e de touros

são mais resistentes à adição, em uma única fase, de concentrações de 5 a 8% de glicerol, que outras espécies (AGCA; CRITSER, 2002).

2.3.1 Etilenoglicol

Outro crioprotetor bastante utilizado é o etilenoglicol, quimicamente classificado como álcool, possui quatro pares de elétrons isolados, podendo se ligar com átomos de hidrogênio em quatro sítios e doar dois átomos de hidrogênio (KEITH, 1998), conforme a fórmula abaixo. Pode também realizar ligações de hidrogênio na membrana do espermatozóide (KUNDU et al, 2000).

Na congelação de sêmen de garanhões o etilenoglicol tem sido estudado e comparado com o glicerol. Mercante et al. (1995) observaram similaridade entre eles para o vigor, motilidade, porém com uma tendência positiva para o etilenoglicol. Porém, Arruda (2000) examinou a substituição do glicerol pelo etilenoglicol como agente crioprotetor de espermatozoides de garanhões, e concluiu que o etilenoglicol e o glicerol têm propriedades crioprotectoras semelhantes.

Neves Neto et al. (1995) compararam as taxas de prenhez de éguas inseminadas com etilenoglicol ou glicerol em meio de congelação à base de Lactose-EDTA-gema, não encontrando diferença estatística (36% vs. 12%, respectivamente, $p > 0,05$). Arruda (2000) constatou efeito de interação entre o meio de congelação INRA82 e o diluente à base de leite desnatado com o crioprotetor etilenoglicol, observando uma tendência de melhora nas variáveis de motilidade avaliadas pelo sistema CASA e a viabilidade espermática e integridade de acrossomo avaliados por sondas fluorescentes (FITC-PSA/H258 e FITC-

PSA/PI) em espermatozóides eqüinos, não tendo observado diferença para Lactose-EDTA-Gema de ovo e os crioprotetores etilenoglicol e glicerol.

Guthrie et al. (2002) estudaram as propriedades osmóticas dos espermatozóides bovinos avaliando o efeito da adição e da retirada do agente crioprotetor (glicerol, DMSO ou etilenoglicol) sobre a motilidade. A motilidade espermática após a adição e remoção de 1 M de glicerol, dimetilsulfoxido e etilenoglicol foi reduzida em 30, 90 e 6%, respectivamente (cada um adicionado e removido independentemente). Estes dados indicam que durante a criopreservação do espermatozóide bovino, as mudanças do volume celular provocadas pela pressão osmótica (adição e retirada dos crioprotetores) têm que ser as menores possíveis, o que pode ser facilitado com o uso de etilenoglicol, cuja molécula produz um menor estresse osmótico que o glicerol e o DMSO.

Gilmore et al. (1995) determinaram os parâmetros de permeabilidade para o espermatozóide humano na presença dos crioprotetores glicerol, dimetilsulfóxido, propilenoglicol e etilenoglicol. Encontraram ainda, que a permeabilidade à água no espermatozóide humano diminui quando são utilizados crioprotetores de baixo peso molecular e não iônicos.

2.3.3 Dimetilformamida

As amidas são moléculas que tem três pontos de ligação ao hidrogênio, três a menos que o glicerol, conforme a figura abaixo. Esta característica torna-as menos solúveis em água que o glicerol e menos viscosas, resultando em uma menor permeabilidade à membrana (NASH, 1966), esta característica pode diminuir a possibilidade de danos celulares por estresse osmótico causado por outros crioprotetores (BALL; VO, 2001).

Acetamidas ou formamidas adicionadas de radicais metil foram mais efetivos na sua capacidade crioprotetora que os que não tinham tais radicais (KEITH, 1998).

Estudos têm encontrado vantagens para a criopreservação de tecidos vivos com o uso de dimetilformamida e etilformamida. Estas moléculas têm apresentado maior capacidade de vitrificação e estabilização quando diluídas em água nas mesmas concentrações que o glicerol e etilenoglicol. Isto faz dessas substâncias, bons candidatos para criopreservação de órgãos, o que dependerá de sua química e toxicidade osmótica quando utilizados para a criopreservação (BAUDOT; BOUTRON, 1998).

Medeiros (2003) observou que a dimetilformamida e dimetilacetamida protegem as células espermáticas de danos frente aos danos que a criopreservação pode causar sobre as variáveis avaliadas (motilidade óptica, motilidade computadorizada, integridade de membrana plasmática e acrossomal), bem como o potencial fertilizante dos espermatozóides pós-descongelamento, comparado ao glicerol e associações entre as amidas e glicerol.

Hamada e Nagase (1980) testaram a congelamento de sêmen de coelhos utilizando a formamida, butiramida, acetamida, proprionamida, dimetilformamida, lactamida e malomida entre outros, obtendo boas taxas de fertilização para lactamida e acetamida, 68 e 88%, respectivamente ($p < 0,05$), com média de nascimentos de 3 a 5 láparos.

Nagase et al. (1972) obtiveram boa preservação de espermatozóides de touros com o uso da formamida e da lactamida. Resultados promissores também foram obtidos por Lukaszewicz (2002) quando determinou taxas iguais de fertilização e de eclosão de ovos de gansas que tinham sido inseminadas com sêmen fresco, comparadas com outras inseminadas com sêmen congelado adicionado com 6 % de dimetilformamida após o resfriamento a 4°C.

Em eqüinos os resultados usando amidas como crioprotetores em sêmen também têm sido promissores. Keith (1998) comparou vários tipos de amidas (formamida, metilformamida, dimetilformamida, acetamida e metilacetamida) com o glicerol para a congelação de sêmen de garanhões, encontrando superioridade da metilformamida a 0,9 M em relação ao glicerol a 0,55 M para motilidade total e para a motilidade no tempo zero ($p < 0,05$). No tempo 20 minutos pós-descongelamento a metilformamida a 0,6 M também foi superior ao glicerol a 0,55 M para a motilidade total, motilidade progressiva e preservação da viabilidade celular determinada pelas sondas PI e SYBR –14 ($p < 0,05$).

Alvarenga et al. (2000), determinaram a motilidade total e progressiva de espermatozóides de eqüino pós-descongelação utilizando como crioprotetores glicerol, etilenoglicol, DMSO e dimetilformamida e concluíram que o DMSO é menos eficiente no protocolo proposto. No entanto Graham (2000), comparando os crioprotetores acetamida, metilacetamida, formamida, metilformamida e dimetilformamida na concentração a 0,55 M, observou que os resultados de motilidade pós-descongelação foram inferiores aos do glicerol ($p > 0,05$). Em um segundo experimento, estes autores testaram metilformamida e dimetilformamida em concentrações maiores (0,6 e 0,9 M) comparando com etilenoglicol e glicerol e obtiveram melhor resultado com a dimetilformamida a 0,9 M ($P < 0,05$) para motilidade, do que por outros tratamentos.

2.4 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL E MITOCONDRIAL DOS ESPERMATOZÓIDES

A motilidade espermática avaliada por microscopia óptica tem sido considerada como um dos critérios mais importantes na avaliação da fertilidade do sêmen. Kjaestad et al. (1993) relacionaram características seminais pós-descongelação como motilidade, vigor e

integridade de acrossomo avaliadas por microscopia óptica (contraste de fase) com taxas de não retorno ao cio, comprovando que a motilidade e o vigor proporcionam um dado confiável de predição da fertilidade de touros.

O desenvolvimento da tecnologia usando sondas de fluorescência para DNA, enzimas intracitoplasmáticas, lecitinas ou mesmo de potencial de membrana tem provido novas ferramentas para avaliar a funcionalidade do espermatozóide pós-descongelção (RODRIGUEZ-MARTINEZ; LARSSON; PERTOFT, 1997). Estas técnicas de coloração têm fornecido novos meios de se avaliar a capacidade funcional de espermatozóides em várias espécies (GARNER; JOHNSON, 1995). Dessa forma, a funcionalidade de organelas dos espermatozóides ou seus compartimentos têm sido monitorados por procedimentos específicos de coloração.

Os corantes fluorescentes proporcionam avaliações mais objetivas das células espermáticas em relação aos métodos clássicos de coloração com microscopia óptica (GRAHAM et al., 1990). As células espermáticas coradas com fluorescência podem ser avaliadas tanto quanto aos aspectos morfológicos como quanto aos funcionais, sem a interferência do meio extracelular (ERICSSON et al., 1989).

A integridade da membrana espermática exerce um papel fundamental na sobrevivência do espermatozóide no trato genital da fêmea e na manutenção de sua capacidade fertilizante (PARKS; GRAHAN, 1992). A integridade da membrana espermática pode ser determinada com uso do iodeto de propídio (PI), um corante fluorescente de alta intensidade ao qual a membrana plasmática íntegra é impermeável e se acopla somente ao DNA de espermatozóides cuja membrana está danificada, corando o núcleo de vermelho (GARNER et al., 1999). A combinação de vários corantes possibilita a avaliação de diversos parâmetros celulares simultaneamente (ERICSSON et al., 1993; GRAHAM et al., 1990; MAXWELL et al., 1997; TAO et al., 1993).

Varcárcel et al (1997) avaliaram o efeito da congelação sobre a viabilidade espermática e integridade do acrossomo de carneiro, comparando a eficiência de três lecitinas fluorescinadas (*Araquis hypogea*-PNA, *Pisum sativum*-PSA e *Triticum vulgaris*-WGA) associadas ao corante Hoechst 33258 (H258). A avaliação de cada protocolo foi realizada por epifluorescência e os resultados comparados com os obtidos por microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC). Não foi encontrada diferença significativa entre os procedimentos de coloração avaliados, indicando que os mesmos são eficientes na monitoração da integridade do acrossomo, após o processo de criopreservação em espermatozóides de carneiro.

Sukardi et al. (1997) utilizaram em sêmen de ovinos pela primeira vez a combinação de Isotiocianato de Fluoresceína conjugado a aglutinina de *Pisum sativum* (FITC-PSA) e o PI para testar sua eficiência na avaliação da integridade do acrossomo e viabilidade de espermatozóides tratados com cálcio ionóforo A23187 para indução da reação do acrossomo. Segundo os autores, ao microscópio de fluorescência, essa combinação de duas sondas fluorescentes possibilitou a fácil visualização da integridade do acrossomo e da viabilidade espermática. Os resultados mostraram quatro categorias de células: 1) PSA positivo e PI negativo (acrossomo intacto em célula viva); 2) PSA positivo e PI positivo (acrossomo intacto em célula morta); 3) PSA negativo e PI negativo (acrossomo que reagiu em célula viva); 4) PSA negativo e PI positivo (acrossomo danificado em célula morta). Os autores relataram que a combinação FITC-PSA/PI mostrou resultados bastante satisfatórios e de acordo com os padrões anteriormente reportados em espermatozóides de humanos. Concluíram também que essa combinação é adequada para avaliar simultaneamente integridade acrossomal e viabilidade espermática porque ambos os fluoróforos são excitados a um mesmo comprimento de onda (488 nm), tornando o exame simples em um microscópio de fluorescência.

Com estudo delineado para verificar se os corantes específicos para ácidos nucleicos, tais como PI, H258 e eosina, identificam equivalentemente células não viáveis. Pintado et al. (2000) analisaram amostras de espermatozóides de suínos estocados por um período superior a 72 horas e sêmen congelado de bovinos armazenado em palhetas e descongelado antes da coloração. Os espermatozóides foram corados com PI e H258 juntos, separados ou com eosina-nigrosina associado ao giemsa. A proporção de células não viáveis identificadas pelo PI sozinho foi equivalente àquela observada quando o PI foi usado em conjunto com as outras sondas fluorescentes. Também foi observado que a proporção de células PI positivas foi significativamente mais alta do que as coradas com H258 e eosina. Os resultados indicaram que a proporção de células não viáveis detectadas pelos diferentes métodos de coloração pode variar de acordo com o corante utilizado, sendo que o PI apresentou maior número de células coradas quando comparado aos outros corantes.

O corante Mito Tracker green FM (MITO) parece acumular-se preferencialmente na mitocôndria independente do potencial de membrana mitocondrial, tornando-o um instrumento para a determinação da massa mitocondrial (HAUGLAND, 2001). Contraditoriamente, em células espermáticas criopreservadas de bovinos observou-se que as porcentagens de espermatozóides com mitocôndrias coradas pelo MITO foram altamente correlacionadas com a porcentagem de motilidade espermática ($r=0,96$; $p<0,01$) e viabilidade espermática detectada pelo uso do SYBR-14 ($r=0,97$; $p<0,01$), indicando que esta sonda reflete o “status” funcional da mitocôndria (GARNER et al., 1997).

Garner et al. (1997) compararam MITO com mais duas sondas fluorescentes, específicas para mitocôndrias, em sêmen criopreservado de bovinos, rodamina 123 (R123) e iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1), correlacionando-as com motilidade e viabilidade espermáticas. Os espermatozóides corados com JC-1 tiveram as mais altas proporções de mitocôndrias coradas (59,0%; $p<0,01$),

seguidas daquelas coradas por MITO (50,4%) e R123 (45,8%). A porcentagem média da motilidade espermática estimada visualmente por microscopia óptica foi mais alta que a porcentagem média das mitocôndrias coradas fluorescentemente com R123, JC-1 ou MITO. No entanto, as três sondas fluorescentes identificaram populações espermáticas que foram significativamente correlacionadas com a motilidade espermática ($r=0,96$; $p<0,01$) e com a viabilidade espermática determinada por SYBR-14 ($r=0,97$; $p<0,01$).

Com o objetivo de desenvolver uma técnica rápida e precisa para a avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial das células espermática de bovino, recentemente, Arruda e Celeghini (2003) validaram uma técnica na qual foram associadas as sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e MITO, para identificar simultaneamente integridade de membrana plasmática, acrossomal e função mitocondrial, respectivamente. O sêmen foi submetido a *flash frozen*, sendo preparados três tratamentos com proporções crescentes de sêmen fresco e sêmen submetido a *flash frozen* (0, 50 e 100%). Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão e apresentaram para integridade de membrana plasmática a equação $Y=0,40+0,79X$ e $R^2=0,95$; para integridade de acrossomo $Y=8,51+0,81X$ e $R^2=0,95$ e para potencial de membrana mitocondrial $Y=35,0+0,55X$ e $R^2=0,84$. Baseados nas equações e no alto coeficiente de determinação os autores concluíram que esta técnica é eficiente para a avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossômica e mitocondrial em espermatozóides bovinos.

Para comprovar as hipóteses que os crioprotetores dimetilformamida e etilenoglicol são semelhantes ou superiores ao glicerol na criopreservação de sêmen de touros, e que a técnica automatizada permite uma melhor sobrevivência e integridade dos espermatozóides bovinos comparada à técnica convencional, foi elaborado um experimento em que são testadas as técnicas de congelação com o uso dos três crioprotetores (dimetilformamida,

etilenoglico e glicerol), avaliando-se parâmetros de pós-descongelção como a motilidade, o vigor e integridade de membranas (avaliadas com uso de sondas fluorescentes) de células espermáticas bovinas criopreservadas.

3 Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL E PERÍODO

Este experimento foi realizado no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e no Laboratório de Morfologia Molecular e Desenvolvimento do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (USP), localizados no Campus de Pirassununga (SP), durante o período de agosto de 2002 a junho de 2003.

3.2 ANIMAIS E MANEJO

Foram utilizados cinco touros puros da raça Simental, com idades entre 24 e 36 meses, mantidos em pastagem de capim-Braquiária (*Brachiaria decumbens*, Stapf). Os animais foram mantidos com água e sal mineral *ad libitum* e receberam suplementação concentrada diária, segundo exigências estabelecidas pelo NRC (2001). Os animais foram pesados quinzenalmente e foram realizados os controles de ecto e endoparasitas, regularmente.

3.3 COLETA DO SÊMEN:

Antes do início do experimento os animais foram adaptados à coleta do sêmen e submetidos a um nivelamento biológico por um período de quatro meses. Após este período foram realizadas seis coletas de sêmen de cada animal, sendo uma coleta a cada semana para cada um dos animais, por meio de estimulação elétrica (eletroejaculador). Antes da coleta foi realizada higienização externa do prepúcio com água e sabão neutro e interna com solução fisiológica, para evitar possíveis contaminações do sêmen.

3.4 ANÁLISE DO SÊMEN FRESCO

Imediatamente após a coleta o sêmen foi levado ao laboratório e mantido em banho-maria a 37°C, o volume foi determinado no próprio tubo de coleta (graduado). As avaliações da motilidade, do vigor e da concentração espermática foram realizadas com o auxílio de um microscópio de contraste de fase (ZEISS®, mod. ICS-standard 25). A motilidade e o vigor foram determinados pela deposição de uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula, sendo a motilidade determinada pela porcentagem de espermatozóides com movimento e o vigor avaliado com base na qualidade do movimento retilíneo-progressivo e sua velocidade em uma escala de 1 a 5. Finalmente, a concentração espermática foi determinada pela contagem das células em câmara de Neubauer, após diluição (1:100) de uma amostra de sêmen em formol salino.

3.5 DILUIÇÃO DO SÊMEN EM DILUIDOR CONTENDO GLICEROL, ETILENOGLICOL E DIMETILFORMAMIDA COMO CRIOPROTETORES

Uma vez avaliada a concentração da amostra seminal, três alíquotas de sêmen foram distribuídas em tubos contendo diluidor à base de Tris (Anexo 1), preparado com três crioprotetores diferentes: Glicerol (1-Tris-G), Etilenoglicol (2-Tris- EG) e Dimetilformamida (3-Tris-DMF) (Anexo 1). Foram envasadas 20 palhetas francesas, de 0,5 mL, de cada diluidor com seu respectivo crioprotetor, contendo 50×10^6 espermatozóides/palheta, totalizando 60 palhetas por ejaculado (Ver esquema experimental na figura 5).

As palhetas foram devidamente identificadas quanto ao tratamento, animal e partida e foram vedadas com álcool polivinílico, sendo submetidas, em seguida, às técnicas de criopreservação convencional (TC) e automatizada (TA).

3.6 CONGELAÇÃO DO SÊMEN PELAS TÉCNICAS DE CONGELAÇÃO CONVENCIONAL E AUTOMATIZADA

Após o envase, dez palhetas de cada crioprotetor foram submetidas a duas técnicas de criopreservação, como segue:

- **Técnica Convencional** (TC, n = 30) = diluidores à base de Tris-G (n = 10), Tris-EG (n = 10) e Tris-DMF (n = 10).
- **Técnica Automatizada** (TA, n = 30) = diluidores à base de Tris-G (n = 10), Tris-EG (n = 10) e Tris-DMF (n = 10).

Ver esquema experimental na Figura 6.

3.6.1 Técnica de congelamento convencional

A técnica de congelamento convencional (TC) consistiu no uso de uma caixa de isopor de 15 L, com dimensões internas de 30 cm (altura) x 19 cm (largura) x 39 cm (comprimento),

contendo 8 cm de gelo picado com um volume de 6 L, distribuído de forma homogênea, sobre o qual era colocada uma plataforma de 5 cm de altura contendo as 30 palhetas distribuídas uniformemente (Figura 1).

Figura 1: Caixa de isopor com gelo picado e o suporte com as palhetas de sêmen para o resfriamento.

As palhetas permaneceram na caixa com gelo por 90 minutos, sendo resfriadas até atingir aproximadamente 5 a 7°C (taxa de resfriamento nos primeiros 30 minutos de $-0,55$ °C/min), quando o suporte com as palhetas foram transferidos para uma outra caixa de isopor com as mesmas dimensões da caixa de resfriamento, contendo 2 cm de nitrogênio líquido, de forma que as palhetas foram mantidas no vapor (-153°C) por 15 minutos, na posição horizontal, a 3 cm do nível do nitrogênio líquido (taxa de congelação de $-19,1$ °C/min). Logo após, as mesmas foram imersas no nitrogênio líquido (-196°C) e posteriormente armazenadas em botijões criogênicos (BALL, 1998; GRAHAM, 1996).

As temperaturas da curva de resfriamento foram determinadas com o uso de termômetro digital (IOP therm 41) para faixa de temperatura de -40 a 700°C , cujo sensor de temperatura foi adaptado de fora para dentro em uma perfuração previamente realizada na

parede da caixa de isopor à mesma altura do suporte de palhetas. Para determinar as temperaturas da curva de congelação foi utilizada a mesma metodologia, sendo que as mensurações da temperatura foram realizadas com um termômetro digital (GultermM200[®]) para faixa de temperaturas de -199 a 199 °C.

3.6.2 Técnica de congelação automatizada

Para a técnica de congelação automatizada (TA) foi utilizado um aparelho programável de fabricação nacional (Tetakon, TK 2000), equipado com uma unidade geradora, à qual estão acoplados um porta-palhetas de aço inox e duas caixas térmicas plásticas (Figura 2). Para o resfriamento o porta-palhetas contendo as 30 palhetas foi imerso em água dentro da primeira caixa, sendo que a temperatura máxima da água não poderia superar 20°C, onde permaneceu até atingir a temperatura de 5°C controlada pelo aparelho, após esse período o porta-palhetas foi transferido para a segunda caixa térmica contendo nitrogênio líquido, permanecendo até atingir a temperatura de -120°C. Posteriormente, as palhetas foram removidas e imediatamente imersas no nitrogênio líquido (-196° C).

O aparelho foi programado pelo fabricante para seguir uma curva de resfriamento de 0,25°C/minuto até 5°C, com duração em torno de 1 hora e 15 minutos e uma curva de congelação de -15°C/minuto de 5°C até -80°C, após -10°C/minuto até -120°C.

Figura 2: Aparelho programável automatizado para criopreservação de sêmen (Tetakon, TK-2000).

As curvas de resfriamento e congelção do sêmen realizadas pelas técnicas convencional e automatizada estão representadas nas figuras 3 e 4, respectivamente.

Figura 3: Curvas de resfriamento do sêmen ($^{\circ}\text{C}/\text{min.}$) determinadas para as técnicas automatizada (TA) e convencional (TC).

Figura 4: Curvas de congelação do sêmen (°C/min.) determinadas para as técnicas automatizada (TA) e convencional (TC).

3.7 DESCONGELAÇÃO E ANÁLISES DAS AMOSTRAS

Duas palhetas de cada tratamento (5 animais x 2 técnicas de congelamento x 3 diluidores x 6 repetições = 180) foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos, sendo o sêmen transferido das palhetas para microtubos mantidos aquecidos a 37°C, posteriormente foram feitas as avaliações da motilidade e do vigor entre lâmina e lamínula de forma semelhante à descrita com sêmen a fresco (ver esquema experimental na Figura 5).

Para a análise da integridade das membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial foram associadas as sondas fluorescentes iodeto de propídio (PI), que atravessa a membrana plasmática lesada e se liga ao DNA, emitindo fluorescência vermelha; aglutinina de *Pisum sativum* conjugada a fluoresceína (FITC-PSA), que se liga a glicoproteínas

presentes na membrana acrossômica interna, portanto cora de amarelo esverdeado o acrossomo lesado, além da sonda MitoTracker Green FM (MITO) que tem especificidade para a membrana mitocondrial ativa, detectando função mitocondrial íntegra (ARRUDA; CELEGHINI, 2003) (ver esquema experimental na Figura 5).

Para a técnica de coloração, o sêmen foi diluído em meio TALP a uma concentração de 25×10^6 espermatozóides/mL. Após a diluição, 150 μL de sêmen descongelado diluído foi colocado em um microtubo ao qual foram adicionados 2 μL de PI (3 mM), 2 μL de MITO (500 μM) e 50 μL de FITC-PSA (100 $\mu\text{g/mL}$). As amostras foram incubadas a $38,5^\circ\text{C}$ por 8 minutos, no escuro. Após a incubação foram realizadas preparações úmidas e a leitura foi realizada imediatamente sob microscopia de epifluorescência (microscópio Zeiss, Axioplan-2, Germany) em filtro com excitação de 460-570 nm e emissão de 460-610 nm (filtro 25). Foram contadas 200 células e classificadas de acordo com a fluorescência emitida por cada sonda utilizada (PI, FITC-PSA e MITO) que resultaram em oito categorias de células:

- a) Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com potencial mitocondrial (IIC),
- b) Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e sem potencial mitocondrial (IIS),
- c) Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e com potencial mitocondrial (ILC),
- d) Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e sem potencial mitocondrial (ILS),
- e) Membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e com potencial mitocondrial (LIC),
- f) Membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e sem potencial mitocondrial (LIS),
- g) Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e com potencial mitocondrial (LLC) e
- h) Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e sem potencial mitocondrial (LLS).

Figura 5. Esquema experimental.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das médias e seus respectivos erros padrão foram apresentados em tabelas. Foram analisados os efeitos das técnicas congelação e dos diferentes crioprotetores sobre a motilidade, vigor, integridade de membranas plasmática, acrossomal e função mitocondrial mediante análises de variância (ANOVA). Nas análises de variância foram incluídos os efeitos de técnicas, crioprotetores e suas respectivas interações (tabela 1). Os dados foram analisados empregando-se o programa Stat-View[®] (SAS Institute, Inc. 1998). Quando o principal efeito foi significativo, as médias foram comparadas individualmente pelo teste de *Fisher*. Também foram determinadas possíveis correlações entre motilidade, vigor, integridade de membranas plasmática, acrossomal e função mitocondrial. A hipótese testada foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

Tabela 1: ANOVA.

Causas de variação	GL
Técnica	1
Crioprotetor	2
Técnica x Crioprotetor	2
Resíduo	174

GL: graus de liberdade

4 Resultados

4 RESULTADOS

Os resultados para motilidade espermática estão apresentados na tabela 2. Não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre as técnicas de congelação convencional (TC) e automatizada (TA) todavia, foram observadas diferenças ($p<0,05$) entre os crioprotetores utilizados. As melhores médias para motilidade foram encontradas com diluidor contendo glicerol ($30,67\pm1,41$ e $30,50\pm1,06\%$, nas técnicas TC e TA, respectivamente) seguida do diluidor contendo etilenoglicol ($21,17\pm1,66$ e $21,67\pm1,13\%$, nas técnicas TC e TA, respectivamente) e a pior motilidade foi apresentada pelo sêmen criopreservado com diluidor contendo dimetilformamida ($8,33\pm0,65$ e $9,17\pm0,72\%$, nas técnicas TC e TA, respectivamente).

Tabela 2: Valores de motilidade espermática média e erros padrão (%) do sêmen bovino criopreservado utilizando-se as técnicas de congelação convencional (TC) e automatizada (TA), em diluidores com diferentes crioprotetores: Dimetilformamida, Etilenoglicol e Glicerol.

Crioprotetor	Técnica de Congelação			
	TC	n	TA	n
Dimetilformamida	$8,33\pm0,65^{aA}$	30	$9,17\pm0,72^{aA}$	30
Etilenoglicol	$21,17\pm1,66^{bA}$	30	$21,67\pm1,13^{bA}$	30
Glicerol	$30,67\pm1,41^{cA}$	30	$30,50\pm1,06^{cA}$	30

Letras minúsculas diferentes sobre as médias dentro das colunas e letras maiúsculas diferentes dentro das linhas indicam diferenças significativas ($p<0,05$).

Os dados do vigor espermático, classificado em escores de 1 a 5, estão apresentados na tabela 3. Também não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre as técnicas de congelação para esta característica, mas foram encontradas diferenças ($p<0,05$) entre os crioprotetores. Foi verificado maior vigor ($p<0,05$) para os espermatozóides criopreservados com diluidor contendo glicerol ($2,52\pm0,06$ e $2,45\pm0,06$ nas técnicas TC e TA, respectivamente) do que aqueles criopreservados com diluidor contendo etilenoglicol ($1,70\pm0,08$ e $1,78\pm0,08$ nas técnicas TC e TA, respectivamente) ou dimetilformamida ($1,68\pm0,09$ e $1,77\pm0,08$; nas técnicas TC e TA, respectivamente), sendo que etilenoglicol e dimetilformamida não diferiram ($p>0,05$) entre si.

Tabela 3: Valores médios de vigor espermático e erros padrão (1-5) do sêmen bovino criopreservado utilizando-se as técnicas de congelação convencional (TC) e automatizada (TA), em diluidores com diferentes crioprotetores: Dimetilformamida, Etilenoglicol e Glicerol.

Crioprotetor	Técnica de Congelação			
	TC	n	TA	n
Dimetilformamida	$1,68\pm0,09^{aA}$	30	$1,77\pm0,08^{aA}$	30
Etilenoglicol	$1,70\pm0,08^{aA}$	30	$1,78\pm0,08^{aA}$	30
Glicerol	$2,52\pm0,06^{bA}$	30	$2,45\pm0,06^{bA}$	30

Letras minúsculas diferentes sobre as médias dentro das colunas e letras maiúsculas diferentes dentro das linhas indicam diferenças significativas ($p<0,05$).

Os resultados obtidos pela técnica utilizando sondas fluorescentes, na qual são avaliadas simultaneamente as características de integridade de membrana plasmática, acrossomal e função mitocondrial, associando as sondas iodeto de propídio (PI), aglutinina de

Pisum sativum conjugada com Fluoresceína (FITC-PSA) e MitoTracker Green FM (MITO), estão apresentados na tabela 4.

Verificou-se que para a porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com potencial mitocondrial (IIC) a técnica de congelamento não diferiu ($p>0,05$), mas que o glicerol apresentou melhor proteção para células contra os efeitos da criopreservação do que etilenoglicol e dimetilformamida, pois foram encontradas maiores porcentagens de espermatozóides IIC ($p<0,05$) para sêmen congelado com glicerol ($14,82\pm1,49$ e $15,83\pm1,26\%$, nas técnicas TC e TA, respectivamente) do que para etilenoglicol ($9,20\pm1,31$ e $9,92\pm1,29\%$, nas técnicas TC e TA, respectivamente) ou dimetilformamida ($4,65\pm0,93$ e $5,17\pm0,87\%$, nas técnicas TC e TA, respectivamente).

Para a categoria de células com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e sem potencial mitocondrial (IIS) não foi observada diferença entre as técnicas ($p>0,05$), mais foram maiores as médias de células desta categoria ($p<0,05$) para o glicerol ($0,40\pm0,11$ e $0,48\pm0,11\%$, nas técnicas TC e TA, respectivamente) do que para etilenoglicol ($0,12\pm0,06$ e $0,27\pm0,07\%$, nas técnicas TC e TA, respectivamente) ou para dimetilformamida ($0,18\pm0,05$ e $0,25\pm0,09\%$, nas técnicas TC e TA, respectivamente), entre estes últimos crioprotetores não houve diferença ($p>0,05$).

Para as células com membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e com potencial de membrana mitocondrial (LIC) também não foram observadas diferenças significativas entre as técnicas de congelamento ($p>0,05$), mas observou-se uma maior porcentagem de células LIC ($p<0,05$) para sêmen criopreservado com diluidor contendo glicerol como crioprotetor ($1,98\pm0,36$ e $1,80\pm0,29\%$, nas técnicas TC e TA, respectivamente) do que para aquele contendo dimetilformamida ($0,68\pm0,19$ e $0,55\pm0,27\%$, nas técnicas TC e TA, respectivamente) ou para o diluidor contendo etilenoglicol ($1,38\pm0,36$ e $0,73\pm0,14\%$, nas

técnicas TC e TA, respectivamente), entre estes últimos crioprotetores não houve diferença ($p>0,05$).

Quando foram comparadas as porcentagens médias para espermatozóides com membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e sem potencial mitocondrial (LIS), observou-se diferença entre os crioprotetores ($p<0,05$) sendo o glicerol o que apresentou o maior número de células com esta característica ($34,90\pm 2,22$ e $31,05\pm 2,12\%$ nas técnicas TC e TA, respectivamente) em relação aos crioprotetores etilenoglicol ($21,82\pm 1,39$ e $18,23\pm 2,04\%$ nas técnicas TC e TA, respectivamente) e dimetilformamida ($23,72\pm 1,37$ e $20,4\pm 2,06\%$ nas técnicas TC e TA, respectivamente), entre estes últimos crioprotetores não houve diferença ($p>0,05$).

Entretanto, quando se avaliou a porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e sem potencial mitocondrial (LLS) foi observado que as técnicas de congelamento não diferiram estatisticamente ($p>0,05$) nesta característica, porém, verificou-se que o glicerol apresentou uma menor ($p<0,05$) porcentagem de espermatozóides nesta categoria ($46,60\pm 3,11$ e $49,35\pm 2,53\%$, nas técnicas TC e TA, respectivamente) do que etilenoglicol ($66,42\pm 2,60$ e $69,95\pm 2,88\%$, nas técnicas TC e TA, respectivamente) e dimetilformamida ($69,30\pm 2,43$ e $72,3\pm 2,35\%$, nas técnicas TC e TA, respectivamente), entre estes últimos crioprotetores não houve diferença ($p>0,05$). Estes resultados podem indicar uma maior proteção do glicerol contra crioinjúrias.

Ainda na tabela 4 também estão apresentadas as médias das porcentagens dos espermatozóides com as características: membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e com potencial mitocondrial (ILC), membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e sem potencial mitocondrial (ILS) e membrana plasmática lesada, acrossomo lesado com potencial mitocondrial (LLC) onde não foi possível ver diferenças estatística entre as técnicas de congelamento ($p>0,05$), nem entre os diferentes crioprotetores ($p>0,05$).

Tabela 4: Características espermáticas (%) do sêmen bovino criopreservado utilizando-se as técnicas de congelação convencional (TC) e automatizada (TA) com diferentes crioprotetores: Dimetilformamida (DMF), Etilenoglicol (EG) e Glicerol (G).

Características Espermáticas	Crioprotetor					
	DMF		EG		G	
	TC	TA	TC	TA	TC	TA
IIC	4,65±0,93 ^a	5,17±0,87 ^a	9,20±1,31 ^b	9,92±1,29 ^b	14,82±1,49 ^c	15,83±1,26 ^c
IIS	0,18±0,05 ^a	0,25±0,09 ^a	0,12±0,06 ^a	0,27±0,07 ^a	0,40±0,11 ^b	0,48±0,11 ^b
LIC	0,68±0,19 ^a	0,55±0,27 ^a	1,38±0,36 ^a	0,73±0,14 ^a	1,98±0,36 ^b	1,80±0,29 ^b
LIS	23,72±1,37 ^a	20,40±2,06 ^a	21,82±1,39 ^a	18,23±2,04 ^a	34,90±2,22 ^b	31,05±2,12 ^b
LLS	69,30±2,43 ^b	72,3±2,35 ^b	66,42±2,60 ^b	69,95±2,88 ^b	46,60±3,11 ^a	49,35±2,53 ^a
ILC	0,40±0,18 ^a	0,03±0,02 ^a	0,28±0,14 ^a	0,12±0,08 ^a	0,33±0,12 ^a	0,35±0,16 ^a
ILS	0,10±0,06 ^a	0,12±0,10 ^a	0,10±0,04 ^a	0,08±0,04 ^a	0,03±0,02 ^a	0,02±0,02 ^a
LLC	0,97±0,56 ^a	1,18±0,79 ^a	0,68±0,20 ^a	0,70±0,25 ^a	0,93±0,27 ^a	1,12±0,35 ^a

Letras diferentes sobre as médias na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)

IIC – membrana plasmática intacta, com acrossomo intacto e com potencial de membrana mitocondrial

IIS – membrana plasmática intacta, com acrossomo intacto e sem potencial de membrana mitocondrial

LIC - membrana plasmática lesada, com acrossomo intacto e com potencial de membrana mitocondrial

LIS - membrana plasmática lesada, com acrossomo intacto e sem potencial de membrana mitocondrial

LLS - membrana plasmática lesada, com acrossomo lesado e sem potencial de membrana mitocondrial

ILC – membrana plasmática intacta, com acrossomo lesado e com potencial de membrana mitocondrial

ILS – membrana plasmática intacta, com acrossomo lesado e sem potencial de membrana mitocondrial

LLC - membrana plasmática lesada, com acrossomo lesado e com potencial de membrana mitocondrial

A porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática intacta, verificada pela exclusão do PI do núcleo espermático está apresentada na tabela 5. Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as técnicas de congelação mas foram encontradas porcentagens mais altas de espermatozóides com membrana plasmática intacta para sêmen criopreservado com diluidor contendo glicerol (15,58±1,51 e 16,68±1,31%, nas técnicas TC e TA, respectivamente) do que para o diluidor contendo etilenoglicol (9,70±1,36 e 10,38±1,30%, nas técnicas TC e TA, respectivamente) e dimetilformamida (5,33±1,09 e 5,57±0,88%, nas técnicas TC e TA, respectivamente), tendo o sêmen criopreservado com

etilenoglicol, apresentado maior porcentagem de células com membrana plasmática intacta ($p>0,05$) em relação à dimetilformamida.

Tabela 5: Valores médios e erros padrão (%) de espermatozóides com membrana plasmática intacta em sêmen bovino criopreservado utilizando-se as técnicas de congelação convencional (TC) e automatizada (TA), em diluidores com diferentes crioprotetores: Dimetilformamida, Etilenoglicol e Glicerol.

Crioprotetor	Técnica de Congelação			
	TC	n	TA	n
Dimetilformamida	5,33±1,09 ^{aA}	30	5,57±0,88 ^{aA}	30
Etilenoglicol	9,70±1,36 ^{bA}	30	10,38±1,30 ^{bA}	30
Glicerol	15,58±1,51 ^{cA}	30	16,68±1,31 ^{cA}	30

Letras minúsculas diferentes sobre as médias dentro das colunas e letras maiúsculas diferentes dentro das linhas indicam diferenças significativas ($p<0,05$).

Na tabela 6 estão apresentadas as porcentagens de espermatozóides com lesão de acrossomo verificadas pela marcação pelo FITC-PSA. Não foram observadas diferenças significativas ($p<0,05$) entre as técnicas de congelação, mas foram encontradas porcentagens mais altas de espermatozóides com acrossomo lesado para sêmen criopreservado com diluidor contendo etilenoglicol (67,48±2,50 e 70,85±2,86%, nas técnicas TC e TA, respectivamente) e dimetilformamida (70,77±2,08 e 73,63±2,16%, nas técnicas TC e TA, respectivamente) do que para aquele contendo glicerol (47,90±2,95 e 50,83±2,42%, nas técnicas TC e TA, respectivamente).

Tabela 6: Valores médios e erros padrão (%) de espermatozóides com acrosso-
somo lesado em sêmen bovino criopreservado utilizando-se as técnicas de congelação convencional
(TC) e automatizada (TA), em diluidores com diferentes crioprotetores:
Dimetilformamida, Etilenoglicol e Glicerol.

Crioprotetor	Técnica de Congelação			
	TC	n	TA	n
Dimetilformamida	70,77±2,08 ^{bA}	30	73,63±2,16 ^{bA}	30
Etilenoglicol	67,48±2,50 ^{bA}	30	70,85±2,86 ^{bA}	30
Glicerol	47,90±2,95 ^{aA}	30	50,83±2,42 ^{aA}	30

Letras minúsculas diferentes sobre as médias dentro das colunas e letras maiúsculas diferentes dentro das linhas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

As médias das porcentagens de espermatozóides com função mitocondrial detectadas pelo MITO estão apresentadas na tabela 7. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as técnicas de congelação, mas foram encontradas diferenças entre os crioprotetores ($p < 0,05$), sendo observado que as porcentagens de células com função mitocondrial usando o glicerol foram superiores ($18,07 \pm 1,88$ e $19,10 \pm 1,66\%$, nas técnicas TC e TA, respectivamente) às obtidas com etilenoglicol ($11,55 \pm 1,74$ e $11,47 \pm 1,41\%$, nas técnicas TC e TA, respectivamente) e dimetilformamida ($6,70 \pm 1,45$ e $6,93 \pm 1,29\%$, nas técnicas TC e TA, respectivamente), entretanto, o etilenoglicol teve maior média de porcentagem para esta característica, do que a dimetilformamida ($P > 0,05$).

Tabela 7: Valores médios e erros padrão (%) de espermatozóides com função mitocondrial em sêmen bovino criopreservado utilizando-se as técnicas de congelação convencional (TC) e automatizada (TA), em diluidores com diferentes crioprotetores: Dimetilformamida, Etilenoglicol e Glicerol.

Crioprotetor	Técnica de Congelação			
	TC	n	TA	n
Dimetilformamida	6,70±1,45 ^{aA}	30	6,93±1,29 ^{aA}	30
Etilenoglicol	11,55±1,74 ^{bA}	30	11,47±1,41 ^{bA}	30
Glicerol	18,07±1,88 ^{cA}	30	19,10±1,66 ^{cA}	30

Letras minúsculas diferentes sobre as médias dentro das colunas e letras maiúsculas diferentes dentro das linhas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Neste experimento não foram encontradas interações entre técnicas de congelação e crioprotetores ($p > 0,05$).

Na tabela 8 estão apresentados os coeficientes de correlação linear (r) observados entre as características do sêmen criopreservado de bovinos e técnicas de congelação convencional (TC) e automatizada (TA).

Os principais coeficientes de correlação linear (r) para a TC e TA ($p < 0,05$) foram: motilidade vs. membrana plasmática intacta (vivos), $r = 0,66$ e $0,66$, respectivamente; motilidade vs. função mitocondrial, $r = 0,62$ e $0,59$, respectivamente; vigor vs. função mitocondrial, $r = 0,49$ e $r = 0,47$, respectivamente; membrana plasmática intacta vs. função mitocondrial, $r = 0,96$ e $0,90$, respectivamente. Os principais coeficientes de correlação linear (r) negativos para a TC e TA ($p < 0,05$) foram: acrossomo lesado vs. função mitocondrial, $r = -0,80$ e $-0,65$, respectivamente; membrana plasmática intacta vs. acrossomo lesado, $r = -0,80$ e $-0,69$, respectivamente. De forma geral os coeficientes de correlação observados foram de média a alta intensidade.

Tabela 8: Coeficientes de correlação linear (r) observados entre as características espermáticas analisadas em sêmen bovino criopreservado e técnicas de congelação convencional (TC) e automatizada (TA).

Características	r	
	TC	TA
Motilidade x Membrana Plasmática Intacta (vivos)	0,66	0,66
Motilidade x Função Mitocondrial	0,62	0,59
Vigor x Função Mitocondrial	0,49	0,47
Membrana Plasmática Intacta (vivos) x Função Mitocondrial	0,96	0,90
Acrossomo Lesado x Função Mitocondrial	-0,80	-0,65
Membrana Plasmática Intacta (vivos) x Acrossomo Lesado	-0,80	-0,69

p<0,05

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Desde o início da criopreservação das células espermáticas bovinas por Polge (1949), muitas pesquisas têm sido realizadas para determinar taxas de resfriamento, taxas de congelação, tipos de crioprotetores, métodos de adição do crioprotetor e diluidores, sendo sempre motivadas pelo desejo de determinar a técnica mais apropriada para a preservação das células espermáticas de cada uma das espécies estudadas. Os resultados até hoje, apesar de alentadores, deixam muitas dúvidas sobre os efeitos deletérios que o processo de criopreservação causa sobre a viabilidade espermática (SALAMON; MAXWELL, 1995; WATSON, 2000).

5.1 AVALIAÇÃO DOS CRIOPROTETORES SOBRE A CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN BOVINO

Baseados em nossos resultados foi observado que as melhores médias da motilidade espermática entre os crioprotetores estudados nas técnicas convencional (TC) e automatizada (TA) foram as obtidas com uso do glicerol, 30,6 e 30,5%, respectivamente. Estes resultados foram inferiores às médias da motilidade espermática pós-descongelação encontradas por Kjaestad et al. (1993) de 67,5%, Dhami e Sanhi (1993) de 45,0% e por Wall e Foot, (1999) de 39,0%. As diferenças encontradas deste com a literatura podem, em parte, ser explicadas pelo fato de não ter sido possível fazer uma seleção dos touros para congelabilidade. Nos trabalhos referidos foram utilizados animais de qualidade seminal conhecida, oriundos de centrais de inseminação.

Quando avaliamos os resultados da integridade de membranas determinadas pela técnica de associação das sondas fluorescentes descritos por Arruda e Celeghini (2003),

podemos observar que as porcentagens das células viáveis, que seriam as responsáveis pela fertilização, ou seja, espermatozóides com o padrão IIC (membrana e acrossomos intactos e com potencial mitocondrial) foram principalmente preservados pelo glicerol (G) (14,82 e 15,83% para TC e TA, respectivamente, $p < 0,05$) do que por etilenoglicol (EG) (9,20 e 9,92% para TC e TA, respectivamente) ou dimetilformamida (DMF) (4,65 e 5,17% para TC e TA, respectivamente), esse valor é ainda muito baixo, demonstrando o quanto o processo de criopreservação lesa a célula.

Taresson et al (1977) e Nath (1972) tinham reportado que a motilidade é melhor preservada do que a integridade morfológica. Segundo esses autores, os processos de congelação e descongelação afetam 40 a 50% das células, fato superado em nosso experimento, sendo que o diluidor contendo o glicerol foi responsável pela melhor proteção das células contra as crioinjúrias, fato constatado pelo menor número de células com membrana lesada quando comparado aos outros crioprotetores, mesmo assim a porcentagem de células apresentando lesão pós-descongelação foi de 84,4 e 83,3% para TC e TA, respectivamente. Salamon e Maxwell (1995) afirmaram que no caso de sêmen de carneiros, a metade dos espermatozóides com motilidade não apresenta alterações, em nosso experimento este resultado foi semelhante. Nossas avaliações com uso de corantes fluorescentes permitiram determinar mais objetivamente as alterações não perceptíveis com microscopia óptica comum, como foi reportado por Graham et al. (1990).

Os resultados permitiram observar que, apesar do glicerol ser até hoje o ACP mais amplamente utilizado na criopreservação de sêmen, ele ainda deixa a desejar na proteção contra os efeitos deletérios da criopreservação e contra as baixas taxas de sobrevivência do espermatozóide de bovino pós descongelação. O glicerol tem efeitos tóxicos comprovados (FAHY, 1986; WATSON, 1995; AGCA; CRITSER, 2002; KATKOV et al., 1998) e em alguns casos não têm sido observados benefícios de sua adição ao diluidor para sêmen bovino

(De LEEW et al., 1993). Além disto, o glicerol pode ter efeitos adversos acelerando a reação acrossomal e afetando a fertilidade, como foi observado no sêmen de carneiros (SLAVIK, 1987).

A superioridade do glicerol na preservação da membrana plasmática (15,58 e 16,68%, para TC e TA, respectivamente), acrossomal (52,1 e 49,2 % para TC e TA, respectivamente) e mitocondrial (18,1 e 19,1% para TC e TA, respectivamente) comparada ao etilenoglicol (9,7 e 10,4% ; 32,5 e 29,2%; 11,6 e 11,5%, para membrana plasmática, acrossomal e mitocondrial em TC e TA, respectivamente) e DMF (5,33 e 5,57; 29,2 e 26,4%; 6,7 e 6,9%, para membrana plasmática, acrossomal e mitocondrial em TC e TA, respectivamente), permite evidenciar o fato de que a proteção dada pelo glicerol é ainda longe da ideal, pois ocorrem graves lesões principalmente nas membranas plasmática e mitocondrial.

Estes efeitos negativos que a criopreservação causa e que o glicerol somente controla, são explicados de maneira geral pelas mudanças de fase dos lipídios e proteínas de membrana observadas durante a criopreservação, que são produzidas durante o choque térmico e a congelação, processos que desestabilizam as membranas (HAMMERSTED et al., 1990; ROBERTSON; WATSON, 1986).

Mudanças de volume da célula durante a adição do diluidor com o crioprotetor, associadas ao encolhimento e expansão em resposta à hiperosmolaridade do crioprotetor, assim como a desidratação induzida pela congelação (PARKS; GRAHAM, 1992; WATSON, 1995) são processos que desestabilizam as membranas ou o citoesqueleto e levam a lesões, as quais o glicerol, apesar de suas qualidades químicas de estabilização de fosfolipídios, descritos na literatura (PARKS; GRAHAM, 1992; KUNDU et al., 2000) não consegue controlar.

É importante ressaltar que qualquer crioprotetor causa efeitos físicos (osmóticos) e farmacológicos sobre as células (KAROW, 2001). Muitos crioprotetores úteis para alguns tipos de células têm sido testados, todavia, poucos têm tido utilidade notadamente comprovada na criopreservação do espermatozóide (WATSON, 1995).

As diferenças encontradas na constituição das próprias membranas do espermatozóide são claras, sendo que a conservação da integridade foi diferente em cada um dos compartimentos e principalmente da membrana acrossomal para os três crioprotetores. O aumento significativo do grupo de células com padrão LIS (membrana plasmática, acrossomo intacto, sem potencial de membrana) no tratamento com glicerol (34,9 e 31,1% para TC e TA, respectivamente) comparado ao etilenoglicol (21,8 e 18,2% para TC e TA, respectivamente) e DMF (23,7 e 20,4% para TC e TA, respectivamente) demonstram este fato. A melhor preservação da integridade acrossomal que o glicerol obteve, comparado aos outros crioprotetores, proporcionou a distribuição desses acrossomos intactos em grupos de células com membranas mais sensíveis a criopreservação e a lesão, como as membranas plasmática e mitocondrial. Diferenças regionais entre as membranas dos compartimentos celulares já foram constatadas (HOLT; NORTH, 1985; PARKS; GRAHAM, 1992; WATSON, 1995), inclusive regionalização da taxa de passagem da água na célula (DEVIREDDY et al., 1999; GILMORE et al., 2000), fatores que explicam nossas observações. Autores têm encontrado diferenças nas porcentagens de células espermáticas com integridade de membrana acrossomal e integridade de membrana plasmática em carneiros (HARRISON; VICKERS, 1990; VARCÁRCEL et al., 1997), suínos (HARRISON; VICKERS, 1990) e bovinos, quando se compara a integridade acrossomal e a motilidade (Kjaestad et al., 1993).

A membrana mitocondrial é sensível a criopreservação, mudanças estruturais e histoquímicas em espermatozóides de carneiros submetidos a congelamento (QUINN et al., 1969) e em espermatozóides humanos após a descongelamento (WOOLLEY; RICHARDSON,

1978) mostram a sensibilidade deste compartimento ao processo de criopresevação. Alterações da osmolaridade têm sido relacionadas a perdas da motilidade de espermatozóides de cachacos, comprovada com a diminuição da quantidade de ATP (FRASER et al., 2001), sendo isto também verdadeiro no sêmen humano, principalmente, quando os espermatozóides foram submetidos a meios hiposmóticos (GAO et al., 1995). As porcentagens da função mitocondrial e da viabilidade são mais próximas e parecem estar mais relacionadas, considerando nossos resultados. No entanto, a função mitocondrial e a viabilidade não foram numericamente tão próximas às porcentagens de motilidade observadas. Garner et al. (1997) determinaram que porcentagens médias de espermatozóides bovinos apresentando motilidade (avaliados visualmente no microscópio óptico) foram superiores as porcentagens de mitocôndrias coradas com R123, JC-1 e MITO. Em parte, estas diferenças podem estar explicadas pela subjetividade da avaliação da motilidade.

As médias obtidas para motilidade, vigor e características que determinam a integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial avaliadas neste experimento para o crioprotetor etilenoglicol, mostraram-se opostas ao esperado e os resultados obtidos por Mercante et al. (1995), Neves Neto et al. (1995), Arruda (2000) e Alvarenga (2000) para a espécie eqüina, onde foram detectadas similaridades na capacidade de crioproteção espermática com o glicerol para parâmetros de motilidade e de fertilidade (NEVES NETO et al., 1995). Também diferem dos resultados obtidos por Gilmore (1997), que encontrou que espermatozóides humanos congelados com etilenoglicol têm boas taxas de motilidade espermática pós-descongelção, esta qualidade está em parte explicada pela habilidade do etilenoglicol de perder pouco sua capacidade de penetrar às membranas celulares a baixas temperaturas. Partindo do princípio que todo ACP diminui a sua capacidade de penetrar no interior celular quando submetido a temperaturas abaixo de zero (GILMORE et al., 2000). No caso do nosso experimento, esta aparente vantagem do etilenoglicol, não parece

ser essencial no seu desempenho como crioprotetor, já que para as células bovinas, o glicerol, apesar de possuir molécula de maior tamanho e aparentemente, menor capacidade de penetrar na membrana em baixas temperaturas, apresentou melhores resultados para crioproteção das células espermáticas.

Os resultados de nosso experimento também não condizem com as observações de Guthrie et al (2002), que observaram menor perda da motilidade espermática de sêmen bovino após a adição e retirada por centrifugação do etilenoglicol, sendo o EG o crioprotetor que menos afetou a motilidade com uma queda de 6% comparado ao glicerol (30%) e DMSO (90%). É importante salientar que no experimento de Guthrie et al (2000) as células não foram submetidas ao resfriamento, nem à congelação como foi realizado em nosso experimento.

Da mesma maneira, os resultados obtidos para os parâmetros avaliados do sêmen congelado com o diluidor contendo DMF como crioprotetor, dentro das condições do experimento, foram ainda inferiores aos do etilenoglicol nos parâmetros de motilidade e integridade de membranas plasmática e mitocondrial. Não sendo possível constatar os resultados descritos na literatura para sêmen de outras espécies, como em gansos (ALVARENGA, 2000; GRAHAM, 2000; KEITH, 1998; MEDEIROS, 2003), gansos (LUKASZEWICZ, 2002), coelhos (HAMADA; NAGASE, 1980) e bovinos, com o uso de amidas como lactamida e formamida (NAGASE, 1972).

O potencial de vitrificação deste crioprotetor comparado ao glicerol e etilenoglicol descrito por Baudot e Boutron (1998), juntamente com a possibilidade de causar menos estresse osmótico (BALL; VO, 2001) tinham sido observados para este ACP. O DMF apresentou-se bastante tóxico para as células espermáticas mesmo em concentrações inferiores (3%) as do Glicerol (7%) e etilenoglicol (7%), isto foi constatado visualmente quando, após a diluição do sêmen fresco com diluidor contendo DMF, ocorria uma

diminuição imediata do padrão do vigor, o que pode ser um indicativo de sua toxicidade para o espermatozóide bovino, fato também observado, mas em menor proporção, com o diluidor contendo EG.

As diferenças encontradas entre nossos resultados e os da literatura citada podem ser explicadas pelas diferenças na sensibilidade das células espermáticas entre espécies em relação às variações osmóticas, principalmente no que se refere a uma maior capacidade da membrana plasmática para adaptação ao influxo e efluxo da água durante o processo de contato com o crioprotetor e mesmo do processo de criopreservação (AGCA; CRISTER, 2002). Condições tóxicas do crioprotetor podem estar envolvidas por vias menos conhecidas, como foi observado quando o etilenoglicol causou despolimerização de filamentos de actina em embriões bovinos (SAUNDERS; PARKS, 1999), além do fato de haver diferenças de permeabilidade ao crioprotetor relacionadas ao tipo de celular (KAROW, 2001).

A capacidade de se adaptar às mudanças osmóticas que ocorrem durante o processo de criopreservação pode estar fundamentada, em parte, pelas diferenças na composição da fase termotrófica dos lipídios de membrana celular, o que faz com que espermatozóides de algumas espécies, como de galos, sejam mais resistentes ao resfriamento do que os espermatozóides de outras espécies (PARKS; LYNCH, 1992). A quantidade e tipo de fosfolipídios mudam de acordo a espécie, isto faz com que a estabilidade da membrana seja também diferente (HAMMERSTED et al., 1990). No caso dos espermatozóides humanos tem-se comprovado maior limite de tolerância à osmolaridade (OTL) quando comparado com os de outras espécies, o que lhes permite manter o volume celular dentro de uma margem de tolerância durante o processo de adição e retirada do crioprotetor (AGCA; CRISTER, 2002), todos estes fatores podem participar, em maior ou menor grau, nas diferenças encontradas entre nossos resultados e na literatura.

5.2 AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN BOVINO

Ao analisar as técnicas utilizadas neste experimento (convencional e automatizada) é importante comparar principalmente as curvas realizadas por cada uma das técnicas, para assim, determinar as possíveis diferenças entre elas. O controle eletrônico do aparelho automatizado tem a vantagem de permitir a programação de qualquer tipo de curva, neste caso o aparelho já possuía uma curva pré-estabelecida. Na técnica convencional, a curva é única e mais ou menos rígida, dependendo somente dos limites dos materiais utilizados (qualidade da caixa, quantidade de gelo e nível do nitrogênio).

Analisando os resultados e partindo dos aspectos citados anteriormente é possível avaliar ambas as técnicas a partir de dois pontos de vista:

- 1- Disposição das palhetas dentro do mecanismo de controle da congelação;
- 2- Curvas estabelecidas por cada método.

Partindo de ambos os pontos de vista as técnicas convencional e automatizada não apresentaram diferenças para os parâmetros analisados (motilidade, vigor e integridade de membranas espermáticas).

Ao considerarmos o primeiro ponto de vista, os resultados foram semelhantes aos descritos por Almquist e Wiggins (1973) e Landa e Almquist (1979) para os parâmetros de motilidade e retenção de acrossomos. A colocação das palhetas na vertical no congelador programável não afetou a qualidade da congelação do sêmen quando comparado à técnica convencional com doses na posição horizontal, contrariamente à observação feita por Vishwanath e Shannon (2000). Provavelmente em nossas técnicas o suporte que mantém as palhetas na posição horizontal na técnica convencional e o suporte vertical da técnica automatizada (responsável pelo controle eletrônico da temperatura) conseguem manter uma

boa homogeneidade na congelação das palhetas durante o processo, sem causar diferenças entre palhetas o entre locais dentro dos suportes.

A partir do segundo ponto de vista, em nossos resultados não foi possível demonstrar diferenças para os parâmetros avaliados entre as curvas das duas técnicas, ou seja, a taxa de resfriamento da técnica convencional ($-0,55^{\circ}\text{C}/\text{min}$ nos primeiros 30 minutos e com uma estabilização de uma hora a $6,5^{\circ}\text{C}$) e de congelamento ($-19,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) não foram diferentes das taxas de resfriamento e de congelação da técnica automatizada ($-0,23^{\circ}\text{C}/\text{min}$ em 75 minutos de resfriamento até 5°C sem estabilização da temperatura e $-15,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ na congelação). Estes resultados mostram que apesar das técnicas apresentarem diferenças evidentes, estas não foram suficientemente grandes para afetar os resultados, sendo que as taxas de resfriamento estiveram dentro das reportadas por Januskauskas et al. (1999), que não encontraram diferenças entre duas taxas de resfriamento de $-0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (tratamento) vs. $-4,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (controle) para os parâmetros motilidade pós-descongelação, integridade de membrana plasmática, integridade acrossomal, capacitação e fertilidade do sêmen bovino, Dhimi e Sahni (1993), que observaram que taxas de resfriamento de $-0,21^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (30°C a 5°C em duas horas) com duas horas de equilíbrio foram superiores ($p<0,01$) às taxas de $-0,04^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $-0,08^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e $-0,42^{\circ}\text{C}/\text{min}$, mensurados pelos parâmetros de motilidade pós-descongelação e taxa de prenhez e perdas de enzimas GOT.

As taxas de congelação na literatura variam de -10°C a $-100^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (AGCA; CRISTER, 2002), outros autores como Januskauskas et al. (1999), congelaram no aparelho programável, numa taxa média de $-22^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sendo que Chen et al. (1993) observaram que taxas de congelação de -15 , -25 e $-35^{\circ}\text{C}/\text{min}$ causaram sobrevivências similares e foram superiores à congelação com taxas de $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Nossas taxas médias de congelação estiveram dentro destes limites mostrados na literatura.

Os coeficientes de correlação linear observados para as técnicas estudadas comprovam os resultados obtidos, mostrando a proximidade entre as técnicas no que se refere à sua capacidade de criopreservar as células espermáticas bovinas. A técnica automatizada tem a vantagem de ser flexível e de permitir alterar o controle da curva até conseguir os melhores resultados, adaptando-se ao diluidor, crioprotetor ou qualquer outra variável para a qual o resultado pode estar condicionado.

Esta pesquisa mostrou o quanto estamos longe de conseguirmos as melhores taxas de recuperação de espermatozóides pós-descongelção, abrindo a possibilidade de novas pesquisas que estudem o mecanismo de criopreservação e de crioinjúria, de maneira a diminuir as altíssimas perdas de células espermáticas produzidas no transcurso do processo, o que traria um imediato impacto econômico pelo aumentando das taxas de prenhez no campo, e assim, diminuindo os custos da inseminação artificial.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES:

Segundo os resultados desta pesquisa e nas condições em que foi realizada podemos concluir que:

- As técnicas de criopreservação convencional e automatizada para o sêmen bovino apresentam resultados semelhantes pós-descongelação para motilidade, vigor e integridade das membranas espermáticas (plasmática, acrossomal e mitocondrial).
- O glicerol preserva melhor a motilidade, o vigor e a integridade das membranas (plasmática, acrossomal e mitocondrial) das células espermáticas bovinas após a descongelação, quando comparado aos crioprotetores dimetilformamida e etilenoglicol.
- O etilenoglicol é superior a dimetilformamida na conservação da motilidade e das membranas celulares de espermatozóides bovinos.

Referências

REFERÊNCIAS

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

ALMQUIST, J. O.; ALLEN, C. H.; BRANAS, R. J. Effect on fertility of freezing large numbers of straws of bovine spermatozoa in a mechanical freezer. **Journal of Animal Science**, v. 55, n. 2, p. 232-235, 1982.

ALMQUIST, J. O.; WIGGINS, H. B. Survival of bull spermatozoa frozen and thawed by different methods in plastic straws. **A I Digest**, v. 21, n. 7, p. 12, 1973.

ALVARENGA, M. A.; GRAHAM, J. K.; KEITH, S. L.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; SQUIRES, S. L. Alternative cryoprotectors for freezing stallion spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 14., 2000. **Proceedings...** Stockholm, 2000. p.157.

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

ARRUDA, R. P. de. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para espermatozóides eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfologia (ASMA)**. 2000. 85 f. Tese (Livre Docência em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2000.

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

ASBIA (Associação Brasileira de Inseminação artificial). Disponível em <<http://www.asbia.org.br/>>. Acesso em: 20 de outubro de 2003.

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

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

BALL, B. A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and membrane potential. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 6, p. 1061-9, 2001.

BAUDOT, A.; BOUTRON, P. Glass-forming tendency and stability of aqueous solutions of dietilformamide and dimetil formamide. **Cryobiology**, v. 37, p. 187-199, 1998.

CHAN, P. J.; CORSELLI, J. U.; JACOBSON, J. D.; PATTON, W. C.; KING, A. Correlation between intact sperm acrosome using the Spermac stain and sperm fertilizing capacity. **Archives of Andrology**, v. 36, p. 25-27, 1996.

CHEN, Y.; FOOTE, H.; TOBBACK, L. ZHANG, L HOUGH, S. Survival of bull spermatozoa seeded and frozen at different rates in egg yolk-tris and whole milk extenders. **Journal Dairy Science**, v. 76, n. 4, p. 1028-1034, 1993.

COUNTERS, J. L.; EKWALL, H.; PAQUIGNON, M. PLOEN, L. Preliminary study of water and some element contents in boar spermatozoa, before, during and after freezing. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, p. 613-26, 1989.

CRITSER, J.K.; HUSE-BRENDA, A. R.; AAKER, D. V.; ARNESON, B. W.; BALL, G.D. Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility. **Fertility and Sterility**, v. 50, n. 2, p. 314-320, 1988.

DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamida in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, v. 49, p. 831-841, 1997.

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

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

DEVIREDDY, R. V.; SWANLUND, D. J.; ROBERTS, K. P.; BISCHOF, J. C. Subzero water permeability parameters of mouse spermatozoa in the presence of extracelullar ice and cryoprotective agents. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 764-75, 1999.

DHAMI, J. A.; SAHNI, K. L. Evaluation of different cooling rates, equilibration periods and diluents for effects on deep-freezing, enzyme leakage and fertility of taurine bull spermatozoa. **Theriogenology**, v. 40, p. 1269-1280, 1993.

ERICSSON, S.A.; GARNER, D.L.; REDELMAN, D.; AHMAD, K. Assesment of the viability and fertilizing potential of cryopreserved bovine spermatozoa using dual fluorescent staining and two-flow cytometric systems. **Gametes Research**, v. 22, p. 355-368, 1989.

ERICSSON, S.A.; GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; DOWNING T.W.; MARSHALL, C.E. Interrelationship among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 39, p. 1009-1024, 1993.

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

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

FRASER, L.; GORSCZARUCK. K.; STRZEZEK, J. Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolarity. **Reproduction in Domestic Animals**, n. 36, p. 325-329, 2001.

GAO, D.Y.; LIU, J.; MCGANN, L.E.; WATSON, P.F.; KLEINHANS, F.W.; MAZUR, CRITSER, E.S.; CRITSER, J.K. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. **Human Reproduction**, v. 10, n. 5, p. 1109-1122, 1995.

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

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

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

GILMORE, J. A.; DU, J.; TAO, J.; PETER, A. T.; CRITSER, J. K. Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to criopreservation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 107, p. 87-95, 1996.

GILMORE, J. A.; LIU, J.; GAO, D. J.; CRITSER, J. K. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their additions and removal from human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 12, p. 112-18, 1997.

GILMORE, J. A.; LIU, J.; WOODS, E. J.; PETER, A. T.; CRITSER, J. K. Crioprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. **Human Reproduction**, v. 15, n. 2, p. 335-343, 2000.

GILMORE, J. A.; MCGANN, L. E.; LIU, J.; GAO, D. Y.; PETER, A. T.; KLEINHANS, F. W.; CRITSER, J. K. Effect of Cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 985-95, 1995.

GRAHAM, J. K. Current techniques for freezing equine semen. In: **TECHNIQUES FOR HANDLING AND UTILIZATION OF TRANSPORTED COOLED AND FROZEN EQUINE SPERMATOZOA**, 1995- 1996. **Proceedings...** Fort Collins- Co, 1995-1996. p.153.

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

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

GUTHRIE, H. D, LIU, J. CRITSER, J. K. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. **Biology of reproduction**, v. 67, n. 6, p. 1811-1806, 2002.

HAMADA, A.; NAGASE, H. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 60, p. 247-52, 1980.

HAMAMAH, S.; ROYERE, D.; NICOLLE, J. C.; PAQUIGNON, M.; LANSAC, J. Effects of freezing-thawing on the spermatozoa nucleus: a chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. **Reproduction Nutrition and Development**, n. 30, p. 59-64, 1990.

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

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 343-352, 1990.

HAUGLAND, R. P. **Handbook of fluorescent probes and research chemicals**. Oregon, USA: Molecular Porbes, 2001.

HOLT, W. V.; HEAD, M.; NORTH, R. D. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observation with experimental cryomicroscopy. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 1086-1094, 1992.

HOLT, W. V.; NORTH, R.D. Detrmination of lipid position and thermal phase transition temperature in an enriched plasma membrane fraction from ram spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 73, p.285-294, 1985.

JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SODERQUIST, L.; HAARD, M. G. M.; HAARD, M.C.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in sweden. **Theriogenology**, v. 52, p. 641-658, 1999.

JONES, R. T.; MARTIN, I. C. A. The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5°C on the ultrastructure of ram spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 35, p. 311-320, 1973.

KARABINUS, D. S.; EVENSON, D. P.; KAPROTH, M. T. Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved oocytes bull sperm. **Journal Dairy Science**, n. 74, p. 3836-3848, 1991.

KAROW, A. M. Cryobiology 2001 for mammalian embryologists. Augusta, Georgia, USA, 2001 (Xytex Corporation). Disponível em: <<http://www.xytex.com/Cryobiology>>. Acesso em: 10 outubro 2001.

KATKOV, I.I.; KATHOVA, N.; CRITSER, J.K.; MAZUR, P. mouse spermatozoa in hight concentrations of glycerol. Chemical toxicity vs.osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. **Cryobiology**, v. 37, p. 325-338, 1998.

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

KJAESTAD, H. E.; ROPSTAD, E.; ANDERSEN BERG, K. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 34, p. 299-303, 1993.

KUNDU, C. N.; CHAKRABORLTY, J.; DUTTA, P.; BHATTACHARYYA, D.; GHOST, A.; MAJUNDER, G. C. Development of a simple sperm cryopreservation model using a

chemical defined medium and the goat caudal epididymal spermatozoa. **Cryobiology**, v. 40, p. 117-125, 2000.

LANDA, C. A.; ALMQUIST, J. O Effect of freezing large numbers of straws of bovine spermatozoa in an automatic freezer on post-thaw motility and acrossomal retention. **Journal of Animal Science**, v. 49, n. 5, p. 1190-1194, 1979.

LUKASZEWICZ, E. An effective method for freezing White Italian Garder semen. **Theriogenology**, v. 58, p. 19-27, 2002.

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

MAZUR, P. Basic concepts in freezing cells. In: JOHNSON, L. A.; LARSSON, K. **Deep Freezing of Boar Semen**. Swedish University of Agriculture Science. Uppsala, 1985, p. 91-111.

MEDEIROS, A. S. de. **Utilização de vários tipos de amidas como agentes crioprotetores para espermatozoides de garanhões**. 2003. 78 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

MERCANTE, C. F. C.; ARRUDA, R. P. de; VISINTIN, J. A.; FAGUNDES, A. C. Congelação de sêmen equino em etilenoglicol e glicerol: motilidade, vigor e teste de termorresistência – estudos preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., Belo Horizonte, 1995. **Anais...** Belo Horizonte, 1995, p. 290.

MOUSSA, M.; MARINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hem egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 1695-706, 2002.

MULLER, K.; POMORSKI, T.; MULLER, P.; ZACHOWSKI, A.; HERRMANN, A. Protein-dependent translocation of aminophospholipids and asymmetry transbilayer distribution of phospholipids in the plasma membrane of ram sperm cells. **Biochemistry**, v. 33 p. 9968-9974, 1994.

NAGASE, H; TOMIZUCA, T.; HANADA, A.; HOSODA, T; MORIMOTO, H. Cryoprotective action of some amides on spermatozoa of domestical animals. Effects of formamide, acetamide and lactamide on the motility of bovine spermatozoa after pellet freezing. **Japanese Journal of Animal Reproduction**, v. 18, n. 1, p. 15-21, 1972.

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

NATH, J. Correlative biochemical and ultrastructural studies on the mechanism of freezing damage to ram semen. **Cryobiology**, v. 9, p. 240-246, 1972.

NAVARA, C. S.; SIMERLY, C.; ZORAM, S.; SCHATTEN, G. The sperm centrosome during fertilization in mammals: implications for fertility and reproduction. **Reproduction and Fertility of Development**, n. 7, p. 745-54, 1995.

NEVES NETO, J. R.; MERCANTE, C. F. J.; ARRUDA R. P. de; VISINTIN, J. A. Fertilidade do sêmen congelado eqüino em etilenoglicol e glicerol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., Belo Horizonte, 1995. **Anais...** Belo Horizonte, 1995, p. 292.

NICOLAISEN, H.; HVIDT, A. Phase behavior of the system trehalose-NaCl-Water. **Cryobiology**, v. 31, p. 199-205, 1994.

NOILES, E. E. ; MAZUR, P. F. ; WATSON, F. W. ; KLEINHANS ; CRITSER, J. K. Determination of water permeability coefficient for human spermatozoa and its activation energy, **Biology of Reproduction**, v.48, p.99-109, 1993.

NOILES, E. E. ; THOMPSON, K. A.; STONEY, B. T. Water permeability, L_p , of the mouse sperm plasma membrane and its activation energy are strongly dependent on of the plasma membrane with the sperm cytoskeleton. **Cryobiology**, v.35, p.79-92, 1997.

NRC, National Research Council. Nutrient requirements of dairy cattle, 7. ed. Washington DC: National Academic of Science. p. 385, 2001.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effect of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.

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

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

PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; ROLDAN, E. R. S. Permeability of boar and Bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or the eosin:

accuracy in the assessment of cell viability. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 118, p. 145-152, 2000.

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

QUINN, P. J.; WHITE, I. G.; CLELAND, K. W. Chemical and ultrastructure changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 18, p. 209-220, 1969.

ROBBINS, R. K.; SAACKE R. G.; CHANDLER, P. T. Influence freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozern in french straws. **Journal of Animal Science**, v. 42, n. 1, p. 145-154, 1976.

ROBERTSON, L; WATSON, P. F. Calcium transport in diluted or cooled ram semen. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 77, p. 177-185, 1986.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON, B.; PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean up. **Reproduction and fertility of Development**, v. 9, p.297-308, 1997.

ROYERE, D.; HAMAMAH, S.; NICOLLE, J. C.; LANSAC, J. Chromatin alterations induced by freeze-thawing influence the fertilizing ability of human sperm. **International Journal of Andrology**, v. 14, p. 328-332, 1991.

SALAMON, S; MAXWELL, W. M. C. Frozen estorage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v. 38, p. 1-36, 1995

SAUNDERS, K. M.; PARKS, J. E. Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of in vitro-matured bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 178-187, 1999.

SINGER, S. J.; NICHOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cells membranes. **Science**, v. 175, p. 720-31, 1972.

SLAVIK, T. Effect of glycerol on the penetrating ability of fresh ram spermatozoa with zona-free hamster eggs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 79, p. 99-103, 1987.

SPUNGIN, B.;MARGALIT, I.; BREITBART, H. Sperm exocytosis reconstructed in a cell free system. Evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. **Journal of Cell Science**, v. 108, p. 2525-2535, 1995.

STATVIEW. Using Statiview, SAS Institute Inc. second edition, 1998. 288p.

SUKARDI, S.; CURRY, M. R.; WATSON, P. F. Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. **Animal Reproduction Science**, v. 46, p. 89-96, 1997.

TAO, J.; CRITSER, E. S.; CRITSER, J. K. Evaluation of mouse sperm acrosomal status and viability by flow cytometry. **Molecular Reproduction Development**, v. 36, p. 183-194, 1993.

TARESSON, F.; AMIS, D.; SCHINDLER, H. Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 51, p. 461-462, 1977.

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

VERHOVEM, B.; SCHLEGEL, R. A.; WILLIAMSON, P. Rapid lose and restoration of lipid asymmetry by different pathways in resealed erythrocyte ghosts. **Biochemica and Biophysica Acta**, v. 1104, p. 15-23, 1992.

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

WALL, R.J.; FOOT, R.H. fertility of bull sperm frozen and stored in clarified egg yolk-tris-glycerol extender. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.4, p.817-21.

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

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

WATSON, P.F.; MARTIN, I.C.A. A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, n. 28, p.99-101, 1972.

WOELDERS, H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. **Veterinary Quarterly**, v. 19, n. 3, p. 135-8, 1997.

WOELDERS, H; MATTHIJS, A; ENGEL, B. Effects of trehalose and sucrose, osmolarity of the freezing medium and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. **Cryobiology**, v. 35, p. 93-105, 1997.

WOOLLEY, D.M.; RICHARDSON, D.W. Ultrastructural injury to human spermatozoa after freezing and thawing. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.53, p.389-394, 1978.

ANEXO

ANEXO

ANEXO 1 - Diluidor Tris – Fração única

Ingrediente	Quantidade
Tris	2,42 g
Ácido cítrico	1,36 g
Frutose	1,0 g
Gema de ovo	20 mL
Crioprotetor	*7,0 mL ou 3,0 mL
Penicilina G potássica	0,028 g
Água destilada q.s.p	100 mL

(*) Foi utilizado o volume de 7mL para glicerol e etilenoglicol e de 3 mL para dimetilformamida.

OBS: O diluidor foi preparado em quantidade suficiente para todas as congelações em uma única partida para cada diluidor (crioprotetor). Cada extensor teve sua fórmula baseada no tris-glicerol-gema (fração única), sendo somente modificada a quantidade do crioprotetor dimetilformamida (ver tabela). As soluções posteriormente foram aliquotadas e congeladas.