

Universidade Federal do Pará
Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
Amazônia Oriental
Universidade Federal Rural da Amazônia
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Adrienne Araújo Guimarães

**Avaliação de diferentes diluentes na criopreservação de sêmen
ovino (*Ovis aries*)**

Belém
2010

Adrienne Araújo Guimarães

**Avaliação de diferentes diluentes na criopreservação de sêmen
ovino (*Ovis aries*)**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento em Ciências Agrárias. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. William Gomes Vale

**Belém
2010**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) É
Biblioteca Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural / UFPA, Belém-PA

Guimarães, Adriane Araújo

Avaliação de diferentes diluentes na criopreservação de sêmen ovino (*Ovis aries*) /
Adriane Araújo Guimarães; orientador, William Gomes Vale - 2010.

Dissertação (mestrado) . Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências
Agrárias e Desenvolvimento Rural, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal,
Belém, 2010.

1. Ovino . Reprodução. 2. Criopreservação de órgãos, tecidos, etc..3. Sêmen. I. Título.

CDD . 22.ed. 636.30822

Adrienne Araújo Guimarães

**Avaliação de diferentes diluentes na criopreservação de sêmen
ovino (*Ovis aries*)**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.
Área de concentração: Produção Animal.

Data da aprovação. Belém - PA: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. William Gomes Vale / UFRA

Presidente e Orientador:

Prof. Dr. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro / UFRA

Membro Titular

Prof. Dr. Leônidas Olegário Carvalho / UFPA

Membro Titular

Dedico essa conquista a Deus que, por mais que tenha tido obstáculos, me permitiu ter força e coragem para nunca desistir dos meus objetivos.

Ao meu marido e grande companheiro, sempre ao meu lado com muito amor e carinho, amo você.

AGRADECIMENTOS

A toda minha família em especial minha querida mãe, pelo amor e admiração que têm pelo meu esforço.

Ao meu marido, que nos momentos de insegurança e incertezas estava sempre ao meu lado, me fazendo crer que tudo ia dar certo.

Ao professores, Aluizio e Adriana que foram pessoas fundamentais no desenvolvimento desse trabalho, com suas orientações, correções e apontamentos. Muito obrigada mesmo, por me ajudarem.

Ao Professor orientador Dr. William Gomes Vale, pelo apoio recebido durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Alysson, pelo incentivo, amizade e sua valiosa ajuda na realização prática deste trabalho.

Ao Professor Sousa, pelo apoio, incentivo e amizade recebida durante estes anos.

A CEBRAN, por proporcionar a realização deste trabalho.

Aos funcionários da CEBRAN, em especial a Lucilene, pela disposição e paciência.

À amiga Lilian, pela contribuição e apoio na realização deste trabalho.

Ao colega Ronaife, pela contribuição durante a realização prática do trabalho.

Ao Sr. Eduardo Kataoca e sua filha Raissa, por gentilmente cederem os carneiros para coleta de sêmen e disponibilizar de seus funcionários, para ajudar durante as coletas.

À Universidade Federal do Pará, pela oportunidade que nos ofereceu de participar deste Curso de Pós-graduação em Ciência Animal.

À CAPES pelo suporte financeiro.

RESUMO

Durante a criopreservação são inúmeras as alterações sofridas pelas células espermáticas, o que conduz à queda na motilidade e perda da sua viabilidade pós-descongelamento. Por este motivo, surge a necessidade de aperfeiçoar os processos de tecnologia do sêmen, principalmente quanto ao uso de diluentes. O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade de espermatozoides ovinos, submetidos ao processo de diluição e criopreservação, utilizando-se 3 diluentes (TES, TRIS e PBS) e 3 tempos de equilíbrio (4h, 8h e 12h), sendo o estudo dividido em 9 grupos: TES-4h, TES-8h, TES-12h, TRIS-4h, TRIS-8h, TRIS-12h, PBS-4h, PBS-8h e PBS-12h. Após a colheita, o sêmen foi avaliado macro e microscopicamente, e pré-diluído nas soluções TES, TRIS e PBS, no entanto sem a adição dos crioprotetores (Solução A), onde permaneceram por 1h. Posteriormente, o sêmen foi diluído com as soluções TES, TRIS e PBS, já contendo os crioprotetores, novamente avaliado, para então ser envasado, sendo submetido aos diferentes tempos de equilíbrio, e em seguida, congelado. Após a descongelamento, foi avaliado a motilidade e o vigor, e após o TTR, a motilidade, o vigor e o desprendimento do acrossoma. Na criopreservação com TRIS, a motilidade e o vigor foram estatisticamente similares ($p>0,05$) no sêmen congelado com equilíbrio de 4h (17,2% e 1,6), 8h (22,4% e 2,1) e 12h (14,8% e 1,6) ($p>0,05$). Após o TTR não foi observado diferença estatística ($p>0,05$) para a motilidade e o vigor em 4h (10,4% e 1,1) e em 12h (10,0% e 1,2) de equilíbrio, porém houve um aumento em 8h (15,6% e 1,6) ($p<0,05$). Não houve diferença estatística ($p>0,05$) no índice de desprendimento do acrossoma entre 4h (35,1) e 12h (37,6) de equilíbrio, havendo uma redução nestes índices em 8h (30,4) ($p<0,05$). Na criopreservação com TES, a motilidade do sêmen congelado com equilíbrio de 4h (24,8%) e 12h (27,6%) foram estatisticamente similares ($p>0,05$), sendo que o tempo de 8h (40,4%) diferiu estatisticamente dos demais. O vigor foi estatisticamente similar ($p>0,05$) para o sêmen descongelado com equilíbrio de 4h (2,0), 8h (2,6) e 12h (2,3), não diferindo estatisticamente ($p>0,05$). Após o TTR não foi observado diferença estatística ($p>0,05$) para a motilidade em 4h (18,8%) e em 12h (17,4%) de equilíbrio, porém houve um aumento em 8h (29,6%) ($p<0,05$). Em relação ao vigor e ao desprendimento do acrossoma não houve diferença estatística ($p>0,05$) em 4h (2,0 e 35,8), 8h (2,1 e 33,4) e 12h (1,8 e 42,2) de equilíbrio. Na criopreservação com o PBS, não foram observados motilidade e vigor após a descongelamento. Esses resultados indicam que o diluente à base de TES e o tempo de equilíbrio de 8h mostraram-se mais adequados para a diluição e congelamento de sêmen ovino.

Palavras-chave: Diluição. Criopreservação. Sêmen. Ovino.

ABSTRACT

During cryopreservation are numerous changes experienced by the sperm cells, which leads to the decrease in motility and loss of viability after thawing. For this reason, there arises the need to refine the process technology of semen, especially regarding the use of diluents. The aim of this study was to evaluate the viability of spermatozoa undergoing the process of cryopreservation and dilution, using three extenders (TES, TRIS and PBS) and three years of stability (4h, 8h and 12h), and the study was divided into nine groups: TES-4h-8h TES, TES-12h, TRIS-4h-8h TRIS, TRIS-12h-4h PBS, PBS and PBS-8h-12h. After collection, semen was evaluated macro and microscopically, and pre-diluted solutions in TES, TRIS and PBS, but without the addition of cryoprotectants (Solution A), where they remained for 1 hour. Subsequently, semen was diluted with solutions TES, TRIS and PBS, already containing the cryoprotectants, again assessed to be so packed, and subjected to different periods of equilibrium, and then frozen. After thawing, motility was assessed and vigor, and after the TTR, motility, vigor and detachment of the acrosome. On cryopreservation with TRIS, motility and vigor were statistically similar ($p > 0.05$) in semen frozen with a balance of 4h (17.2% and 1.6), 8h (22.4% and 2.1) and 12h (14.8% and 1.6) ($p > 0.05$). After the TTR was not observed statistical difference ($p > 0.05$) in motility and vigor in 4h (10.4% and 1.1) and 12h (10.0% and 1.2) of balance, but there was an increase in 8h (15.6% and 1.6) ($p < 0.05$). There was no statistical difference ($p > 0.05$) in the rate of detachment of the acrosome between 4h (35.1) and 12 (37.6) equilibrium, with a reduction in these indices at 8 am (30.4) ($p < 0.05$). On cryopreservation with ERT, the motility of frozen semen with a balance of 4h (24.8%) and 12h (27.6%) were statistically similar ($p > 0.05$), although the time of 8h (40.4%) differed significantly from the others. The force was statistically similar ($p > 0.05$) for thawed-balanced 4h (2.0), 8h (2.6) and 12h (2.3), not statistically different ($p > 0.05$) . After the TTR was not observed statistical difference ($p > 0.05$) for sperm motility in 4h (18.8%) and 12h (17.4%) of balance, but there was an increase in 8h (29.6%) ($p < 0.05$). In relation to the force and the detachment of the acrosome was no statistical difference ($p > 0.05$) 4h (2.0 and 35.8), 8h (2.1 and 33.4) and 12h (1.8 and 42 , 2) equilibrium. On cryopreservation with PBS, showed no motility and vigor after thawing. These results indicate that solvent-based TES and the equilibrium time of 8h were more suitable for dilution and freezing of ram semen.

Key-words: Dilution. Cryopreservation. Semen. Sheep.

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1 ó Motilidade e vigor do sêmen de ovino da raça Santa Inês, <i>in natura</i> , diluído e criopreservado com diluente TES em diferentes tempos de equilíbrio.	52
Tabela 2 - Motilidade, vigor e índice de desprendimento de acrossoma após o TTR do sêmen de ovino da raça santa Inês, congelado com TES, em diferentes tempos de equilíbrio).	53
Tabela 3 ó Motilidade e vigor do sêmen de ovino da raça Santa Inês, <i>in natura</i> , diluído e criopreservado com diluente TRIS em diferentes tempos de equilíbrio.	54
Tabela 4 ó Motilidade, vigor e índice de desprendimento de acrossoma após o TTR do sêmen de ovino da raça santa Inês, congelado com TRIS, em diferentes tempos de equilíbrio).	55

LISTA DE ABREVIATURAS

AB - Azul de Bromofenol
ACP - Água de coco em pó
BSA - Albumina Sérica Bovina
CASA - *Computer-Assisted Semen Analyses*
CFDA - Diacetato de Carboxifluoresceína
CG - Citrato-Gema
CU-16 - Cornell University 16
CUE - Cornell University Extender
DMSO - Dimetil-Sulfóxido
EG - Etilenoglicol
EN - Eosina-Nigrosina
FSH - Hormônio Folículo-Estimulante
GG - Glicina-Gema
GLY - Glicerol
GnRH - Hormônio Liberador de Gonadotrofina
HOST - Hypoosmotic Swelling Test
IA - Inseminação Artificial
IAA - Ácido 3-indol acético
IP - Iodeto de Propídio
LG - Leite-Gema
LH - Hormônio Luteinizante
OEP - Lauril Sulfato de Sódio
PBS - Solução Salina Fosfatada
PI - Peça Intermédia
PIV - Produção *in vitro*
PRHO - Propanodiol
PVP - Polivinilpirrolidona
TE - Transferência de Embriões
TES - N-tris(hidroximetil) metil 2-aminoetanosulfônico
TG - TRIS-Gema
TGL - TRIS-Gema-Leite
TRIS - Tris-hidroximetil-aminometano

TTR - Teste de Termo Resistência

ZP - Zona Pelúcida

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	12
2 ó OBJETIVOS	14
2.1 - OBJETIVO GERAL	14
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 - REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 - PRODUÇÃO ESPERMÁTICA	15
3.2 - AVALIAÇÃO SEMINAL	17
3.2.1 - Avaliação Macroscópica	18
3.2.2 - Avaliação Microscópica	19
3.3 - DILUIÇÃO DO SÊMEN	26
3.4 - REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN	32
3.5 - CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN	34
3.5.1 ó Crioprotetores	35
3.5.2 - Tempo de Equilíbrio (Resfriamento)	42
3.5.3 ó Congelação	43
3.5.4 ó Descongelção	45
4 - MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1 - COLHEITA DO SÊMEN	47
4.2 ó AVALIAÇÃO INICIAL DO SÊMEN	47
4.3 ó PRÉ-DILUIÇÃO E DILUIÇÃO	48
4.4 ó CONGELAÇÃO DO SÊMEN	48
4.5 ó DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN	49
4.6 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	49
4.7 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
6 ó CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

1 6 INTRODUÇÃO

A ovinocultura está presente na história da humanidade como sendo atividade que proporciona fontes alternativas para subsistência, pois, fornece a lã e a pele para o vestuário; a carne e o leite para a alimentação.

O Brasil apresenta criações de ovinos em todas as suas regiões, sendo o efetivo do rebanho ovino nacional de aproximadamente 16 milhões de cabeças, onde a região Nordeste assume maior relevância, pois detém o primeiro lugar na exploração de ovinos, com cerca de 7,7 milhões de cabeças, seguida pela região Sul que detém 4 milhões de cabeças. A região Norte possui um rebanho em torno de 480 mil cabeças (IBGE, 2008).

A criação de ovinos vem tornando-se mundialmente, uma atividade de alta lucratividade, sendo o manejo reprodutivo de fundamental importância para o bom andamento desta atividade. Um reprodutor infértil rapidamente é identificado, porém aquele que é sub-fértil, pode ocasionar perdas econômicas consideráveis na criação. Portanto uma propriedade que deseja alcançar bons índices reprodutivos necessita de um adequado acompanhamento da saúde reprodutiva dos machos (GRANADOS, 2006).

Além do acompanhamento do rebanho, algumas biotecnologias têm sido desenvolvidas objetivando o aumento dos índices produtivos e reprodutivos da espécie ovina, e conseqüentemente a sua rentabilidade. Dentre estas pode-se citar a Criopreservação de Sêmen, a Inseminação Artificial (IA), a Produção *in vitro* (PIV) e a Transferência de Embriões (TE) (COX; ALFARO, 2007; SIMPLICIO et al., 2007).

A criopreservação proporciona a estocagem do sêmen de animais de alto valor por tempo indeterminado, maximizando assim o poder reprodutivo do macho e permitindo seu uso mesmo após a morte do animal. Além disso, reduz os custos com criação de reprodutores, tendo em vista que se pode adquirir sêmen congelado com qualidade comprovada (CASTELO et al., 2008).

O sêmen criopreservado pode ser aplicado posteriormente em outras biotecnologias, como a I.A., que permite a utilização de sêmen de reprodutores selecionados em um grande número de fêmeas (SILVA, 2002; AMIRAT et al., 2004; FONSECA, 2005). Sua difusão na espécie ovina e a realização do seu total potencial dependem das características do sêmen criopreservado e das técnicas disponíveis para a obtenção de uma fertilidade aceitável (PAPADOPOULOS et al., 2005).

A técnica de I.A. utilizando sêmen fresco e refrigerado apesar das vantagens inerentes ao melhoramento genético apresenta como principal limitante o curto período de viabilidade do sêmen, por outro lado, o sêmen congelado de ovinos apresenta como fatores limitantes os baixos índices de fertilidade na inseminação intra-cervical, os quais de acordo com Aisen (2001) variam entre 8-30%.

Pesquisas realizadas sobre a diluição e conservação de sêmen ovino, mostraram que a fertilidade do sêmen em estado líquido declinava rapidamente quando o mesmo é armazenado por mais que 24 horas e utilizado para a I.A. No entanto, este mesmo sêmen, sendo usado para a inseminação intra-uterina manteve sua capacidade de fertilização em torno de 10 dias (MAXWELL; WATSON, 1996).

Aisen et al. (2005) e Bucak et al. (2007) afirmam que dentro da problemática da I.A. ovina com sêmen congelado encontra-se o fato do sêmen do carneiro não possuir uma capacidade antioxidante adequada (diferença em relação a outras espécies) e também diferenças na composição lipídica da membrana do espermatozóide, que segundo Holt (2000) dificulta o sucesso da sua criopreservação.

Diante deste contexto surge a necessidade de aperfeiçoar os processos de tecnologia de sêmen, principalmente quanto ao uso de diluentes, assim como avaliar as alterações espermáticas após a diluição e a criopreservação. Por estes motivos, esta pesquisa teve como objetivo contribuir para o estudo da criopreservação de espermatozoides ovinos, analisando-se o efeito de diferentes diluentes e tempos de equilíbrio, sobre a qualidade e a viabilidade espermática após a descogelação.

OBJETIVOS

2.1 ó OBJETIVO GERAL

Avaliar a viabilidade de espermatozóides ovinos, submetidos à criopreservação com diferentes diluentes e tempos de equilíbrio.

2.2 ó OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a melhor motilidade e vigor de espermatozóides ovinos após a criopreservação com diferentes diluentes e tempos de equilíbrio.

Avaliar a resistência espermática do sêmen criopreservado, através do Teste de Termo Resistência (TTR) e da análise da integridade do acrossoma.

Determinar dentre os diluentes e tempos de equilíbrio, o mais apropriado para a criopreservação de sêmen ovino.

3 - REVISÃO DE LITERATURA

A criopreservação de sêmen é uma importante biotécnica reprodutiva, e quando associada à IA, representa um mecanismo eficiente para promoção e difusão de material genético de excelente qualidade (TRALDI, 1994).

A I.A. é uma valiosa ferramenta para programas de melhoramento genético e conservação de raças em ovinos. No entanto, esta técnica não é tão difundida nessa espécie, quando comparada a outras espécies domésticas, não somente devido ao fato dos baixos e irregulares índices de fertilidade, mas também à dificuldade na aplicação de melhorias, tais como o uso de sêmen congelado (ANEL et al., 2006).

Salamon e Maxwell (2000) relataram que a célula espermática sofre alterações ultra-estruturais, bioquímicas e funcionais após passar pelo processo de criopreservação, o que conduz à queda na motilidade e perda da sua viabilidade dentro do trato genital feminino. Apesar disto, consideráveis avanços têm sido obtidos no sentido de minimizar os efeitos do processo de criopreservação sobre a estrutura e função espermática (GILLAN et al., 2004).

Portanto, a criopreservação do sêmen na espécie ovina é um processo complexo, onde é importante atentar para diversos fatores a fim de obter resultados satisfatórios. Dentre esses fatores, destacam-se a diluição, a criopreservação, a descongelação e também a fisiologia seminal (TRALDI, 1994).

3.1 - PRODUÇÃO ESPERMÁTICA

Os espermatozoides são formados dentro dos tubos seminíferos, nos testículos, por um processo denominado espermatogênese. Nos animais, as células precursoras dos gametas, chamadas células germinativas primordiais ou espermatogônias migram da região do saco vitelínico do embrião para as gônadas indiferenciadas (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Atingida a puberdade e após um período de proliferação mitótica, as espermatogônias dão origem as espermatogônias do tipo A, podendo estas manter-se indiferenciadas funcionando como células mãe ou continuar a divisão mitótica e por diferenciação, originar as espermatogônias do tipo B e posteriormente, os espermátocitos primários. Por divisão

meiótica, os espermatócitos primários ($2n$) passam à espermatócitos secundários (n), e estes à espermátides (n) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A espermiogênese é o processo pelo qual as espermátides se diferenciam em espermatozóides. A espantosa evolução de uma célula redonda sem núcleo distinto para um espermatozóide altamente organizado deve-se ao alongamento e achatamento do núcleo condensado, dando forma à cabeça do espermatozóide; à eliminação de grande parte do citoplasma; à organização da superfície da célula em domínios específicos, constituídos por grupos distintos de lipídios e proteínas, desprovidos de motilidade; à reorganização das organelas citoplasmáticas: fusão das vesículas do complexo de Golgi para a formação do acrossoma, reorganização dos centríolos para formação do flagelo e repartição das mitocôndrias em torno da base da cauda (GATTI et al., 2004).

A espermição consiste na liberação dos espermatozóides imóveis no lúmen do tubo seminífero (HAFEZ, 1993). Estes flutuam passivamente no fluido liberado pelas células de Sertoli, dos canais eferentes até ao epidídimo, onde vão maturar e permanecer até à ejaculação (KING, 1993).

Os espermatozóides maduros são células altamente especializadas constituídas por duas regiões distintas, a cabeça e a cauda, cobertas por uma única membrana citoplasmática. Estas encontram-se unidas através do colo. A cabeça é ocupada quase na totalidade com o núcleo onde se encontra a cromatina muito condensada (EVANS; MAXWELL, 1990). A porção anterior do núcleo encontra-se coberta por uma estrutura de dupla membrana, o acrossoma, que contém enzimas hidrolíticas, tais como a acrosina e hialuronidase. Estas, quando em contato com o oócito, vão proporcionar um caminho através das camadas circundantes deste (MILLER et al., 2002). A sua forma achatada dorso-ventralmente permite a oscilação lateral do espermatozóide durante a penetração das células do *cumulus* e da zona pelúcida (ZP) do oócito (BEDFORD, 2006).

A cauda, sistema propulsor para mover o espermatozóide e conseqüentemente o núcleo, encontra-se dividida em três regiões: a peça intermédia (PI), a peça principal e a peça terminal. A cauda é atravessada por um complexo fibrilar denominado axonema, que emerge do centríolo situado na base da cabeça. A hidrólise do ATP gerado pelas mitocôndrias contidas na PI permite a propulsão do espermatozóide (GILBERT, 2003).

A membrana citoplasmática é uma estrutura fluída e dinâmica, composta por agregados de lipídios e proteínas unidos através de ligações não covalentes. A dupla camada fosfolipídica funciona como uma barreira impermeável à passagem da maioria das moléculas hidrossolúveis. Além das funções estruturais, tanto os lipídios como as proteínas exercem

outras funções: os lipídios participam na transdução de sinais, ao passo que as proteínas funcionam como receptores, enzimas ou transportadores de moléculas específicas (WHITE,1993).

O sêmen é uma suspensão celular semi-gelatinosa que contém os gametas masculinos e o meio líquido em que estes se encontram suspensos, o plasma seminal (HAFEZ, 1993). O plasma seminal é composto por uma mistura de secreções produzidas pelas glândulas vesiculares, epidídimo, ducto deferente e outras glândulas sexuais acessórias (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O plasma seminal da espécie ovina não possui capacidade antioxidante adequada, além do que a criopreservação diminui as defesas antioxidantes do sêmen, devido à produção de espécies reativas de oxigênio, que levam à peroxidação lipídica das membranas dos espermatozóides, resultando numa perda de motilidade, viabilidade e fertilidade dos mesmos (AISEN et al., 2001; BUCAK et al., 2007).

O ejaculado ovino é caracterizado por volume em torno de 1-2 ml, e a concentração espermática oscila entre 2.000-6.000 x 10⁶ espermatozóides/ml (PACHECO et al., 2009).

3.2 - AVALIAÇÃO SEMINAL

O macho ovino apresenta uma determinada estacionalidade produtiva que depende de uma série de variáveis. Essas variáveis podem ser de ordem intrínseca, destacando-se a raça, o peso e a idade; e extrínsecas, como o fotoperíodo, a latitude, a temperatura e a alimentação (NUNES et al., 1997).

Alterações nas características seminais de carneiros, devido a variações estacionais, são destacadas por diversos pesquisadores. As causas dessas alterações residem, em grande parte, nos diferentes fatores componentes do clima, como evidenciam trabalhos efetuados com respeito à luminosidade, à temperatura e ao regime de chuvas (FERRARI, 1993).

A duração do fotoperíodo parece constituir o principal fator a condicionar a estacionalidade reprodutiva (ESPESCHIT, 1998). A luz recebida pela retina, e pelo nervo óptico, envia uma mensagem até a glândula pineal, por meio de estímulo nervoso. Essa glândula, na ausência de luz no meio ambiente, produz a Melatonina que, por sua vez, estimula o hipotálamo, a hipófise e os testículos ao retorno da atividade reprodutiva (TRALDI, 1994). Os locais e o modo de ação da Melatonina não são totalmente conhecidos,

porém o efeito final do padrão de secreção hormonal durante um dia curto é a de modular a secreção do Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH) pelo sistema nervoso central. O GnRH controla a secreção hipofisária do Hormônio Luteinizante (LH) e do Hormônio Folículo-Estimulante (FSH) que, por sua vez, estimulam a atividade gonadal (AISEN, 2008).

Nas latitudes temperadas, a estação sexual dos machos caprinos inicia-se durante os dias decrescentes de verão-outono e termina durante os dias crescentes de inverno. A temperatura ambiental pode modificar o ciclo reprodutivo dos machos caprinos. Nas raças estacionais, a temperaturas baixas ou anormalmente elevadas adiantam ou retardam, respectivamente, o início do período da atividade sexual. Deste modo, as temperaturas baixas podem prolongar o final da estação sexual, enquanto as altas o adiantam (AISEN, 2008).

Nas regiões Sudeste e Sul do Brasil, os ovinos tendem a se comportar como poliéstricos estacionais, com o auge da estação reprodutiva nos meses de outono, quando os dias são mais curtos, podendo se estender até o inverno. Além do que, a estacionalidade reprodutiva típica da espécie é mais marcante em raças produtoras de lã e menos em raças lanadas especializadas em produção de carne e praticamente inexistente em raças deslanadas (FERRARI, 1993).

Várias técnicas têm sido propostas para a avaliação das características estruturais e funcionais do ejaculado ovino (PAPADOPOULOS et al., 2005; VALENTE et al., 2007), no entanto estas técnicas até agora não possuem uma relação consistente com a fertilidade *in vivo* (MEARA et al., 2008).

3.2.1 - Avaliação Macroscópica

São avaliadas a cor, o odor, o aspecto e o volume. Estes parâmetros dependem fundamentalmente da concentração de espermatozóides e eventualmente da presença de sangue, pus, urina, células epiteliais, detritos, etc. (CBRA, 1998), sendo muito importantes para eliminar machos oligozoospermicos, e para preparar doses de inseminação que atinjam a máxima fertilidade usando o menor número de espermatozóides possível. O êxito de uma cobertura depende tanto da qualidade como da quantidade de sêmen depositado no trato reprodutivo feminino (CENSYRA, 1994).

Segundo Aisen (2008) o sêmen dos carneiros é normalmente branco cremoso, podendo apresentar em alguns animais uma cor mais amarelada. O mesmo autor afirma que o volume médio do ejaculado é de 1 mL (0,3 a 1,5 mL).

3.2.2 - Avaliação Microscópica

a) Motilidade

A avaliação da motilidade dos espermatozóides é o teste mais utilizado para a determinação da qualidade seminal, uma vez que pode ser realizado rapidamente. A percentagem de espermatozóides com movimento progressivo retilíneo é o parâmetro mais relacionado com a fertilidade, com resultados variáveis entre autores (TARTAGLIONE; RITA, 2004). Este parâmetro é especialmente importante em ovinos, devido às particularidades anatômicas da cérvix (EVANS; MAXWELL, 1990).

A criopreservação é capaz de alterar a capacidade fertilizante dos espermatozóides (SÁNCHEZ-PARTIDA et al., 1999), através de alterações ultra-estruturais, bioquímicas e funcionais que ocorrem nas células espermáticas durante a criopreservação, o que conduz à queda na motilidade e perda da sua viabilidade dentro do trato genital (GILLAN et al., 2004).

Este exame é realizado em microscópio com aumento de 200 a 400X, utilizando-se uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas e mantidas a 37°C durante a avaliação. Normalmente, no caso de ruminantes, faz-se uma diluição para melhor avaliação, embora algumas espécies, por exemplo, suínos e equinos, não precisem de diluição (SALVIANO; SOUZA, 2008; SOARES; GUERRA, 2009).

Apesar de uma elevada proporção (40-60%) de espermatozóides de carneiro preservar a sua motilidade após a criopreservação, apenas cerca de 20-30% se mantêm biologicamente não danificados (WATSON, 2000). Um espermatozóide pode ser móvel, mas danificado, o que comprometerá a fertilidade do mesmo (SALAMON; MAXWELL, 2000). Tonieto (2008) classificaram reprodutores de acordo com a motilidade espermática pós-descongelamento em alta (80%), média (70%) e baixa (53%) motilidade.

Atualmente, grande atenção tem sido dada aos métodos objetivos, entre eles a análise computadorizada (*Computer-Assisted Semen Analyses* - CASA). Os programas

computadorizados para a avaliação espermática podem ser mais objetivos e imprimir maior repetibilidade às observações do que a habilidade do técnico em identificar padrões de motilidade espermática. O poder de análise deste tipo é dado pela avaliação precisa e acurada dos espermatozóides com alto grau de objetividade, podendo assim aperfeiçoar o processo de avaliação do sêmen (ARRUDA, 2000).

b) Turbilhonamento

O turbilhonamento é o movimento de massa em forma de ondas observado em umagota de sêmen recém colhido. A intensidade do movimento é resultante da interação da motilidade, do vigor e da concentração espermática (CBRA, 1998).

Segundo os métodos convencionais, propostos pelo CBRA, para se proceder a avaliação desta característica, coloca-se uma gota de sêmen sobre uma lâmina previamente aquecida a 37°C e leva-se ao microscópio, como aumento de 100X. Atualmente a interpretação, ainda subjetiva, é expressa utilizando-se uma classificação em escala de 0 a 5, em que 0 é a ausência de turbilhão, o que não implica em ausência de motilidade, e 5 o valor máximo dado a um acentuado movimento de massa (AISEN, 2008; CBRA, 1998).

c) Vigor

O vigor é a característica que representa a força do movimento, que acaba influenciando a velocidade com que os espermatozóides se movimentam. Este parâmetro é classificado em escala de 0 a 5, em que 0 é a ausência de movimento progressivo com o deslocamento lateral de cauda fraco e inexpressivo e 5 resulta em movimento progressivo, vigoroso e veloz dos espermatozóides (CBRA, 1998).

d) Concentração

A concentração espermática representa o número de espermatozóides por milímetro cúbico (mm^3) ou centímetro cúbico ($\text{cm}^3 = \text{mL}$). O procedimento mais comum para se obter a concentração espermática consiste na contagem das células no hemocitômetro, ou como é mais conhecida Câmara de Neubauer, embora também se possa utilizar a espectrofotometria e o *Micro-Cell-Couter* (HAFEZ; HAFEZ, 2004). A concentração de espermatozóides por centímetro cúbico em carneiros varia de $3000-7000 \times 10^6$ espermatozóides/mL (AISEN, 2008).

e) Morfologia

Aisen (2008) afirma que alguns defeitos morfológicos estão associados à fertilidade reduzida. Amostras que contenham mais de 15% de anormalidades não devem ser usadas em programas de I.A. As anormalidades espermáticas podem ser primárias, quando originam-se durante a espermatogênese, secundárias quando aparecem durante a passagem no epidídimo, ou terciárias, logo após a ejaculação e manipulação. Segundo Coetzee et al., (1998) a avaliação da morfologia espermática pode ser realizada pela técnica de esfregaço corado ou pela preparação úmida, em microscópio de contraste de fase ou de interferência diferencial, associados ou não, sendo mais indicado a preparação úmida.

A montagem da preparação úmida consiste na colocação de uma gota de sêmen diluído em formol salino tamponado sobre lâmina, cobrindo-a de imediato com uma lamínula. Aplica-se sobre este conjunto um papel filtro, pressionando-se suavemente a lâmina até que o excesso de líquido seja absorvido. A análise morfológica deve ser realizada sob imersão onde as primeiras 200 células observadas são classificadas quanto aos defeitos de forma e estrutura (CBRA, 1998).

Alterações nas organelas e DNA podem ser detectadas com precisão num grande número de espermatozóides, através de ensaios imunocitoquímicos, citometria de fluxo e análise computacional de imagens (GRAHAM; MOCÉ, 2005).

f) Outros Métodos de Avaliação Seminal

f.1) Teste de Termorresistência (TTR)

O Teste de Termorresistência (TTR) é um teste de exaustão, onde é avaliada a capacidade de sobrevivência dos espermatozóides a uma temperatura similar à do trato reprodutivo da fêmea (37-38°C). A avaliação do sêmen à temperatura corporal após o processo de criopreservação é muito importante, uma vez que a viabilidade espermática deve ser mantida após este processo (AISEN, 2001; LIMA, 2008).

As condições de incubação variam com a espécie e com o tipo de processamento de sêmen a testar (fresco, resfriado ou congelado), mas em caprinos e ovinos, o sêmen é geralmente diluído em concentrações compreendidas entre 80 e 300x10⁶ espermatozóides/mL, e colocado em banho-maria a 37-38°C (CBRA, 1998). A porcentagem de espermatozóides móveis e a motilidade individual progressiva podem ser calculadas ao início do teste e duas a três horas após a incubação (BARIL et al., 1993).

f.2) Teste Hiposmótico (HOST)

A membrana citoplasmática dos espermatozóides não é homogênea, apresentando diferenças estruturais e funcionais (WHITE, 1993), por este motivo, a realização de testes que avaliem a integridade desta membrana se torna é necessária.

O teste que avalia a funcionalidade e a integridade da membrana que cobre a cauda do espermatozóide é o teste da endosmose ou HOST (Hypoosmotic Swelling Test), que parece ser o que melhor se correlaciona com os resultados de fertilidade (ARTIGA, 1994; GRAHAM; MOCÉ, 2005). Segundo Matsuoka et al. (2006) este é um teste simples, útil e com boa confiabilidade.

Quando o espermatozóide é exposto a condições hipoosmóticas há entrada de água pela membrana espermática, numa tentativa de atingir um equilíbrio osmótico entre os compartimentos intracelular e extracelular. Este influxo de água aumenta o volume da célula e

provoca a dilatação da membrana plasmática, enrolando o flagelo. A cauda é particularmente susceptível a esta condição, torcendo-se em helicoidal (reação positiva), ou seja, enrolando a cauda. Esta situação é facilmente observada com um microscópio de contraste de fase, sendo suficiente contar 100 espermatozóides para validar o teste (ROTA et al., 2000). Esta reação é um sinal de que o transporte de água através da membrana ocorreu normalmente, isto é, um sinal de que a membrana está fisicamente e funcionalmente intacta, ou seja, bioquimicamente ativa (CORREA; ZAVOS, 1994).

A osmolaridade ideal da solução é a que produz o maior efeito possível, ou seja, maior percentagem de espermatozóides reativos, sem resultar na lise das células (ROTA et al., 2000). Esta osmolaridade, bem como o tempo no qual se atinge o valor máximo de reações positivas e a temperatura ideal para a realização do teste, varia com a espécie, havendo estudos para humanos, bovinos, ovinos, suínos e cães, que nem sempre são coincidentes nos valores de referência indicados (VAZQUEZ et al., 1997; CABRITA et al., 1999). Embora apresentando valores diferentes quanto às percentagens de endosmose obtidas, Cortés et al. (1993) e Sousa et al. (2000) indicam que a solução hiposmótica aconselhada para a determinação e seleção de indivíduos de maior qualidade seminal, é a solução de 100 mOsm/Kg, e que a maior proporção de espermatozóides com reação positiva é encontrada nos primeiros vinte minutos do teste.

Ferreira et al. (2001) analisando o sêmen caprino pós-descongelamento utilizando uma solução hiposmótica de 100 mOsm/kg, observaram que a percentagem de endosmose positivas totais aos 25 minutos, apresentou um valor significativamente superior à dos 5 minutos, sendo de 88,5 % e 85,9 %, respectivamente.

Andrade (2007) utilizando o HOST para espécie ovina, verificou que o diluente a base de TRIS-Gema apresentou melhores índices da conservação da integridade da membrana plasmática no intervalo de até 48 horas, e que o diluente a base de Leite desnatado mostrou melhores índices quanto à motilidade e vigor. Santos et al. (2001) também encontraram bons resultados, trabalhando com essa mesma combinação de solutos, a 60 mOsmol. Esses autores, porém, trabalharam com um tempo de incubação de 60 minutos, a 37° C.

f.3) Testes de Coloração

A vitalidade é um método que baseia-se nas diferentes permeabilidades das membranas dos espermatozóides aos corantes, onde avalia-se a viabilidade espermática por meio de colorações supra-vitais, as quais consistem de Eosina ou esta combinada com a Nigrosina (WATSON, 1995). As alterações na membrana permitem que os corantes penetrem nos espermatozóides, o que providencia um método simples de avaliar os danos causados pela congelação (WHITE, 1993).

A integridade da membrana espermática também pode ser analisada utilizando-se corantes ou combinações destes, como o Azul de Tripán associado à Giemsa (TARTAGLIONE; RITA, 2004). A integridade desta membrana é um atributo essencial para a fertilidade do espermatozóide e, por isso, a análise deste parâmetro é fundamental para a predição da fertilidade (LUZ et al., 2000).

De modo semelhante, a integridade do acrossoma é pré-requisito básico para garantir um bom potencial de fertilidade dos espermatozóides, pois seu dano parcial ou total leva a uma incapacidade para fertilizar. Entretanto, a integridade acrossomal não reflete necessariamente a integridade de membrana, sendo importante o uso de testes que combinem ambas avaliações (CAVALCANTE, 2008).

Torna-se interessante o uso de técnicas que aliem a vitalidade espermática com a integridade acrossomal. Talbot e Chacon (1991) desenvolveram uma técnica de coloração tripla que faz uso de três corantes: Azul de Tripán (coloração vital), Marrom de Bismark e Rosa Bengala (coloração do acrossoma).

Outra técnica que permite avaliar a viabilidade e o estado acrossomal é o uso da coloração dupla associando o corante Giemsa, que verifica a presença ou ausência do acrossoma, e o Azul de Tripán, que detecta a população de espermatozóides vivos e mortos (DIDION et al., 1989). Segundo Lima (2008) os espermatozóides vivos não se coram e os mortos se coram em azul na região pós-acrossomal. Nas células onde o acrossoma está presente este se cora de roxo escuro brilhante e aquelas sem acrossoma não se coram.

Dentre as técnicas de avaliação da membrana plasmática espermática destacam-se as sondas fluorescentes permeáveis e impermeáveis, detectando assim as membranas danificadas, como as que utilizam os corantes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e o iodeto de propídio (IP) (ANZAR et al., 1997; SOUZA, 2003).

O CFDA é uma solução não fluorescente que penetra o ambiente celular e é, rapidamente, convertida em carboxifluorosceína pelas esterases intracelulares. A carboxifluorosceína é uma solução altamente fluorescente não permeável que é mantida no meio intracelular na presença de uma membrana plasmática intacta, apresentando a coloração verde. Por outro lado, o IP tem a capacidade de corar o DNA de células que estão mortas ou têm sua membrana danificada, produzindo uma coloração vermelho fluorescente quando excitada (PEÑA et al., 1998b).

Existem diversos outros corantes fluorescentes utilizados para avaliar não apenas a integridade da membrana plasmática, mas também os diversos estágios da reação acrossômica. Dentre os mesmos, podem ser citados: o SYBR-14, o carboxi-SNARF, a calceína-AM associada ao homodímero etídio e o Hoeschst 33258. As colorações fluorescentes permitem a avaliação espermática tanto através da microscopia de fluorescência, quanto da citometria de fluxo. A vantagem da citometria é a possibilidade de contagem de um maior número de células e uma avaliação mais objetiva dos parâmetros seminais (RIJSSELAERE et al., 2005).

f.4) Testes de Ligação do Espermatozóide com o Ócito

A redução na capacidade de ligação deve-se provavelmente aos danos na membrana citoplasmática, principalmente nos receptores de membrana ou por agregação incompleta destes receptores (BAILEY et al., 2000). Para atingir a fertilização, um espermatozóide fertilizante tem de se ligar e interagir com vários alvos. Estas interações podem ser avaliadas através de: Testes de Ligação do Espermatozóide às Células do Oviduto, Testes de Ligação e Penetração na Zona Pelúcida e Fertilização *in vitro* (WABERSKI et al., 2005).

f.5) Testes Enzimáticos

Os Testes Enzimáticos que permitem determinar a presença de enzimas acrossômicas, como a acrosina no plasma seminal, funcionando como indicadores de lesões a nível do

acrossoma (CENSYRA, 1994). Aisen (2008) afirma que danos parciais ou totais no acrossoma levam a uma incapacidade para fertilizar.

3.3 - DILUIÇÃO DO SÊMEN

Após a etapa de avaliação e considerando-se ter uma amostra de boa qualidade seminal, passa-se à fase de diluição (GONÇALVES et al., 2002).

Para que o sêmen possa ser conservado, ele deve ser devidamente diluído, desta maneira, ele terá sua durabilidade estendida e poderá ser transportado. O diluidor tem como função proteger a membrana do espermatozóide contra o choque térmico e as injúrias mecânicas causadas pelo transporte, além de fornecer nutrientes e estabilizar o pH do meio (VERSTEGEN et al., 2005).

Segundo Picket e Amann (1987), um diluidor apropriado, em geral deve apresentar as seguintes características: ser atóxico para os espermatozoides, ser de baixo custo e preparo fácil, pressão osmótica compatível, balanço mineral apropriado, combinação ajustada de nutrientes, capacidade de neutralizar produtos tóxicos originados do metabolismo espermático, proteção contra os danos causados por ação das mudanças de temperatura, bem como proporcionar a estabilidade dos sistemas enzimáticos e a integridade da membrana plasmática. Aisen (2008) afirma que os diluentes devem proporcionar nutrientes como fonte de energia, o tamponamento de pH e também o aumento do volume do ejaculado, a fim de obter múltiplas doses para inseminar.

Segundo Gonçalves et al. (2008) após fazer o diluidor, deve-se medir o pH, o qual deve estar em torno da neutralidade (6,8 a 7,2) e antes de ser feita a diluição, é importante observar se o ejaculado e o diluidor estão na mesma temperatura.

Meios diluidores são indispensáveis à criopreservação do sêmen, sendo a proporção de diluição desejável de 1:1 a 1:2. Diluições acima desse patamar geralmente resultam em baixa densidade final da mistura, o que implica em menor taxa de fertilização. A dose inseminante deve conter entre 150 e 200 milhões de espermatozoides viáveis o que resulta na possibilidade de inseminação de 15 a 30 ovelhas com um único ejaculado (BICUDO et al., 2003).

O processo de congelação de sêmen é caracterizado por apresentar uma reconhecida queda de fertilidade quando comparado ao sêmen fresco, devido a uma menor viabilidade celular pós-descongelação e a alterações estruturais/funcionais que ocorrem em uma grande

parte dos espermatozóides submetidos ao processo (WATSON, 2000; BITTENCOURT et al., 2006). Por este motivo a congelação dos espermatozóides deve ocorrer na presença de diluidores, adicionados de substâncias crioprotetoras que têm como função minimizar os danos causados pelo choque térmico, manter o pH e a osmolaridade adequada (WOLFE; BRYANT, 2001).

Na atualidade os diluidores oferecem boa proteção à integridade espermática, entretanto com os últimos avanços na fisiologia da fecundação, é possível inferir que a baixa fertilidade do sêmen congelado está relacionada, fundamentalmente com a composição dos diluidores, que pode favorecer modificações na distribuição e características dos componentes de membrana que cobrem o espermatozóide, resultando na sua desestabilização. Esta desestabilização está correlacionada ao aumento de fluidez da bi-camada lipídica da membrana o que a torna mais permeável favorecendo a entrada de Cálcio livre no interior da célula, o qual por sua vez estimula o processo de capacitação (SILVA, 2007).

É importante ressaltar que um dos pré-requisitos para o sucesso da I.A. é a utilização de um diluidor que mantenha a integridade da membrana plasmática dos espermatozóides (PAPADOPOULOS et al., 2005).

A melhor maneira de se avaliar a funcionalidade de um diluidor é através da determinação da taxa de concepção, mas essa avaliação nem sempre é viável em condições experimentais. Entretanto, podem ser avaliadas algumas características dos espermatozóides fundamentais para o processo de fertilização, tais como: motilidade, vigor espermático e integridade das membranas espermáticas após a diluição. Uma boa motilidade e vigor espermático são importantes para que o espermatozóide chegue até a tuba uterina e ultrapasse os envoltórios do oócito, no entanto a membrana precisa estar intacta para que ocorra a fertilização (CUNHA; LOPES, 2000).

Segundo Silva (2001) e Gibbons (2002), um diluente para ser usado na conservação do sêmen deve ser constituído por substâncias tampões, como o Fosfato de Sódio, Citrato de Sódio, TRIS (Tris-hidroximetil-aminometano), TES (N-tris(hidroximetil) metil 2-aminoetanosulfônico); por fontes energéticas, como a Glicose e a Frutose; e por crioprotetores externos como a Gema de Ovo ou o Leite, e internos, como o Glicerol (GLY) e o Etilenoglicol (EG); bem como por antibióticos, sendo a Penicilina, a Estreptomicina e a Gentamicina as mais utilizadas.

Sabe-se que a atividade metabólica do espermatozóide resulta na formação de íons hidrogênio que tornam o meio ácido, levando a um decréscimo da longevidade e da fertilidade dos espermatozóides, por este motivo é necessário à adição de tampões nos diluidores

seminais. Os tampões agem removendo os íons hidrogênio produzidos pelo metabolismo espermático. O pH ótimo para as células espermáticas é próximo da neutralidade, logo, a maioria dos diluidores é tamponada com pH entre 6,9 e 7,1 (ENGLAND; PONZIO, 1996; NELSON; COUTO, 1994).

O Fosfato foi primeiramente testado como tampão, porém o Citrato de Sódio, introduzido por Salisbury 1940, adaptou-se melhor para essa finalidade, visto que este aumenta a capacidade de diluição da Gema de Ovo ao meio líquido, fenômeno que favorece sobremaneira a ação da mesma sobre os espermatozóides reduzindo o fator de choque térmico e por conseqüência aumentando o tempo de sobrevivência dos espermatozóides (PÉREZ; PÉREZ, 1994).

O TRIS é um dos principais componente dos diluentes de sêmen ovino utilizados rotineiramente, que atua como tampão iônico bipolar em pH entre 7,0 e 9,0. Ele é uma substância solúvel em água, disponível comercialmente em um alto grau de pureza na forma de cristais (CHOE et al., 2006; DORADO et al., 2007a).

Davis et al. (1963) foram os primeiros a descrever a utilização do tampão TRIS para a conservação do sêmen de um mamífero, no caso, da espécie bovina. No ano seguinte, Foote (1964) adaptou o uso do diluente à base de tampão TRIS associado ao Citrato de Sódio para a preservação do sêmen na espécie canina. Posteriormente, Maxwell e Watson (1996) reportaram que na conservação de sêmen caprino, utilizando um diluente a base de TRIS-Citrato de Sódio a 5°C, a capacidade de fertilização *in vitro* dos espermatozóides pode ser mantida por 14 dias.

Rodrigues (1997) reportou que o TRIS não apenas apresenta atividade tamponante, mas que também atua na redução do metabolismo da Frutose pela célula espermática, contribuindo assim para a preservação de sua energia. Para o preparo do diluente TRIS, usualmente, realiza-se a adição de uma Hexose, como uma fonte exógena de substrato energético para o espermatozóide (ENGLAND, 1993). O TRIS tem sido o meio mais comumente utilizado na criopreservação de espermatozóides ovinos (SALAMON; MAXWELL, 2000).

O TES foi um diluente desenvolvido especialmente para a criopreservação do sêmen bubalino (VALE et al., 1991). Na congelação de sêmen de búfalos bons resultados foram obtidos com diluidores à base de TRIS e TES, com motilidade pós-descongelação variando de 50-60%. Após o TTR, a motilidade espermática do sêmen congelado com TRIS cessou com uma hora e meia após o início de teste, sendo melhor resultado obtido com o diluidor à base de TES, no qual a motilidade espermática após cinco horas do TTR ainda era ao redor de 20%

(OHASHI, 1993b). Barnabé et al. (1995) observaram que o sêmen congelado com TES apresentou um índice de gestação de 60%, enquanto que o sêmen congelado com TRIS o índice foi de 49,2%, ou seja, o diluidor à base de TES apresentou um índice de gestação 10,7% superior ($p < 0,05$).

A solução tampão denominada Phosphate Buffered Solution (PBS) possui em sua composição sais à base de cloretos e fosfatos adicionados de componentes energéticos como Glicose e Piruvato de Sódio. Esta solução foi desenvolvida, e ainda é largamente utilizada, para a manipulação e cultivo celular, caracterizando-se como uma solução de osmolaridade 280mOsm e pH 7.2 (LIU et al., 1998; GUTHRIE et al., 2002), portanto dentro dos padrões indicados para a diluição do sêmen de algumas espécies (AGUIAR et al., 2007).

O Ácido Cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico) é outra substância que entra na composição de alguns diluentes, possui ação anti-oxidante e tem sido utilizado como um conservante natural. Em bioquímica, é marcada a sua atuação no ciclo de Krebs, importante via da respiração celular que ocorre nas mitocôndrias. Além disso, em algumas soluções, o ácido cítrico é capaz de servir como doador de prótons, produzindo o Citrato, que é largamente conhecido por atuar na estabilização de pH (SILVA, 2005).

Azerêdo et al. (2001) relataram que na diluição de sêmen ovino pode ser utilizado o diluente TRIS-Gema de Ovo, que segundo os autores produz altas taxas de fertilidade pós-descongelação. Salviano e Souza (2008) afirmam que na diluição utilizando TRIS-Gema de Ovo, devem ser adicionadas inibidores do crescimento microbiano, fontes nutritivas, estabilizadoras e tamponantes para a manutenção das células espermáticas. A adição de Frutose, de Lactose e da própria Gema do Ovo têm a função de nutrir os espermatozóides.

É importante salientar que a Gema de Ovo também tem propriedades termoprotetoras, protegendo a membrana plasmática e restaurando os fosfolipídios perdidos durante o choque térmico oriundo da mudança de temperatura que ocorre durante o resfriamento inicial do sêmen. Acredita-se que essa proteção possa ser devido à presença de uma lipoproteína chamada Fosfatidilcolina. Durante o choque térmico, estas lipoproteínas interagem com a estrutura lipídica da membrana plasmática das células espermáticas e propiciam a proteção (BOUCHARD et al., 1990).

Além de sua ação em proteger a membrana espermática, a Gema de Ovo é também conhecida por servir como uma fonte protéica para o diluente (SANTOS, 2004). Outras substâncias têm sido também utilizadas com este mesmo propósito, tais como o Leite desnatado (ROTA et al., 2001) e a Albumina Sérica Bovina (BSA) (SIRIVAIDIAPONG et

al., 2000). Apesar de seus efeitos benéficos, a Gema de Ovo apresenta um inconveniente, que é a possibilidade de transmissão de doenças (SILVA et al., 2002).

Rodrigues & Rodrigues (1998) realizaram um estudo onde compararam a diluição do sêmen caprino com TRIS-Gema de Ovo e TRIS-BSA (0,25%, 0,50% e 1,00%) e após a criopreservação foi observado perda de motilidade espermática em todos os grupos: 31,58%, 47,39%, 52,69% e 45,69%, respectivamente, sendo observado diferença estatística entre o grupo TRIS-Gema de Ovo e TRIS-BSA 0,50%.

Em alguns estudos têm sido proposto a adição de surfactantes, como o Lauril Sulfato de Sódio (OEP) ao diluidor a base de Gema de Ovo, com melhoria da sobrevivência e motilidade espermática, e manutenção da integridade das membranas plasmática e acrossomal após a descongelação, refletindo em incremento de fertilidade (AKOURKI et al., 2004).

Maia et al. (2008) avaliaram a adição do detergente OEP ao diluente TRIS utilizado para a criopreservação do sêmen de ovinos. Os autores observaram que a motilidade para o sêmen diluído em TRIS (0,5% ou 1,0%) com OEP e em TRIS sem OEP, foi de 65,0%, 69,9% e 34,3%, respectivamente, e que a percentagem de espermatozóides viáveis com membrana plasmática e acrossomal intactas foi de 28,8%, 32,3% e 13,8%, respectivamente.

Segundo Salamon e Maxwell (2000) o Leite é um meio isotônico, contendo muitos componentes favoráveis à manutenção e conservação da viabilidade do espermatozóide. O sucesso desse diluente tem sido atribuído à sua fração protéica, que pode atuar como tampão, contra mudanças do pH e, como agente quelante, contra a presença de metais pesados no meio. Além do que, Betini et al. (1998) e Cunha (2002) afirmam que o Leite possui abundância de carboidratos que seriam utilizados pelos espermatozóides na produção de energia. Sabe-se que duas substâncias responsáveis por estas características são: a Lactose, que age como elemento energético, e a Caseína que é uma substância capaz de potencializar a atividade cinética dos espermatozóides.

Souza et al. (2006) citam o uso de um diluente à base de Leite em pó desnatado para a congelamento do sêmen ovino, mas recomendam a adição do antibiótico Gentamicina na concentração de 13,3 mg/mL, visando controlar a contaminação bacteriana nas amostras. Recentemente, Dorado et al. (2007a) demonstraram que amostras de sêmen ovino congeladas neste diluente promovem taxas de gestação superiores àquelas obtidas com o TRIS.

Carvalho et al. (2008) estudaram o efeito dos diluentes, TRIS-Gema (TG), Leite-Gema (LG) e TRIS-Gema-Leite (TGL) sobre a diluição e a criopreservação de sêmen ovino. Foi observado que o diluente TG mostrou motilidade progressiva (46,5%) superior aos diluentes LG (26,1%) e TGL (32,1%) após a descongelação. Os mesmos autores também observaram

que a percentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal lesadas após a descongelação não diferiu entre os diluentes, TG (29,8%), LG (24,3%) e TGL (30,1%).

Inúmeras pesquisas vêm demonstrando o bom potencial da água de coco como diluente seminal em várias espécies (MEDEIROS, 2008). A água de coco é uma solução natural e estéril, composta de sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras, além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, fornecendo os nutrientes necessários para a conservação de células espermáticas (BLUME; MARQUES JR., 1994). Além do que, a água de coco, através de experimentos *in vitro* e *in vivo*, exibiu um excelente comportamento no que se refere ao vigor, motilidade e fertilidade dos espermatozoides (NUNES, 1986). A água de coco sendo um diluente pobre em Fosfolipídios, pode ser utilizada por exemplo na diluição do sêmen ovino, o que permite suprimir os processos de lavagem que são submetidos o sêmen antes de diluí-lo nos diluentes convencionais (MACHADO, 1991).

Pesquisadores realizaram o fracionamento da água de coco e observaram uma molécula pertencente ao grupo das Auxinas, o ácido 3-indol acético (IAA), substância com ação hormonal estimuladora do crescimento de vegetais, que ativa o metabolismo dos espermatozoides, aumentando a motilidade e também a taxa de fertilidade, além de permitir sua conservação durante períodos mais longos. A presença do IAA pode variar de acordo com o estágio de maturação e da espécie do coco e conseqüentemente influir nos resultados *in vitro* e *in vivo* do sêmen diluído em diferentes composições da água de coco (NUNES; SALGUEIRO, 1999).

Figuerêdo (2006) avaliou a adição de Gema de Ovo aos diluidores água de coco em pó e *in natura*, e observaram que esta adição é necessária para a manutenção da integridade e da qualidade do sêmen ovino resfriado a 4°C, por um período de até dois dias.

Oliveira et al. (2009) diluíram e congelaram sêmen ovino utilizando água de coco em pó (ACP-101) e TRIS, sendo analisada a morfologia espermática por esfregaços corados por eosina-nigrosina (EN) e azul de bromofenol (AB). Após 5 minutos de TTR não foi verificada alteração morfológica nos espermatozoides avaliados. No entanto após 120 minutos, a maior quantidade de espermatozoides normais foi observada quando se utilizou o TRIS-EN e TRIS-AB em comparação ao ACP-EN e ACP-AB, sendo respectivamente 56,73%, 52,88%, 47,60 e 49,79. Os autores concluíram que o meio à base de TRIS promove maior proteção quanto às crioinjúrias em espermatozoides, eles afirmam que a maior quantidade de Gema de Ovo presente neste meio é responsável por esta proteção. Este fato foi confirmado por Cavalcante (2008), quando avaliando o sêmen ovino diluído e criopreservado em TRIS e em água de coco em pó (ACP-102), observou que na incubação por um período de 2 horas a 37°C após a

descongelamento o percentual de espermatozoides móveis foi de 62,8% e 40,3%, respectivamente.

A adição de antibióticos no meio diluidor previne contaminações das amostras de sêmen, principalmente durante a manipulação do mesmo e durante o período que permanece resfriado (LINDE-FORSBERG, 1999). A contaminação bacteriana pode afetar negativamente a fertilidade, pela própria presença de bactérias, pela produção de toxinas, por degradação dos componentes do meio, ou ainda, pela utilização de substratos metabólicos. Essa situação determina a necessidade de incorporar aos diluentes substâncias de efeito antimicrobiano (NELSON; COUTO, 1994; WATSON, 1995).

3.4 - REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN

O objetivo da refrigeração do sêmen previamente a sua utilização é reduzir o metabolismo energético dos espermatozoides, prolongando assim sua viabilidade e capacidade fecundante no tempo. O sêmen de carneiro é sensível ao resfriamento rápido (choque ao frio), manifestando-se por um aumento de espermatozoides mortos, formas anormais, alterações de distribuição de lipídios de membrana e aumento do Cálcio intracelular, com possível fusão de membranas (AISEN, 2008), o que segundo Watson (2000) promove a exocitose acrossomal.

O sêmen fresco e resfriado apresentam fertilidade mais elevada quando comparado ao congelado (NUNES et al., 1997; SILVA et al., 2002). Entre as principais vantagens da refrigeração, está à manutenção da viabilidade espermática por mais tempo, sem que ocorra diminuição na capacidade fertilizante dos espermatozoides (MEDEIROS, 2008).

Donovan et al. (2004) estudando a interação entre o tipo de sêmen (fresco ou congelado) e o tipo de estro (natural ou sincronizado) de ovelhas, observaram que a taxa de prenhez após a inseminação cervical foi maior com sêmen fresco e estro natural e sincronizado, 82% e 70%, respectivamente, em comparação com sêmen congelado e estro natural e sincronizado, 40% e 52%.

A temperatura do sêmen no momento da ejaculação é de aproximadamente 37,5°C, e a exposição do sêmen a temperaturas superiores a essa, aumenta o ritmo metabólico e esgota suas reservas energéticas, ocorrendo decréscimo da viabilidade média do espermatozoide. Por outro lado, a diminuição da temperatura contribui para a redução do metabolismo

espermático, porém essa diminuição de forma abrupta, produzirá a perda da viabilidade celular (WATSON, 2000).

Quando os espermatozóides são armazenados a 5°C, as necessidades metabólicas decrescem a aproximadamente 10%, daquela que teriam se estivessem à temperatura de 37°C. Em consequência, a produção de catabólitos é menor e o desgaste da célula não ocorre de forma tão rápida (McKINNON, 1996).

Para a diluição do sêmen refrigerado são utilizados em geral meios isotônicos, sendo habituais os preparados à base de Leite desnatado ou Gema de Ovo, sendo adicionado aos meios tampões, açúcares e antibióticos (AISEN, 2008).

Segundo Feldman e Nelson (1996) uma adequada diluição e refrigeração, pode manter viáveis os espermatozóides por 24 horas e, dependendo do meio diluidor, por até cinco dias. O sêmen pode ser resfriado em temperaturas entre 2° e 5°C, sendo de 4° a 5°C as mais comumente utilizadas (LEBOEUF et al., 2000). Segundo Aisen (2008) o sêmen resfriado a 5°C mantém sua fertilidade variando entre 18-24 horas após a colheita. Entretanto, Nunes et al. (1997) afirmam que o sêmen resfriado a 4°C possui viabilidade máxima de 48 horas, o que segundo Simplício et al. (2007) limita a comercialização do mesmo, dentro e entre Estados, Regiões e Países.

Milczewski et al. (2000) compararam a eficiência *in vitro* de 6 diferentes diluentes: ãCornell University Extenderö (CUE), ãCornell University 16ö (CU-16), Glicina-Gema (GG), Citrato-Gema (CG), Leite Desnatado UHT-Gema (LG) e Tris-Gema (TG), na conservação de sêmen ovino à temperatura de 5°C. Após 8 horas de refrigeração o sêmen diluído foi submetido ao TTR, e a análise do sêmen apresentou resultados superiores em relação a motilidade progressiva (50%) e ao vigor (1,8) com a utilização do diluente CG. Os mesmos autores estudando a morfologia espermática, observaram que não houve diferença estatística na análise do desprendimento do acrossoma entre os diluentes empregados, CUE (4,7%), CU-16 (5,8%), GG (5,7%), CG (6,1%), LG (4,9%) e TG (5,1%).

Segundo Ollero et al. (1998) os principais danos causados pelo decréscimo da temperatura são alterações nas membranas acrossomal e plasmática e nas mitocôndrias.

Para o sucesso na conservação dos espermatozóides pela refrigeração, é necessário seguir uma série de passos que visam à redução nos danos causados às células e que assegurem longevidade *in vitro* e *in vivo*, a saber, tais como, a taxa da diluição adequada, os diluentes, as substâncias crioprotetoras, as taxas adequadas de resfriamento (FASTAD, 1996) e a manutenção em temperaturas específicas que reduzam o metabolismo, minimizem os

danos na membrana e não desencadeiem prematuramente a reação acrossômica (LOOMIS, 1992).

3.5 - CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN

A conservação de células vivas fora do organismo foi considerada por longo período como um obstáculo para o desenvolvimento de pesquisas (WATSON, 2000). Desde que os primeiros espermatozóides caprinos foram congelados por Smith e Polge (1950), inúmeras pesquisas têm sido realizadas visando estabelecer protocolos de resfriamento e congelação do sêmen. Mascarenhas (1994) e Leboeuf et al. (2000) afirmam que o futuro da I.A. depende do sucesso da criopreservação do sêmen, sendo necessários mais estudos para melhorar os meios e as técnicas de criopreservação dos espermatozóides em diferentes espécies, como é o caso dos caprinos e ovinos.

A criopreservação de sêmen diminui a taxa de fertilização, quando comparado com o sêmen fresco e resfriado (SALAMON; MAXWELL, 2000), contudo as espécies que apresentam estacionalidade reprodutiva a utilização do sêmen em estado fresco ou resfriado, pode ficar limitada, a determinados períodos do ano. Já o sêmen criopreservado preserva-se por um período de tempo indefinido, se mantido em nitrogênio líquido à temperatura de -196°C, e é de maior aplicabilidade, quando comparado ao sêmen resfriado (NUNES et al., 1997; TRALDI, 2006).

A criopreservação do sêmen proporciona uma economia para o produtor ao reduzir custos com alimentação e transporte dos reprodutores, bem como riscos de transmissão de doenças sexualmente transmissíveis (CASTELO et al., 2008). Entretanto, o processo de criopreservação é conhecido por gerar danos às células espermáticas, em particular às membranas. Em sêmen de ovinos têm-se observado que a criopreservação causa capacitação precoce após a descongelação (WATSON, 1995), e que mudanças na membrana do espermatozóide podem afetar a motilidade e encurtar a vida das células, reduzindo ou incapacitando a fertilização (TILBURG et al., 2008).

Segundo Salamon e Maxwell (2000), apenas 20-30% dos espermatozóides permanecem biologicamente não danificados após o processo de congelação e descongelação. O dano ultraestrutural durante esse processo é acompanhado por mudanças bioquímicas ou diminuição do seu conteúdo vital. Watson (1995) afirma que as características de motilidade

dos espermatozoides antes e depois da criopreservação tem sido comparada. Ollero et al. (1998) afirmam que a motilidade espermática não diminui tão drasticamente após a refrigeração do sêmen ovino, ficando em média 60% aos +5°C. Entretanto, em relação a congelação e descongelação, observou uma perda mais séria da motilidade levando a uma perda total da mesma.

O princípio básico da criopreservação é proteger as células contra os danos causados pela formação de gelo intracelular e pelo aumento da concentração de sais (efeito solução) que ocorrem durante a criopreservação e a descongelação (KASAI, 1996). Isto pode ser conseguido através da remoção da maior parte de água de dentro das células, para que não ocorra a formação de cristais; ou ainda a utilização de substâncias que impeçam que a célula desidrate excessivamente, que do mesmo modo, provoca injúrias as mesmas (VISINTIN, 2002).

O processo de criopreservação envolve basicamente as seguintes etapas: (1) adição de agente crioprotetor; (2) resfriamento e indução da formação de gelo; (3) congelação; (4) estocagem em nitrogênio líquido; (5) descongelação ou aquecimento e (6) remoção ou diluição do agente crioprotetor (LIMA, 2008; SANTOS et al., 2008).

3.5.1 - Crioprotetores

No caso de sêmen destinado à congelação, a adição de substâncias crioprotetoras aos diluidores é fundamental para a sobrevivência dos espermatozoides durante o processo. A utilização de diversos crioprotetores e suas combinações pode minimizar e controlar os efeitos deletérios na célula durante os processos de congelação e descongelação (ROSSI et al., 2003), protegendo as mesmas contra danos causados pela formação de cristais e pelas altas concentrações de soluto (BADALOTTI et al., 1997).

O mecanismo de ação dos crioprotetores baseia-se em: 1) Diminuir o ponto de congelação da solução, dando mais tempo para que as células desidratem o suficiente para impedir a formação de gelo intracelular; 2) Favorecer a interação e estabilização das membranas celulares tornando-as menos quebradiças durante as mudanças para estruturas sólidas (congelação), ou provavelmente mais importante ainda, quando agem permitindo que as células voltem ao seu estado fisiológico na descongelação; 3) Promover uma pequena retenção de água intracelular, evitando desidratação excessiva e aumento da concentração

eletrolítica no seu interior; 4) Produzir alterações das características de permeabilidade das membranas celulares, de tal forma que possam ocorrer alterações reversíveis em resposta às variações da pressão osmótica (BALL; VO, 2001; SANTOS et al., 2008). Contudo, agentes crioprotetores podem ser tóxicos, bem como podem facilitar a entrada de agentes tóxicos nas células (SANTOS, 2007).

Os procedimentos de diluição empregam diferentes crioprotetores, tais como o Dimetil-Sulfóxido (DMSO), Dimetil-Formamida, o Etilenoglicol (EG), o Glicerol (GLY), o Propanodiol (PRHO), entre outros, considerados intracelulares, por serem pequenas moléculas que penetram facilmente nas membranas celulares. Existe ainda, o grupo de agentes extracelulares, que são formados por substâncias compostas por grandes moléculas que, devido seu tamanho e polaridade não penetram nas células, sendo representados pelos açúcares, como a Sacarose, a Rafinose, a Trealose e a Glicose, podendo ser ainda proteínas e lipoproteínas, como a Gema do ovo, o Leite, a Albumina Sérica Bovina (BSA) e o Polivinilpirrolidona (PVP), assim como o Ficoll, que é um polímero sintético não iônico da Sacarose (KULESHOVA et al., 1999; HOLT, 2000). O GLY é o agente crioprotetor que possui grande capacidade de penetrar através das membranas celulares, conferindo as mesmas proteção contra efeitos deletérios durante o processo de congelação (MURGAS et al, 2007). Entretanto, seu efeito tóxico tem sido relatado para o sêmen equino, bovino e ovino, conforme a concentração (ALVARENGA et al., 2000). Na prática, diversos crioprotetores vêm sendo adaptados e estudados para um melhor resultado (DOBRINSKY, 2002).

O agente crioprotetor mais utilizado é o GLY, sua proteção se deve às propriedades coligativas e a união com as moléculas de água. O período de equilíbrio que ocorre durante o resfriamento permite que o GLY penetre na célula e estabeleça um equilíbrio entre as concentrações intra e extra-celulares (SALAMON; MAXWELL, 2000). O GLY evita a formação de cristais de água intracelular, pois sendo permeável, atravessa rapidamente a membrana citoplasmática do espermatozóide. A sua proteção deve-se a união com as moléculas de água, diminuindo em tamanho e em número os cristais de gelo. O GLY diminui, também o grau de dissociação de eletrólitos reduzindo a pressão osmótica do meio congelado (WOLFE; BRYANT, 2001).

A exposição a baixas temperaturas induz danos na organização dos lipídios de membrana (fase de transição), modificando as propriedades cinéticas de suas enzimas. O GLY interage com os lipídios de membrana alterando a fluidez da membrana, ao se intercalar na bicamada lipídica evitando algumas das fases de transição durante o resfriamento

(BAILEY et al., 2000). Por outro lado, o GLY induz fenômenos indesejáveis como alterações na integridade estrutural e bioquímica da membrana citoplasmática, como a aceleração da reação acrossômica (SALAMON; MAXWELL, 2000).

A concentração de GLY depende da composição e pressão osmótica do diluidor, e da concentração de Gema de Ovo, uma vez que esta reduz a concentração necessária de GLY (BAILEY et al., 2000). Entretanto, devido sua ação tóxica, reduziu-se sua concentração para a congelamento de sêmen ovino a 4-8% (AISEN, 2008).

O EG é um crioprotetor utilizado em protocolos de criopreservação de sêmen nas espécies domésticas, devido ao seu baixo peso molecular e baixa toxicidade (MARTINEZ; MATKOVIC, 1998). Moraes et al. (1998) afirmam que o EG é um crioprotetor que quando utilizado na concentração de 1,5% e 2,0% mostrou-se semelhante ao glicerol (3,5%) para a congelamento do sêmen ovino.

Em caprinos, Silva et al. (2006) demonstraram que não houve benefícios na criopreservação de sêmen utilizando a Dimetil-Formamida (DMSO) isolada ou associada ao GLY. Entretanto, Kundu et al. (2001) afirmam que a associação do GLY com o DMSO apresentou resultados positivos na criopreservação do sêmen desses animais. Kundu et al., (2002) reportaram a associação de um polímero Dextran ao GLY e ao DMSO e observaram um incremento na motilidade do sêmen caprino epididimário após a criopreservação.

O DMSO é um crioprotetor que penetra rapidamente na membrana plasmática. Entretanto, apresenta como inconveniente a capacidade de causar alterações na membrana, as quais danificam e inviabilizam as células, tornando os crioprotetores penetrantes geralmente tóxicos para as células (WOLFE; BRYANT, 2001). Segundo Melo (2003) tanto isoladamente quanto em associação com o GLY, o DMSO aumenta a motilidade espermática pós-descongelamento em amostras de sêmen ovino, bovino e canino.

Os efeitos benéficos da suplementação de açúcares nos diluentes sob a viabilidade pós-descongelamento dos espermatozoides de mamíferos têm sido descritos em muitos estudos. Além de atuarem como crioprotetores, mantêm a pressão osmótica do diluente (RIGAU et al., 2002). Esta ação crioprotetora ocorre devido às interações, envolvendo ligações de hidrogênio dos grupos hidroxil dos açúcares com os grupos fosfato localizados na cabeça dos fosfolipídios, podendo prevenir os danos causados pela desidratação extrema que pode ocorrer na congelamento (DE LEEUW et al., 1993).

Os açúcares, tais como a Sacarose, a Rafinose, a Trealose e a Glicose fornecem substrato energético, mantêm a pressão osmótica do diluidor e atuam como crioprotetores (HIGASHIYAMA, 2002; YAMASHIRO et al., 2007).

A Trealose é um dissacarídeo da Glicose, que vem sendo incorporada aos diluentes e que protege as células contra vários estresses, tais como a desidratação, congelação e pressão osmótica, desenvolvendo um papel chave ao dar estabilidade à membrana citoplasmática e outras macromoléculas durante condições ambientais extremas (ESPINOSA et al., 2006). Segundo Berlinguer et al. (2007), as propriedades protetoras da Trealose foram mais do que evidenciadas na manutenção da capacidade de congelamento do espermatozóide *in vitro*, que é considerado como um ponto crucial na avaliação do procedimento de congelamento. Aisen et al. (2002) afirmam que a concentração de 100mOsmol/L de Trealose no meio diluidor apresenta melhores índices de viabilidade *in vitro* e fertilidade *in vivo* em ovinos.

Terada e Aboagla (2004) utilizando um diluente à base de Trealose e Gema de Ovo para a criopreservação do sêmen de ovinos verificaram após a descongelação, motilidade espermática de 73%, enquanto o resultado para TRIS-Citrato-Gema foi de 59%. Porém, mais estudos ainda são necessários para avaliar os benefícios da utilização deste açúcar. Segundo Molina (1994) em diluentes sem GLY, a motilidade espermática do carneiro foi maior na presença de Trealose do que na de Glicose, indicando um efeito crioprotetor do dissacarídeo.

Valente et al. (2007) realizaram um estudo comparativo entre dois diluidores utilizados no sêmen ovino: EZN, composto por 4,4% TRIS + 7% GLY + 16,2% Gema de Ovo e Aisen, composto por 2,7% TRIS + 3% GLY + 5% Gema de Ovo + 3,8% Trealose. Inicialmente foram avaliados os parâmetros seminais antes e depois da congelação, e observou-se que o diluidor EZN obteve valores superiores de motilidade individual após descongelação (46,50% e 38,89%), para o teste de termorresistência (47,86% e 39,08%) e de endosmose positiva (40,57% e 32,14%). No entanto, a vitalidade foi superior com o diluidor Aisen (66,54 e 59,75%). Posteriormente, avaliou-se a capacidade fertilizante do sêmen após a descongelação e *swim-up*, observando-se que a motilidade individual pré-*swim-up* (57,88% e 42,08%) e pós-*swim-up* (67,92% e 56,67%) *swim-up*, a taxa de clivagem (57,15% e 33,50%) e de FIV (85,27% e 62,95%) foram superiores com o diluidor EZN. Os autores concluíram que o diluidor EZN tem uma ação crioprotetora superior ao diluidor Aisen, permitindo uma maior capacidade fertilizante dos espermatozoides após descongelação.

Goularte et al. (2008) compararam a diluição de sêmen ovino utilizando dois tratamentos: T1, com o diluente TRIS com inclusão de gema de ovo e glicerol; e T2, TRIS com inclusão de gema de ovo e trealose. Os mesmos autores observaram que não houve

diferença entre a integridade da membrana pré-congelação, da membrana pós-descongelação e do acrossoma pós-descongelação entre os tratamentos, sendo de 51,7%, 13,9% e 21,6% para T1, e de 48,0%, 14,9% e 20,7%, para T2, respectivamente.

Durante a criopreservação ocorre perda de lipídios de membrana (CHAKRABARTY et al., 2007), deste modo, aos diluentes são adicionados lipídios de diversas origens, como a Gema de ovo, o Leite, a Albumina Sérica Bovina (BSA) e o Polivinilpirrolidona (PVP) (PÉREZ-GARNELO et al., 2006). Entretanto, segundo Gil et al., (2003) a utilização de aditivos de origem animal como Gema de Ovo e Leite na diluição pode implicar em riscos sanitários, não apenas pela inclusão de agentes microbiológicos, mas também por contaminantes que podem comprometer a qualidade do produto.

Segundo Holt (2000) as modificações na estrutura lipídica e protéica da membrana plasmática que ocorrem durante a congelação e descongelação do sêmen ovino, promovem a capacitação e reação precoce do acrossoma. Por este motivo, estudos vêm sendo desenvolvidos com a utilização do plasma seminal. Trabalhos recentes mostraram que a utilização do plasma seminal melhora a viabilidade e heterogenicidade da membrana plasmática do sêmen de carneiro criopreservado (OLLERO et al., 1997), a adição do plasma seminal como solução de descongelação exerce efeito protetor sobre os espermatozóides não capacitados e previne a reação do acrossoma precoce no período pós-descongelação do sêmen ovino (ABAD et al., 2007; SILVA et al., 2005).

Silva (2007) realizando a diluição e congelação do sêmen ovino com TRIS-Gema de Ovo, e posteriormente analisando a influência da adição da Solução Salina Fosfatada (PBS) ou do plasma seminal na descongelação de sêmen ovino, observaram que as taxas de prenhez utilizando sêmen fresco/diluído com PBS, sêmen congelado/descongelado com PBS e sêmen congelado/descongelado com plasma seminal foram de 95,6%, 60,0% e 94,1%. O autor concluiu que o sêmen congelado/descongelado com plasma seminal obteve índices de prenhez satisfatórios semelhantes ao sêmen fresco.

No sêmen de caprinos foi descrito em 1957, um problema relacionado ao efeito deletério do plasma seminal na viabilidade dos espermatozóides criopreservados com diluentes contendo Gema de Ovo e/ou Leite Desnatado (Leboeuf et al., 2000). Pellicer-Rubio et al. (1997) afirmam que uma fração glicoprotéica (SBUIII) do plasma seminal caprino, originada das glândulas bulbo-uretrais, interage com o diluente à base de Gema de Ovo e/ou Leite, provocando inibição da motilidade, ruptura do acrossoma e morte celular espermática. A SBUIII é responsável por hidrolisar triglicerídios de membrana plasmática e triglicerídios

no Leite desnatado, resultando em um ácido graxo, o ácido oléico, que é tóxico aos espermatozóides.

Leboeuf et al. (2000) e Purdy (2006) afirmam que o método convencional de superar as interações prejudiciais do plasma seminal e as proteínas da Gema de Ovo ou do Leite é diluir a amostra de sêmen caprino num diluente tamponado e, então, separar o plasma seminal do espermatozóide através de centrifugação a 550-950x g por 10 a 15 minutos. Entretanto, Roca et al. (2000) relataram que a remoção do plasma seminal em caprinos, pela lavagem do sêmen imediatamente após a colheita, aumentou a porcentagem de células vivas e sua motilidade durante conservação a 5°C em diluidores contendo Gema de Ovo ou Leite.

Entretanto, em 2001, Azerêdo et al. verificaram que a motilidade dos espermatozóides sofre aumento quando o plasma seminal está presente, e que a porcentagem de espermatozóides com membranas lesadas aumenta com a retirada do plasma seminal por centrifugação, sendo ainda, acentuada pela congelação e descongelação. Dessa forma, esses autores concluem que a remoção do plasma seminal seria prejudicial para a criopreservação de sêmen caprino. Viana et al. (2006) demonstraram a eficácia do diluidor TRIS-Gema de Ovo, sem a remoção do plasma seminal, frente ao diluidor à base de Leite desnatado-Glicose para a congelação do sêmen de caprinos, principalmente para os parâmetros motilidade, vigor, e patologias de acrossoma, contudo não houve diferença entre os diluidores quanto à patologia de cauda.

Um problema específico na criopreservação do sêmen ovino está relacionado a indução precoce da capacitação e reação acrossômica após a descongelação. Sabe-se que a criopreservação envolve uma interrupção artificial do processo fisiológico de capacitação espermática pós-ejaculação (TILBURG et al., 2008). Esta capacitação precoce está relacionada com a produção de radicais livres, oxidantes e espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ROS) e com a peroxidação lipídica que ocorrem durante o processo de criopreservação, o excesso de ROS também leva ao decréscimo da motilidade e da fertilidade (MAIA; BICUDO, 2009). O sistema antioxidante dos espermatozóides é de origem citoplasmática, e durante a espermiogênese a maioria do citoplasma é descartado, restando apenas uma pequena porção de agentes antioxidantes (BUCAK et al., 2007). Portanto, a adição de antioxidantes ao meio de congelação tem sido proposta para evitar tais eventos (AISEN et al. 2005).

Desta forma, a adição de antioxidantes aos meios de congelação e refrigeração do sêmen ovino ajuda a proteger o espermatozóide contra o dano induzido pelos radicais livres sobre sua motilidade, viabilidade, produção de energia e integridade do DNA, bem como a

interromper a reação em cadeia de peroxidação dos lipídios das membranas espermáticas, especialmente dos ácidos graxos insaturados (AISEN et al., 2001).

A geração excessiva de ROS leva à peroxidação lipídica das membranas dos espermatozóides, resultando numa perda de motilidade, viabilidade e fertilidade dos mesmos (BAILEY et al., 2000; MAIA; BICUDO, 2009). No carneiro, a peroxidação lipídica *in vitro* diminui drasticamente a reserva de oxigênio e a motilidade espermática, ao interagir com os microtúbulos do axonema (WHITE, 1993).

A proteção lipídica do GLY durante a desidratação é nula (AISEN, 2001), no entanto, a inclusão de antioxidantes com carácter crioprotetor permite o uso de concentrações de GLY mais baixas (SALAMON; MAXWELL, 2000).

O sistema antioxidante que compreende o Superóxido Dismutase e a Catalase tem sido descrito como agente defensor contra a peroxidação do sêmen, sendo importante na manutenção da viabilidade e integridade da membrana do espermatozóide (BUCAK et al., 2007).

Bucak et al. (2007) ao incluírem Trealose, Taurina, Cisteamina e Hialuronidase no diluidor de sêmen de carneiro obtiveram melhor motilidade pós-descongelamento e maior concentração de vitamina E, comparativamente ao diluidor base. A Vitamina E é considerada como o componente principal do sistema antioxidante do espermatozóide, e é um dos maiores protetores de membrana contra as espécies reativas de oxigênio e a peroxidação lipídica. Aisen et al. (2005) relataram que a adição de Trealose a um diluidor à base de Tris e Gema de Ovo forneceu proteção a membrana acrossômica de carneiros e também teve uma ação antioxidante. Segundo os resultados da pesquisa de Higashiyama (2002) a produção de enzima hidroperoxidase, produto inicial da reação de oxidação do ácido linoléico, é suprimida pela Trealose quando esta é adicionada à solução em estudo.

A estrutura das proteínas é alterada durante a congelamento devido à desidratação (HOLT; NORTH, 1994). A adição de aminoácidos nos diluentes baseia-se no seu efeito protetor intracelular não tóxico, que reduz o efeito desnaturante da condição hiperosmolar induzida pela desidratação celular durante a congelamento, ao alterar o seu estado de hidratação e da fase de transição (AISEN, 2001). A Glicina, a Betaína e a Prolina possuem propriedades crioprotetoras e estabilizadoras de membrana, no entanto apenas na presença do GLY e da Gema do Ovo (WATSON, 1995). Segundo Aisen (2001) a adição destes compostos melhora a motilidade pós-descongelamento, entretanto não a fertilidade. De acordo com Papa et al. (1993), a ação da Glicina ainda não está totalmente elucidada, mas sabe-se que esse aminoácido participa na síntese de enzimas antioxidantes (Glutadiona Peroxidase), inibindo a

formação de radicais livres e, conseqüentemente, protegendo a membrana celular da oxidação.

3.5.2 - Tempo de Equilíbrio (Resfriamento)

O tempo de equilíbrio é considerado o tempo total em que os espermatozoides são mantidos em contato com o crioprotetor e todos os demais componentes do diluidor, previamente à congelação (BITTENCOURT et al., 2006). Durante esse período, ocorre o equilíbrio osmótico entre o meio intracelular espermático e extracelular, formado por todos os componentes osmoticamente ativos presentes no meio diluidor (SALAMON; MAXWELL, 2000). Segundo Oettlé (1986), um apropriado período de equilíbrio, assim como adequadas taxas de diluição e resfriamento celular, são fatores fundamentais para a prevenção do surgimento de alterações espermáticas durante o processo de criopreservação, além do que, uma otimização dos processos iniciais de pré-congelação, pode aumentar os índices de viabilidade espermática pós-descongelação.

Sinha et al. (1992) analisaram o tempo de equilíbrio e obtiveram melhores resultados de motilidade espermática pós-descongelação do sêmen caprino, utilizando um período de 4 horas (h). Das e Rajkonvar (1995) observaram que o sêmen ovino mantido por um tempo de equilíbrio de 3h obteve melhores índices de motilidade (47,4%) pós-descongelação, em relação ao sêmen submetido a 1h de equilíbrio.

Bittencourt et al. (2006) analisando diferentes tempos de equilíbrio (1, 2, 3 e 4h) para a congelação sêmen caprino observaram que a motilidade espermática foi de 34,28%, 43,57%, 41,42% e 45,00%, respectivamente, concluindo que o tempo de equilíbrio de 4h foi o que obteve os melhores índices de viabilidade espermática pós-descongelação. Baruah et al. (2003) estudando também o período de equilíbrio para o sêmen caprino não verificaram diferenças significativas em relação às taxas de motilidade espermática e lesões acrossomais, para as amostras de sêmen equilibradas por 0, 5, 1 e 1,5h.

Gomes et al. (2009) observaram uma similaridade nos índices de motilidade progressiva (65%) pós-descongelação do sêmen ovino, sem a utilização de tempo de equilíbrio, bem como com um tempo de equilíbrio de 1h. Estes mesmos autores afirmam ser desnecessário a utilização de tempo de equilíbrio na temperatura de 5°C antes do início da

curva negativa de congelação, o que implica diretamente numa otimização do tempo disponibilizado durante todo o processo.

Carvalho et al. (2008) diluindo sêmen ovino com TRIS-Gema (TG), Leite-Gema (LG) e TRIS-Gema-Leite (TGL), e utilizando o tempo de equilíbrio de 2 e 14h, observaram que após 2h de equilíbrio a motilidade progressiva foi de 63,1%, 56,6% e 60,3%, respectivamente. Entretanto, após o tempo de equilíbrio de 14h a motilidade progressiva do sêmen diluído com LG (41,4%) foi inferior em relação ao TG (52,5%) e TGL (49,1%).

O resfriamento é um período crítico por vários motivos, sendo os principais o dano direto devido à formação de cristais de gelo intracelulares e o conseqüente aumento da concentração de sais (efeito solução) à medida que os cristais de gelo vão se formando. Neste período os espermatozóides são expostos à faixa de temperatura correspondente à temperatura de transição dos lipídios (ZERON et al., 1999), o que está associado a baixa viabilidade espermática após a congelação (VISINTIN et al., 2002; WATSON, 1995).

Atualmente tem se utilizado rápidas taxas de resfriamento entre 15 a 6°C/min, o que tem sido estabelecido empiricamente como responsável por melhores taxas de sobrevivência (WATSON, 2000). Watson (1995) propôs que a taxa ótima de resfriamento pode ser determinada segundo a sensibilidade do espermatozóide ao estresse osmótico. Acredita-se que o importante não seja a permeabilidade da água, mas sim a taxa de deslocamento da água requerido pela membrana para se adaptar à mudança de volume e isto pode afetar as ligações com o citoesqueleto.

Segundo Mies Filho (1987), o efeito brusco do frio provoca o enrolamento da cauda dos espermatozóides, além de fraturas nos envoltórios, devido à maior contração da bainha lipoprotéica em relação ao conteúdo celular, degeneração e/ou desprendimento do acrossoma, conseqüentemente perda de suas enzimas, lipoproteínas, potássio, fosfolipídios e ATP.

3.5.3 - Congelação

A criopreservação pode ser realizada por dois métodos básicos: congelação convencional ou vitrificação (BERTHELOT et al., 2003). No entanto, a congelação convencional tem a vantagem de usar baixas concentrações de crioprotetores, que estão associados a toxicidade química e choque osmótico, e de possuir um equilíbrio termodinâmico mais estável (WATSON, 2000; WALKER et al., 2006). A vitrificação utiliza

soluções mais concentradas de crioprotetores e alta velocidade de resfriamento, impedindo a formação de cristais de gelo intracelulares, devido uma passagem rápida das células pela temperatura crítica de criopreservação, sendo mais utilizada para embriões (MOREIRA DA SILVA; METELO, 2005). Entretanto, a criopreservação de sêmen tem sido preferencialmente realizada pelo processo de congelação convencional (ARAV et al., 2002), pois as elevadas concentrações de crioprotetores penetrantes necessárias para a vitrificação são extremamente tóxicas para os espermatozóides (WATSON, 1995; STACHECKI; COHEN, 2004).

Durante a congelação existem três patamares de temperaturas aos quais os espermatozóides são submetidos. A temperatura de resfriamento, que situa-se perto dos 0°C, e causa através da exposição contínua danos nas células de grande parte dos animais. Dos 0 aos -40°C encontra-se o intervalo da temperatura de congelamento, durante o qual ocorrem a maioria dos danos celulares (BYRNE et al., 2000). Por último, a temperatura criogênica (-196°C) à qual os efeitos bioquímicos e fisiológicos são praticamente nulos. Deste modo, se as células não sofreram danos durante o processo de resfriamento até à temperatura criogênica, a permanência a esta temperatura não irá causar alterações do estado celular. Visto que, a temperatura criogênica não é nociva (WOLFE; BRYANT, 2001).

Os protocolos de criopreservação de sêmen possuem limitações, e as taxas de sucesso variam entre espécies e até entre indivíduos da mesma espécie (WOODS et al., 2004). As diferenças inter-individuais para a criopreservação de espermatozóides são de carácter hereditário e não aleatório. Vários estudos sugerem que os espermatozóides de diferentes espécies necessitam de diferentes propriedades criobiológicas, tal como, diferenças nos graus de sensibilidade à manipulação, tolerância osmótica, e sensibilidade à fase de transição da membrana. Diferenças entre espécies relativas à sensibilidade ao resfriamento são atribuídas à variação da composição das membranas citoplasmáticas dos espermatozóides. Sendo os lipídios, os maiores componentes das membranas, são os mais afetados pela criopreservação (HOLT, 2000).

A formação de cristais de gelo intra e extracelular durante a congelação pode provocar danos às células espermáticas sendo as membranas, o citoesqueleto e a cromatina dessas células, as estruturas mais suscetíveis a essas injúrias (AMANN; PICKETT, 1987). Dentre as membranas espermáticas que podem ser afetadas, incluem-se a membrana plasmática, a membrana do acrossoma e a membrana mitocondrial (WATSON, 1995). Essas alterações podem ser irreversíveis, pois a organização e a quantidade de lipídios das membranas e de seus constituintes são alteradas após este procedimento, diminuindo drasticamente, afetando a capacidade de interação dos espermatozóides com os oócitos (BAILEY et al., 2000;

CHAKRABARTY et al., 2007). Bailey et al. (2000) afirmam que exames microscópicos demonstraram que a integridade da membrana espermática de ovinos é inevitavelmente afetada, em diferentes proporções, durante a criopreservação, além do que esta integridade exerce um papel fundamental na sobrevivência do espermatozóide no trato genital da fêmea e na manutenção de sua capacidade fertilizante.

Em ovinos, a integridade da membrana após a descongelação é drasticamente reduzida, mas os efeitos na redução da motilidade não ocorrem na mesma proporção. A análise simultânea da integridade da membrana e da motilidade revelaram a existência de uma grande população de espermatozóides com membrana lesada, porém móveis, após a descongelação (TONIETO, 2008).

3.5.4 ó Descongelação

O processo de descongelação parece ser tão deletério para a célula espermática quanto a congelação e os principais efeitos adversos são atribuídos a recristalização de microcristais do gelo intracelular (ACIPRESTE, 2006). A temperatura sob a qual se descongela uma amostra de sêmen influencia na viabilidade pós-descongelação do mesmo, sendo descritas alterações no movimento espermático e na integridade das membranas (PEÑA; LINDEFORSBERG, 2000a).

O processo de descongelação das amostras de sêmen é determinado pelo método de congelação usado (EVANS; MAXWELL, 1990). Em bovinos, o procedimento usual de descongelação é mergulhar as palhetas em água a 35°C por 20 a 30 segundos, quando se utiliza de palhetas de 0,25mL, ou 40 a 60 segundos para palhetas de 0,5mL, sendo que após a descongelação, o ideal é utilizar a dose de sêmen em no máximo de 15 minutos (BALL & PETERS, 2006).

Já nos ovinos, tradicionalmente, a descongelação a 37°C por 12-30 segundos, obtém resultados superiores do que quando descongeladas a 5°C por 2 minutos (PURDY, 2006). Ao se comparar a descongelação a 70°C por 7 segundos com o processo a 37°C por 2 minutos e 40°C por 20 segundos, o primeiro proporciona melhor motilidade progressiva espermática e integridade da membrana plasmática (TULI et al., 1991). Azerêdo et al., (2001) observaram

que amostras descongeladas a 70°C por 5 segundos apresentaram taxas de membranas intactas mais altas quando comparadas àquelas descongeladas a 35°C por 12 segundos.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

Cinco animais foram selecionados através de exame andrológico, onde todos apresentaram características espermáticas acima dos padrões mínimos, conforme estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA 1998).

Os animais foram submetidos a um manejo de semi-confinamento, recebendo água e sal mineral *ad libitum*, e alimentação à base de capim picado (Cameron), adicionado a 1,5 kg de farelo de milho e soja, duas vezes ao dia.

4.1 - COLHEITA DO SÊMEN

Foram utilizados cinco machos ovinos da raça Santa Inês, com idade entre 8 a 11 meses, criados em uma propriedade (Rancho Tabiha) localizada no município de Castanhal/PA, com localização geográfica a 1o 18' 17,9" de latitude (S) e 47o 56 ' 30,2" de longitude (W). O sêmen foi obtido através de vagina artificial adaptada a espécie ovina, sendo realizada 5 colheitas de cada animal.

4.2 - AVALIAÇÃO INICIAL DO SÊMEN

Após a colheita, o sêmen obtido foi mantido na propriedade em banho-maria numa temperatura de 37°C durante o tempo necessário para as avaliações macroscópica (cor, aspecto, odor e volume) e microscópica (turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática).

O turbilhonamento foi avaliado subjetivamente com aumento de 100x, sendo a motilidade e o vigor espermático avaliados também de forma subjetiva com objetiva de 200x em microscópio de contraste de fase¹, acoplado a uma placa aquecedora. A concentração espermática foi avaliada utilizando-se um Espectrofotômetro², através da diluição de 40 µL de sêmen em 4 mL de solução fisiológica.

¹ NIKON ECPLISE E600

² MINI TUB

4.3 - PRÉ-DILUIÇÃO E DILUIÇÃO

Inicialmente o sêmen foi pré-diluído em 3 diferentes soluções (Solução A - Anexo I) dos diluidores utilizados TES, TRIS e PBS, contendo substâncias tampões, fontes energéticas e antibióticos na proporção 1:1, em tubos de centrífuga de 15 mL, onde permaneceram por um período de 1h. Durante este período o sêmen foi transportado até o Laboratório de Processamento de Sêmen, localizado no município de Castanhal, na Central de Biotecnologia de Reprodução Animal - CEBRAN/UFPA, em caixas isotérmicas com a temperatura em torno de 25-26°C.

Transcorrido o tempo de 1h da pré-diluição, as amostras foram submetidas no Laboratório, a diluição final com a Solução A acrescida de crioprotetores (Anexo I), sendo posteriormente submetidas a avaliação microscópica (vigor, motilidade e morfologia espermática). É importante ressaltar que o diluente TES empregado no presente estudo é o destinado a criopreservação de sêmen bubalino e bovino, e o TRIS é o diluente citado por Aisen (2008) para a diluição de sêmen ovino.

A morfologia espermática foi avaliada pelo método da Câmara Úmida, com uma alíquota de 10 µL de sêmen diluído em formol salino tamponado, através de microscópio de contraste de fase³ (400x), sendo contando um total de 100 células, para a determinação do percentual de patologias espermáticas.

4.4 - CONGELAÇÃO DO SÊMEN

Após a diluição final, para que a concentração da dose fosse 100×10^6 espermatozoides/ml, foi realizada nova avaliação microscópica e o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 ml, previamente identificadas (diluente, tempo de equilíbrio e animal), e então submetidas ao processo de congelação propriamente dito.

Inicialmente as doses permaneceram por diferentes tempos de equilíbrio (4h, 8h e 12h) em refrigeração a uma temperatura de 5°C, dispostas horizontalmente em uma grade de alumínio.

³ NIKON ECLIPSE E400

Transcorrido o tempo de equilíbrio, as doses foram transferidas para outra grade de alumínio em uma caixa isotérmica contendo nitrogênio líquido a uma distância de 5 cm acima do nível de nitrogênio, onde permaneceram por 20 minutos, sendo posteriormente mergulhadas em nitrogênio líquido (-196°C), e armazenadas em botijões criogênicos.

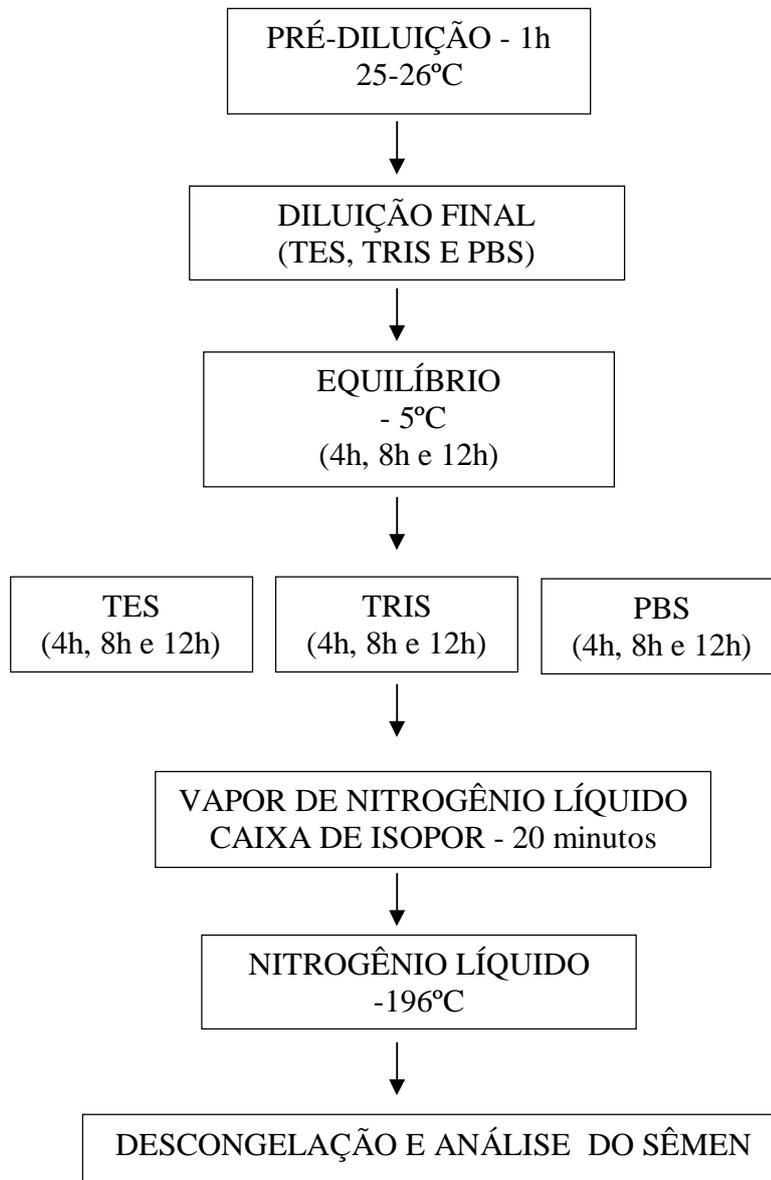
4.5 - DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN

Após alguns dias, as amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C durante 30 segundos, sendo em seguida avaliados o vigor e a motilidade espermática. Nas amostras também foi realizado o TTR (Teste de Termoresistência), onde as doses de sêmen foram submetidas a uma temperatura de 46°C por 30 minutos, e posteriormente avaliados a motilidade, o vigor e a integridade (desprendimento) do acrossoma, para que estas características estejam dentro dos padrões exigidos pelo CBRA para a espécie ovina. A integridade do acrossoma foi analisada após a retirada de uma alíquota do sêmen descongelado adicionado em 2 mL de Formol Salino Tamponado, sendo a avaliação desta solução feita sobre lâmina e lamínula contando-se 100 espermatozoides.

4.6 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento consistiu em avaliar a viabilidade e a qualidade do sêmen ovino diluído em TES[®] (Anexo I), TRIS[®] (Anexo I) e PBS[®] (Anexo I), submetido a diferentes tempos de equilíbrio (4hs, 8hs e 12hs) antes da congelação.

No estudo foram realizadas cinco repetições para cada um dos diluentes, sendo o experimento dividido em diferentes grupos: G-1 (TES-4hs, TES-8hs e TES-12hs), G-2 (TRIS-4hs, TRIS-8hs, TRIS-12hs) e G-3 (PBS-4hs, PBS-8hs e PBS-12hs).



4.7 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados foi utilizado o software BioEstat V 4.0 através dos parâmetros de estatística descritiva como média e desvio padrão, além do teste de análise de variância com uma entrada (one away), para determinação da interação entre as variáveis motilidade e vigor para o sêmen fresco e diluído, e motilidade, vigor e desprendimento do acrossoma para o sêmen criopreservado, estabelecendo-se 5% como nível de confiança ($p < 0,05$).

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na diluição realizada com TES, observou-se que a motilidade e o vigor foram estatisticamente similares ($p>0,05$) para o sêmen *in natura* (81,6% e 3,6) e diluído (80,4% e 4,4). No sêmen congelado observou-se que a motilidade para o tempo de equilíbrio de 8h (40,4%) diferiu estatisticamente ($p<0,05$) dos tempos de 4h (24,8%) e 12h (27,6%). O vigor pós-descongelamento com o TES não diferiu estatisticamente ($p>0,05$) entre os grupos de 4h (2,0), 8h (2,6) e 12h (2,3) (Tabela 1).

Tabela 1 - Motilidade e vigor do sêmen de ovino da raça Santa Inês, *in natura*, diluído e criopreservado com diluente TES em diferentes tempos de equilíbrio.

Tratamentos	Motilidade (%)	Vigor (1-5)
<i>In natura</i>	81,6 ± 8,5 ^a	3,6 ± 0,7 ^a
Diluído	80,4 ± 7,8 ^a	4,4 ± 5,3 ^a
Equilíbrio ó 4h	24,8 ± 18,7 ^b	2,8 ± 1,2 ^b
Equilíbrio ó 8h	40,4 ± 16,7 ^c	2,6 ± 0,6 ^b
Equilíbrio ó 12h	27,6 ± 14,5 ^b	2,3 ± 0,9 ^b

^{abc} Letras diferentes, na mesma coluna indicam diferença estatística ($p<0,05$)

Segundo Watson (2000) o resfriamento do sêmen, que ocorre durante o tempo de equilíbrio, contribui para a redução do metabolismo espermático, porém essa diminuição de forma abrupta, produz perda da viabilidade seminal. Esta afirmação pode ter relação com o tempo de equilíbrio de 8h ter se mostrado superior no presente estudo, uma vez que um tempo maior foi disponibilizado para o armazenamento do sêmen a 5°C, no entanto, este prolongamento do equilíbrio não foi eficiente para o grupo de 12h, provavelmente por este período ser maior e a constituição do diluente não ser suficiente para manter a viabilidade dos espermatozoides por um período mais prolongado. Entretanto, Gomes et al. (2009) estudando o sêmen caprino afirmam ser desnecessário a utilização de tempo de equilíbrio, o que implica diretamente numa otimização do tempo disponibilizado durante todo o processo, pois observaram uma similaridade nos índices de motilidade espermática (65%) pós-descongelamento, sem e com a utilização de tempo de equilíbrio de 1h. Porém, considerando-se a percentagem de espermatozoides móveis obtida no tempo de equilíbrio de 8h, pode-se

afirmar que este tempo é viável, uma vez que a motilidade encontrada está dentro do mínimo (40%) proposto pelo CBRA (1998) para o sêmen congelado. Estes resultados discordam de Das e Rajkonvar (1995) que afirmam que no tempo de equilíbrio de 3h obteve-se melhores índices de motilidade (47,4%) pós-descongelação. Sinha et al. (1992), analisando o sêmen caprino, observaram que no tempo de equilíbrio de 4h foi obtido melhor resultado de motilidade espermática pós-descongelação. Bittencourt et al. (2006) concordam com estes dados, pois ao analisarem diferentes tempos de equilíbrio (1, 2, 3 e 4h) para a congelação de sêmen caprino, observou que a motilidade espermática foi de 34,28%, 43,57%, 41,42% e 45,00%, respectivamente, concluindo também que o tempo de equilíbrio de 4h obteve melhores índices de viabilidade espermática pós-descongelação.

Após o TTR do sêmen congelado com TES não foi observado diferença estatística ($p>0,05$) para a motilidade em 4h (18,8%) e em 12h (17,4%) de equilíbrio, porém houve um aumento significativo desta em 8h (29,6%) ($p<0,05$). Em relação ao vigor e ao desprendimento do acrossoma não houve diferença estatística ($p>0,05$) em 4h (2,0 e 35,8%), 8h (2,1 e 33,4%) e 12h (1,8 e 42,2%) de equilíbrio (Tabela 2). Lima (2008) afirma que a importância do TTR está na avaliação da viabilidade espermática após a exposição a uma temperatura similar à do trato reprodutivo da fêmea. Segundo o CBRA (1998) a motilidade espermática após o TTR para sêmen ovino deve ser no mínimo de 30%, podendo a motilidade encontrada com o tempo de equilíbrio de 8h, ser considerado viável. Os índices de integridade do acrossoma encontrados nos diferentes tempos de equilíbrio também estão dentro do padrão do CBRA (1998). Baruah et al. (2003) estudando o tempo de equilíbrio para o sêmen caprino não verificaram diferenças significativas em relação às lesões acrossomais, para as amostras de sêmen equilibradas por 0, 1, 1,5 e 5h.

Tabela 2 - Motilidade, vigor e índice de desprendimento de acrossoma após o TTR do sêmen de ovino da raça santa Inês, congelado com TES, em diferentes tempos de equilíbrio.

Tratamentos	Motilidade (%)	Vigor (1-5)	Desprendimento do Acrossoma (%)
Equilíbrio - 4h	18,8 ± 15,3 ^a	2,0 ± 1,1 ^a	35,8 ± 15,2 ^a
Equilíbrio - 8h	29,6 ± 15,1 ^b	2,1 ± 1,1 ^a	33,4 ± 14,1 ^a
Equilíbrio - 12h	17,4 ± 14,6 ^a	1,8 ± 1,2 ^a	42,2 ± 13,6 ^a

^{ab} letras diferentes, na mesma coluna indicam diferença estatística ($p<0,05$)

Os resultados demonstraram que a congelação do sêmen com TES mostrou-se superior estatisticamente em comparação com o TRIS, o que discorda da literatura, uma vez que na mesma o diluente à base de TRIS tem sido o diluente mais utilizado na congelação de sêmen ovino. Ohashi (1993b) também observou na congelação de sêmen bubalino superioridade do diluente à base de TES em relação ao TRIS, onde após o TTR, a motilidade espermática do sêmen congelado com TRIS cessou com uma hora e meia após o início de teste, e com TES, a motilidade após cinco horas do TTR ainda era ao redor de 20%. Barnabé et al. (1995) também observaram índices superiores de gestação quando compararam a congelação do sêmen bubalino com TES (60%) e com TRIS (49,2%).

Quando foi utilizado o diluente TRIS, a motilidade e o vigor foram estatisticamente similares ($p>0,05$) para o sêmen fresco (81,6% e 3,6) e diluído (76,8% e 3,2), porém houve uma redução significativa destas médias ($p<0,05$) no sêmen congelado com equilíbrio de 4h (17,2% e 1,6), 8h (22,4% e 2,1) e 12h (14,8% e 1,6), que foram semelhantes entre si (Tabela 3)

Tabela 3 - Motilidade e vigor do sêmen de ovino da raça Santa Inês, *in natura*, diluído e criopreservado com diluente TRIS em diferentes tempos de equilíbrio.

Tratamentos	Motilidade (%)	Vigor (1-5)
Fresco	81,6 ± 8,5 ^a	3,6 ± 0,7 ^a
Diluído	76,8 ± 8,3 ^a	3,2 ± 0,6 ^a
Equilíbrio - 4h	17,2 ± 12,4 ^b	1,6 ± 1,0 ^b
Equilíbrio - 8h	22,4 ± 13,3 ^b	2,1 ± 1,0 ^b
Equilíbrio ó 12h	14,8 ± 9,6 ^b	1,6 ± 0,9 ^b

^{ab} letras diferentes, na mesma coluna indicam diferença estatística ($p<0,05$)

Esta redução brusca da qualidade do sêmen ovino quando se comparou sêmen fresco e congelado, independente do tempo de equilíbrio foi também observada por Donovan et al. (2004) que obtiveram resultados semelhantes, pois ao analisarem o sêmen ovino fresco e congelado com TRIS, observaram taxas de prenhez após a inseminação de 82% e 40%, respectivamente.

Segundo os padrões do CBRA (1998) o sêmen ovino descongelado é considerado apto se a amostra contiver no mínimo 40% de motilidade espermática, por este motivo observa-se que a motilidade do sêmen criopreservado em TRIS, não apresentou viabilidade, independente do tempo de equilíbrio empregado. Resultados superiores em relação ao TRIS

foram encontrados por Carvalho et al. (2008) quando compararam a diluição e a criopreservação do sêmen ovino com TRIS-Gema (TG), Leite-Gema (LG) e TRIS-Gema-Leite (TGL), e observaram que o diluente TG mostrou motilidade progressiva (46,5%) superior aos diluentes LG (26,1%) e TGL (32,1%) após a descongelação. Segundo Oliveira et al. (2009) o meio à base de TRIS promove maior proteção quanto às crioinjúrias em espermatozoides, devido a maior quantidade de Gema de Ovo. Este fato foi confirmado por Cavalcante (2008), quando comparando o sêmen ovino criopreservado em TRIS e em água de coco em pó (ACP-102), observou que após a descongelação o percentual de espermatozoides móveis foi de 62,8% e 40,3%, respectivamente. Segundo Valente et al. (2007) o sêmen ovino diluído com 4,4% TRIS + 7% GLY + 16,2% Gema de Ovo (EZN) e com 2,7% TRIS + 3% GLY + 5% Gema de Ovo + 3,8% Trealose (Aisen), apresentou motilidade individual após a descongelação de 46,5% e 38,8%, afirmando que a maior percentagem de TRIS presente no diluente EZN permite uma melhor capacidade fertilizante dos espermatozoides após a descongelação.

Após o TTR do sêmen congelado com TRIS não foi observado diferença estatística ($p>0,05$) para a motilidade e o vigor em 4h (10,4% e 1,1) e em 12h (10,0% e 1,2) de equilíbrio, porém houve um aumento na motilidade em 8h (15,6%) ($p<0,05$), sendo o vigor (1,6) semelhante estatisticamente aos outros 2 grupos ($p>0,05$). Ainda analisando este sêmen congelado em TRIS observou-se que não houve diferença estatística ($p>0,05$) no índice de desprendimento do acrossoma em 4h (35,1%) e em 12h (37,6%) de equilíbrio, havendo uma redução deste índice em 8h (30,4%) ($p<0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4 - Motilidade, vigor e índice de desprendimento de acrossoma após o TTR do sêmen de ovino da raça santa Inês, congelado com TRIS, em diferentes tempos de equilíbrio.

Tratamentos	Motilidade (%)	Vigor	Desprendimento do Acrossoma (%)
Equilíbrio ó 4h	10,4 ± 11,7 ^a	1,1 ± 1,0 ^b	35,1 ± 11,2 ^{aq}
Equilíbrio ó 8h	15,6 ± 11,73 ^b	1,6 ± 0,9 ^b	30,4 ± 11,2 ^b
Equilíbrio ó 12h	10,0 ± 8,6 ^a	1,2 ± 0,9 ^b	37,6 ± 8,1 ^a

^{ab} letras diferentes, na mesma coluna indicam diferença estatística ($p<0,05$)

Diante destes dados pode-se observar que o melhor tempo de equilíbrio para o sêmen ovino diluído com o TRIS utilizado neste experimento foi de 8h, pois apresentou melhor

motilidade e menor porcentagem de desprendimento do acrossoma. No entanto, de acordo com o CBRA (1998), a motilidade e o vigor após o TTR inferior a 30% e 2, respectivamente, não são considerados viáveis. Estes dados encontrados discordam de Valente et al. (2007) que diluindo o sêmen ovino com 4,4% TRIS + 7% GLY + 16,2% Gema de Ovo (EZN) e com 2,7% TRIS + 3% GLY + 5% Gema de Ovo + 3,8% Trealose (Aisen), observaram motilidade individual após o TTR de 47,8% e 39,0%, respectivamente. Oliveira et al. (2009) utilizando água de coco em pó (ACP-101) e TRIS, para a diluição e congelação de sêmen ovino, observaram que após 5 minutos de TTR não foi verificada alteração morfológica nos espermatozoides avaliados, porém, após 120 minutos, a maior quantidade de espermatozoides normais foi observada quando se utilizou o TRIS em comparação ao ACP-101, sendo respectivamente 54,7% e 48,6%. Carvalho et al. (2008) obtiveram também índices satisfatórios de acordo com os padrões de CBRA, quando diluíram o sêmen ovino com TRIS-Gema e observaram após 2 e 14h de equilíbrio motilidade progressiva de 63,1% e 52,5%, respectivamente.

Em relação a integridade do acrossoma os índices encontrados para os diferentes tempos de equilíbrio estão dentro do padrão do CBRA (1998), que considera apto o sêmen ovino congelado com até 70% de lesões acrossomáticas. Resultados similares foram encontrados por Carvalho et al. (2008) quando criopreservaram sêmen ovino com TRIS-Gema (TG), Leite-Gema (LG) e TRIS-Gema-Leite (TGL), e observaram que a porcentagem de espermatozoides com membrana acrossomal lesada após a descongelação não diferiu entre os diluentes TG (29,8%), LG (24,3%) e TGL (30,1%). Milczewski et al. (2000) discordam dos resultados, pois ao empregarem um tempo de equilíbrio de 8h, observaram que após o TTR o sêmen diluído com Tris-Gema (TG), ðCornell University Extenderö (CUE), ðCornell University 16ö (CU-16), Glicina-Gema (GG), Citrato-Gema (CG), Leite Desnatado UHT-Gema (LG), não houve diferença estatística quanto ao desprendimento do acrossoma entre os diluentes empregados, 5,1%, 4,7%, 5,8%, 5,7%, 6,1% e 4,9%, respectivamente. Goularte et al. (2008) utilizando para a diluição de sêmen ovino dois tratamentos: T1 (TRIS + Gema de Ovo + GLY) e T2 (TRIS + Gema de Ovo + Trealose), afirmam que não houve diferença na integridade da membrana do acrossoma pós-descongelação entre os tratamentos, sendo de 21,6% e 20,7%, afirmando que o TRIS exerce efeito positivo nas características pós-descongelação do sêmen ovino. Esta característica do TRIS também foi citada por Valente et al. (2007), que ao diluir sêmen ovino com 4,4% TRIS + 7% GLY + 16,2% Gema de Ovo (EZN) e com 2,7% TRIS + 3% GLY + 5% Gema de Ovo + 3,8% Trealose (Aisen), observou que o teste de endosmose positiva foi de 40,5% e 32,1%, respectivamente.

Na diluição com o PBS, a motilidade e o vigor foram estatisticamente similares ($p > 0,05$) para o sêmen fresco (84,0% e 3,6) e o sêmen diluído (82,0% e 3,4). Entretanto, após a descongelação do sêmen submetido ao tempo de equilíbrio de 4h, 8h e 12h, não foi verificada nenhuma motilidade espermática, que se deve provavelmente a necessidade da adição de tampões mais específicos para o sêmen ovino, tais com o TRIS e o TES.

6 6 CONCLUSÃO

O sêmen ovino da raça Santa Inês diluído com TES e submetido ao tempo de equilíbrio de 8 horas antes da congelação mostrou-se ser viável, com melhores índices de motilidade, vigor e integridade da acrossoma após a descongelação e o Teste de Termo Resistência (TTR).

O sêmen ovino quando diluído e criopreservado com TRIS e PBS apresentou índices não viáveis após a descongelação e o TTR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, M.; et al. Effect of sperm cryopreservation and supplementing semen doses with seminal plasma on the establishment of a sperm reservoir in gilts. **Reproduction Domestic Animal**, v.42, p.149-152, 2007.

ACIPRESTE, A.C. **Criopreservação de sêmen canino, utilizando associações de crioprotetores e dois protocolos de descongelamento**. 2006. 56p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 2006.

AGUIAR, P.R.L.; et al. Criopreservação de sêmen bovino utilizando diluente à base de PBS com três diferentes percentuais de gema de ovo. **Veterinária em Foco**, v.5, n.1, p.44-50, 2007.

AISEN, E.G. **Criopreservación de semen ovino: Efecto de diluyentes hipertônicos sobre la integridad espermática**. 2001.120 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade de Buenos Aires, 2001.

AISEN E.G.; et al. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. **Theriogenology**, v.57, n.7, p.1801-1808, 2002.

AISEN, E.; et al. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trealose based hypertonic extenders. **Cryobiology**, v.50, p.239-249, 2005.

AISEN, E.G. **Reprodução ovina e caprina**. 1. ed. São Paulo: MedVet, 2008. V.1. 203p.

AKOURKI, A.; et al. Effect of the extender supplement Equex-STM on cryopreserved semen in the Assaf sheep. **Cry Letters**, v.25, n.2, p.147-154, 2004.

AMANN, R.P.; et al. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal Equine Veterinary Science**, v.7, n.3, p.145-173, 1987.

AMANN, R.P.; et al. Principles of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-173, 1987.

ANDRADE, A.K.G. **Utilização do teste hiposmótico na avaliação de sêmen ovino refrigerado utilizando diluentes a base de Tris-gema e leite desnatado**. 2007. 32p. TCC.(Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Campina Grande. Patos. 2007.

ANEL, L.; et al. Improvement strategies in ovine artificial insemination. **Reproduction Domestic Animal**, v.2, p.30-42, 2006.

ANZAR, M. et al. Post-thaw membrane integrity of bull spermatozoa separated with a sephadex ion-exchange column. **Theriogenology**, v.47, p.845-856, 1997.

ARAV, A.; et al. New trends in gamete`s criopreservation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.187, p.77-81, 2002.

ARTIGA, C.G. Test de endosmose en ovino. In: JORNADAS INTERNACIONALES DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 7., 1994, Murcia -Espana. **Anais...** Murcia: Ponencias y Comunicaciones, 1994. P 77-81.

ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária e Zootecnia) - Universidade de São Paulo. São Paulo. 2000.

AZERÊDO, G.A.; et al. Evaluation of plasma membrane integrity of frozentawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. **Small Ruminant Research**, v. 41, p. 257-263, 2001.

BAILEY, J.L.; et al. Semen criopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v.21, n.1, p.1-7, 2000.

BAKER, S.S.; et al. Sperm membrane dynamics assessed by changes in lectin fluorescence before and after capacitation. **Journal of Andrology**, v.25, n.5, p.744-751, 2004.

BALL, B. A., et al. Effects of antioxidants on reservation of motility, viability and acrossomal integrity of equine spermatozoa during storage at 50° C. **Theriogenology**, v.56, p.577-89, 2001.

BALL, P.J.H.; et al. **Reprodução em bovinos**. 3. ed. São Paulo: Roca, p.118-133, 2006.

BARIL, G.; et al. **Manuel de formation pour Iónsemination artificielle chez les ovins et les caprins**. INRA. Nouzilly, 1993. 231p.

BARNABÉ, V.H.; et al. Inseminação artificial em bubalinos utilizando dois diluidores. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA EM MEDICINA VETERINÁRIA, 1., 1995, São Paulo ó SP. **Anais...**, São Paulo: Pesquisa em Medicina Veterinária, 1995. p.92.

BARUAH, C.K.; et al. Effect of glycerol equilibration periods on quality of frozen semen in Beetal x Assam local crossbred goats. **Indian Veterinary Journal**, v.80, n.8, p.763-765, 2003.

BEDFORD, J.B. Why do penetrating sperm create an olique path in the zona pellucida? **Reproduction**, v.131, p.23-25, 2006.

BERLINGUER, F., et al. Cryopreservation of European Mouflon (*Ovis Gmelini Musimon*) Semen During the non-Breeding Season is Enhanced by the Use of Trehalose. **Reproduction Domestic Animal**, v.42, p.2026207, 2007.

BILODEAU, J. F., et al. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v.56, p.275-86, 2001.

BICUDO, S.D.; et al. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p.120-127, 2003.

BETINI, C.M.; et al. Efeito da congelação vertical e horizontal na qualidade do sêmen caprino. **Acta Science**, v.20, p.361-365, 1998.

BITTENCOURT, R.F.; et al. O efeito do tempo de equilíbrio sobre a qualidade do sêmen caprino criopreservado. **Revista Brasileira Saúde e Produção Animal**, v.7, n.1, p. 27-37, 2006.

BLUME, H.; et al. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.18, p.97-104, 1994.

BOUCHARD, G.F., et al. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility. **Theriogenology**, v.34, p.147-157, 1990.

BUCAK, M.N.; et al. The influence of trealose, taurine cysteamine and hyaluronidase on ram semen parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**, v.67, p.1060-1067, 2007.

CABRITA, E.; et al. The hypoosmotic swelling test performed with coulter counter: a method to assay functional integrity of sperm membrane in rainbow trout. **Animal Reproduction Science**, v.55, p.279-287, 1999.

CARVALHO, F.P.; et al. Diferentes diluentes sobre a motilidade e integridade de membrana plasmática após o congelamento e descongelamento de sêmen ovino. **Revista Brasileira Saúde e Produção Animal**, v.9, n.3, p.612-620, 2008.

CASTELO, T.S.; et al. Considerations on goat semen cryopreservation. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, n.3, p.67-75, 2008.

CAVALCANTE, J.M. **Avaliação do sêmen ovino diluído e congelado em meio à base de água de coco em pó (ACP-102c) ou Tris**. 2008. 89p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) ó Universidade Estadual do Ceará. Ceará. 2008.

CENSYRA, J.C. Valoracion laboratorial de la calidad seminal. Correlacion com la fertilidad. In: PROCEEDINGS DE LAS JORNADAS INTERNACIONALES DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 7., 1994, Murcia-Espana. **Anaisí Murcia: Ponencias y Comunicaciones**, 1994. P 61-69.

CHAKRABARTY J., et al. Shedding off specific constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. **Cryobiology**, v.54, p.27-35, 2007.

CHOE, C.Y.; et al. Influence of seasons, extenders, slow and rapid freezing on seminal characters in Korean native bucks. **Reproduction Domestic Animal**, v.41, p.55-60, 2006.

COETZEE, K.; et al. Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. **Human Reproduction Update**, v.4, n.1, p.73-82, 1998.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). **Manual de exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. 1998. 53p.

CORREA, J.R.; et al. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. **Theriogenology**, v.42, p.351-360, 1994.

CORTÉS, S.; et al. Capacidad de reaccion a endosmosis del espermatozoide de macho cabrio. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 5., 1993, Luso- Portugal. **Anais... Luso: Comunicações livres**, 1993. p. 225-229.

CRUZ, J. F. **Conservação e fertilidade do sêmen ovino mantido à temperatura de +4°C por um período de 48 horas diluído em frações ativas da água de coco.**1994. 121p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinária) - Universidade Estadual do Ceará. Ceará. 1994.

CUNHA, I.C.N. **Criopreservação do sêmen de cães.** Universidade Estadual Paulista. 2002. 149p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista. Botucatu. 2002.

CUNHA, I.C.N.; et al. Estudo do processo de refrigeração do sêmen canino utilizando-se diluidores a base de leite e glicina-gema. **Revista Educação Continuada**, v.3, p.37-42, 2000.

DAS, K. K.; et al. Effects of equilibration periods on the motility of frozen buck semen in raffinose egg yolk glycerol extender. **Indian Journal of Animal Research**, v.29, n.2, p.141-144, 1995.

DAAS, N. Laboratory assessment of semen characteristics. **Animal Reproduction Science**, v.28, n.1, p.87-94, 1992.

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

DAVIS, I.S., et al. Livability of bovine spermatozoa at 50, -25 e 85°C in Tris-buffered and citrate-buffered yolk glycerol extenders. **Journal of Dairy Science**, v.46, p.333-336, 1963.

DE LEEUW, F. E., et al. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. **Criobiology**, v.30, p.32-44, 1993.

DENVIREDDY, R.V.; et al. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined used differential scanning calorimetry. **Biology of Reproduction**, v.66, p.222-231, 2002.

DIDION, B.A.; et al. Staining procedure to detect viability and the true acrossome reaction inspermatozoa of various species. **Gamet Research**, v.22, p.51-57, 1989.

DONOVAN, A.; et al. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozenóthawed semen at a natural or synchronised oestrus. **Animal Reproduction Science**, v.84, p.359-368, 2004.

DORADO J., et al. Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two based extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. **Theriogenology**, v.68, p.168-177, 2007a.

ENGLAND, G. C. W., et al. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooledrewarmed dog semen. **Theriogenology**, v.46, p.165-171, 1996.

ENGLAND, G.C.W. Cryopresevation of dog semen: a review. **Journal Reproduction Fertility**, v.47, p.243-255, 1993.

ESPESCHIT, C. J. B. Alternativas para controle da estacionalidade reprodutiva de cabras leiteiras. In: ENCONTRO NACIONAL PARA O DESENVOLVIMENTO DA ESPÉCIE CAPRINA, 1.,1998, Botucatu- SP. **Anais** Botucatu: Departamento de Zootecnia, 1998. p.7-33.

EVANS, G. Current topics in artificial insemination of sheep. **Australian Journal Biology Science**, v.41, p.103-116, 1988.

EVANS, G.; et al. **Inseminación Artificial de Ovejas y Cabras**. 4. Ed. Zaragoza: Editorial ACRIBIA. 1990. p.143-165.

FERRARI, S. **Dois tipos de diluidores e dois métodos de congelamento de sêmen de caprinos**. 1993. 74 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária e Zootecnia) - Universidade de São Paulo. Botucatu. 1993.

FERREIRA, G.M.B.C.; et al. Teste de Endosmose (Host) em sêmen de caprinos da raça serrana. In: CONGRESSO IBÉRICO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 3., 2001, Vale de Santarém-Portugal. **Anais...**Vale de Santarém: Federação Ibérica de Reprodução Animal, 2001. p.559-564.

FIGUEIRÊDO, E.L. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* do sêmen ovino resfriado em diluidores à base de água de coco no Estado do Ceará**. 2006. 61p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará. Ceará. 2006.

FONSECA, J. F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia ó GO. **Anais...** Goiânia: Reprodução Animal, 2005. p.1-9.

FOOTE, R.H. Extenders for freezing dog semen. **American Journal Veterinary Research**, v.25, p.37-40, 1964.

FOOTE, R.H. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. **Animal Reproduction Science**, v.75, p.119-139, 2003.

GATTI, J.L.; et al. Post-testicular sperm environment and fertility. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.321-339, 2004.

GIBBONS, A. Inseminacion artificial con semen congelado en cabras da raza angora. **Revista Taurus**, v.4, n.16, p.24-32, 2002.

GIL, J.L.; et al. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. **Theriogenology**, v.59, p.1241-1255, 2003.

GILBERT, S.F. **Fertilization: Beginning a new organism in Developmental Biology**. 7th edition. Massachusetts: Sinauer Associates. 2003.783p.

GILLAN, L.; et al. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. **Reproduction Fertility and Development**, v.16, p.447-454, 2004.

GOMES, P.L.N.E.S.; et al. Avaliação da necessidade do tempo de equilíbrio no congelamento de sêmen caprino. In: Congresso Brasileiro de Buiatria, 8., 2009, Belo Horizonte-MG. **Anais...** Belo Horizonte: Buiatri, 2009. P. 847-852.

GOULARTE, K.L.; et al. Avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal após criopreservação de sêmen ovino utilizando trealose como diluidor. In: XVII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 17., 2008, Pelotas- RS. **Anais...** Iniciação Científica, 2008. CD-ROOM.

GRAHAM, J.K.; et al. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v.64, p.492-504, 2005.

GRANADOS, L.B.C.; et al. **Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos**. 1º ed. 2006. Disponível em.< <http://www.caprtec.com.br/pdf/reproducaodeovinoscaprinos.pdf>>. Acesso em: 24.jan.2010.

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

HAFEZ, E.S.E. **Reproduction in Farm Animals**. 6. ed. Philadelphia. Lea & Febiger.1993. 513p.

HAFEZ, E.S.E.; et al. **Reprodução Animal**. 7 ed. São Paulo: Manole. 2004. 513p.

HINKOVSKA-GALCHEVA, V.; et al. Changes in the phospholipid composition and phospholipid assymetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. **Cryobiology**, v.26, p.70-75, 1989.

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

IBGE. Censo 2008. **Estatísticas sobre Pecuária, Rebanhoe Produção**. Disponível em: WWW.sidra.ibge.gov.br. Acesso em: 20 de dezembro de 2010.

JUNQUEIRA, L.C.; et al. **Aparelho Reprodutor Masculino. In: Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 540p.

KASAI, M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.67-75, 1996.

KAUL, G.; et al. Capacitation and acrosome reaction in Buffalo Bull spermatozoa assessed by chlortetracycline and Pisum sativum agglutinin fluorescence assay. **Theriogenology**, v.55, p.1457-1468, 2000.

KING, G.J. **Reproduction in Domesticated Animals**. Amsterdam, London, New York, Tokyo: Elsevier Science publishers.1993. 590p.

KUNDU, C.N.; et al. Effect of dextrans on cryopreservation of goat cauda epididymal spermatozoa using a chemically defined medium. **Animal Reproduction**, v.123, v.907-913, 2002.

KUNDU, C.N.; et al. Effect of amino acids on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. **Cryobiology**, v.41, p.21627, 2001.

LEBOEUF B.; et al. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.113-141, 2000.

LINDE-FORSBERG, C., et al. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozenthawed dog semen: a retrospective study. **Theriogenology**, v.52, p.11-23, 1999.

LIMA, L.F. **Influência de Sistemas de Refrigeração sobre a qualidade do sêmen ovino criopreservado em palhetas**. 2008. 53p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de Brasília. Brasília. 2008.

LIU, Z.; et al. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolality. **Cryobiology**, v.37, p.219-230, 1998.

LUZ, S.L.N.; et al. Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.37, p.136-140, 2000.

MACHADO, R. Inseminação artificial com sêmen congelado em caprinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.3, p.265-276, 1991.

MAIA, M.S.; et al. Efeito da adição de Lauril Sulfato de Sódio (OEP) ao diluidor na viabilidade do sêmen congelado de ovinos Santa Inês. **Veterinária e Zootecnia**, v.15, n.3, p.521-530, 2008.

MAIA, M.S.; et al. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, p.183-193, 2009.

MATSUOKA, T.; et al. Effects of bovine serum albumine and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram semen. **Journal of Reproduction and Development**, v.52, n.5, p.675-683, 2006.

MAXWELL, W.M.C.; et al. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.55-65, 1996.

MEARA, C.M.O., et al. Relationship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v.69, p.513-522, 2008.

MEDEIROS, B.F. **Avaliação de sêmen ovino refrigerado diluído em água de coco em pó**. 2008. 32p. TCC. (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande. 2008.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais**. 6.ed. Porto Alegre: Sulina, 1987. V.2. 750p.

MILCZEWSKI, V.; et al. Viability of ovine semen cooled in different extenders. **Archives of Veterinary Science**, v.5, p.29-33, 2000.

MILLER, D.J.; et al. Molecular Basis of Mammalian Gamete Binding. **The Endocrine Society**, v. 21, p.37-73, 2002.

MORAES, C.N.; et al. Criopreservação do sêmen ovino em pellets com etileno glicol. **Ciência Rural**, v.28, n.2, 1998.

MOREIRA DA SILVA, F.; et al. Relation between Physical Properties of the Zona Pellucida and Viability of Bovine Embryos after Slow-freezing and Vitrification. **Reproduction Domestic Animal**, v.40, p.205, 2005.

MORRIS, L.H.A.; et al. Relationship between the characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa and in vitro embryo production. **Reproduction, Fertility and Development**, v.13, p.193-201, 2001.

MURGAS, L.D.S.; et al. PEREIRA, G.J.M. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.3, 2007.

NUNES, J.F. A inseminação artificial como método alternativo para o melhoramento da caprinocultura leiteira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL,6.,1986, Belo Horizonte-MG. **Anais...**Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal,1986.p. 329-342.

NUNES, J.F., et al. Utilização da água de coco como diluente do sêmen de caprinos e ovinos. **Revista Científica de Produção Animal**, v.1, n.1, p.17-46, 1999.

NUNES, J.F.; et al. **Produção e reprodução de caprinos e ovinos**. 2.ed. Fortaleza: Gráfica LCR, 1997. 199p.

OETTLÉ, E. E. Changes in acrossome morphology during cooling and freezing of dog semen. **Animal Reproduction Science**, v.12, p.145-150, 1986.

OHASHI, Otávio M. Inseminação artificial em búfalos: aspectos gerais e perspectivas de sua utilização no Brasil. In: SAMARA, S. I. et al. **Sanidade e produtividade em búfalos**. Jaboticabal: FUNEP, 1993, p.111-120.

OLLERO, M.; et al. Surface changes of ram spermatozoa by absorption of homologous seminal plasma proteins revealed by partition in aqueous two-phase system. **Reproduction Fertility and Development**, v.9, p.381-397, 1997.

OLIVEIRA, R.V.; et al. Avaliação morfológica de espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) ou Tris, corados por eosina-nigrosina e azul de bromofenol. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.3, p.862-869, 2009.

PACHECO, A.; et al. Características seminais de carneiros da raça santa inês na pré- puberdade, puberdade e na pós-puberdade seminal **Ars Veterinaria**, v.25, n.2, p.090-099, 2009.

PAPA, F.O. et al. Glicina-Gema: Proposta de um novo diluidor para congelação de sêmen eqüino. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal, 2.,1993, Portugal. **Anais...Portugal: Reprodução Animal**,1993. p.174-179.

PAPADOPOULOS, S.; et al. In vitro fertilization as a predictor of fertility from cervical insemination in sheep. **Theriogenology**, v.63, p.150-159, 2005.

PEÑA, A.; et al. Effects of spermatozoa concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.54, p.703-718, 2000a.

PEÑA, A.I.; et al. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. **Theriogenology**, v.50, p.163-174, 1998b.

PÉREZ Y PÉREZ, F. **Riproduzione Animale: inseminazione artificiale e trapianto embrionale**. Padova: Piccin Nuova Libreria. 1994. 958p.

PICKETT, B.W.; et al. Cryopreservation of semen. In: MICKINNON A.O, VOSS, J.L. (Eds.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.769-789.

PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.63, n.3, p.215-225, 2006.

RIBEIRO, S.D.A., Caprinocultura: **Criação Racial de Caprinos**. 1. ed. São Paulo: Nobel, 1997. 318p.

RIGAU, T. et al. Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. **Reproduction**, v.123, p.579-591, 2002.

RIJSSELAERE, T.; et al. A. New techniques for the assessment of canine semen quality: a review. **Theriogenology**, v.64, p.706-719, 2005.

ROCA, J.; et al. Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15 °C. **Animal Reproduction Science**, v.64, p.103-112, 2000.

RODRIGUES, B.A. **Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina (BSA) sobre a viabilidade in vitro do sêmen canino criopreservado**. 1997. 176p. Dissertação. (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul. 1997.

RODRIGUES, B.A.; et al. Efeito da adição de diferentes concentrações de Albumina Sérica Bovina (BSA) ao diluidor à base de Tris sobre a viabilidade *in vitro* do sêmen canino criopreservado. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.26, n.2, 1998.

ROTA, A.; et al. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v.53, n.15, p.1415-1420, 2000.

ROTA, A., et al. Effect of skimmed milk in freezing extenders on the viability of canine spermatozoa after thawing. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.57, p.377-381, 2001.

SALAMON, S.; et al. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.77-111, 2000.

SALGUEIRO, C.C.M.; et al. Utilização de diferentes diluentes e métodos de congelamento do sêmen de bodes da raça Murciano-Granadina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.4, p.625-630, 2003.

SALVIANO, M.B.; et al. Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.3, p.159-167, 2008.

SÁNCHEZ-PARTIDA, L.G.; et al. Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. **Journal of Andrology**, v.20, n.2, p.280-288, 1999.

SANTOS, A.D.F; et al. Uso do teste hiposmótico (HOST) para avaliar a congelabilidade do sêmen de caprinos das raças Alpina e Saanen, jovens e adultos, submetidos ao manejo com luz artificial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, p.9-11, 2001.

SANTOS, I.W. **Albumina sérica bovina como fonte protéica do diluidor Tris (hidroximetil amino metano) para congelação do sêmen canino.** 2004. 63p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal. 2004.

SANTOS, R.R. **Cryopreservation of caprine ovarian tissue: recovery of gonadal function after auto-transplantation.** 2007 . 144f. Thesis (Doctorat) - Utrecht University, The Netherlands, 2007.

SANTOS, R.R.; et al. Cryopreservation of ovarian preantral follicles from domestic animals. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.1, p.9-15, 2008.

SILVA, A.F.; et al. Uso da dimetil-formamida associada ou não com glicerol na criopreservação de sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.2, p.452-456, 2006.

SILVA, A.R.; et al. Effect of Tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. **The Veterinary Journal**, v.164, p.244-246, 2002.

SILVA, L.D.M. Avanços da inseminação artificial na espécie canina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, p.107-111, 2001.

SILVA, L.D.M.; et al. Inseminação artificial em cães. In: Gonsalves, P.B.D. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal.** São Paulo: Varela, 2002. 69-95p.

SILVA, T.A.S.N. **Efeito do plasma seminal na descongelação do sêmen ovino avaliado in vitro e na inseminação artificial cervical.** 2007. 64p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade de Brasília. Brasília. 2007.

SIMPLÍCIO, A.A.; et al. Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.234-246, 2007.

SINHA, S.; et al. Study on freezing of goat semen in skim milk extender with different glycerol levels and equilibration periods. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.13, n.1, p.38-41, 1992.

SIRIVAIIDYAPONG, S., et al. Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. **Theriogenology**, v.53, p.789-802, 2000.

SOARES, A.T.; et al. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.3, n.2, p.53-63, 2009.

SOUSA, J.P.F., et al. Variação anual das características seminais em bodes da raça Serrana. In: CONGRESSO DE ZOOTECNIA, ¨PROGRESSOS ZOOTÉCNICOS NOS PAÍSES DE LÍNGUA PORTUGUESA10., 2000, Vale de Santarém-Portugal. **Anais...** Vale de Santarem: 2000. p. 87.

SOUZA, F.F. **Caracterização eletroforética do perfil protéico e análise bioquímica do plasma seminal canino**. 2003. 97p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) ó Universidade Estadual Paulista. Botucatu. 2003.

STACHECKI, J.J.; et al. Symposium: cryopreservation and assisted human conception. **Reproduction BioMed Online**, v.9, p.152-163, 2004.

TARTAGLIONE, C.M.; et al. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.62, p.1245-1252, 2004.

TALBOT, P.; et al. A triple-stain technique for evaluating normal acrossome reaction of human sperm. **Journal Zoology**, v.215, p.201-208, 1991.

TILBURG, M.F.; et al. Influência da insulina na congelabilidade do sêmen de ovino. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.3, p.731-739, 2008.

TONIETO, R.A. **Uso de diferentes crioprotetores em diluentes para sêmen ovino congelado**. 2008. 53p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Pelotas. Pelotas. 2008.

TRALDI, A. S. **Tópicos em reprodução e inseminação artificial em caprinos**. In: Manual Técnico. São Paulo, 1994. 54p.

TULI, R.K.; et al. Influence of thawing temperature on viability and release of glutamic oxaloacetic transaminase in frozen semen from Boer goats. **Animal Reproduction Science**, v.25, p.125ó131, 1991.

VALE, W.G.; et al.. Semen Freezing and artificial insemination in water buffalo in the Amazon Valley. **Buffalo Journal**,v.7,p.137-144,1991.

VALENTE, S.; et al. Criopreservação de sémen ovino: comparação entre dois diluidores. In: Simpósio da, 6.,2007, Évora- Portugal. **Anais...Évora: Sociedade Portuguesa de Reprodução Animal**, 2077. P. 78.

VAZQUEZ, J.M.; et al. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. **Theriogenology**, v.47, p.913-922, 1997.

VERSTEGEN, J.P.; et al. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Trisóglucose extender: in vitro and in vivo studies. **Theriogenology**, v.64, p.720-733, 2005.

VISINTIN, J.A.; et al. Cryopreservation of bos taurus vs bos indicus embryos: Are they really different? **Theriogenology**, v.57, p.345-359, 2002.

WABERSKI D., et al. Importance of sperm-binding assays for fertility prognosis of porcine spermatozoa. **Theriogenology**, v.63, p.470-484, 2005.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility and Development**, v.7, n.4, p.871-891, 1995.

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

WHITE, I.G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, v.5, p.639-658, 1993.

WOLFE, J.; et al. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, v.24, p.438-450, 2001.

ZERON, Y.; et al. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. **Cryobiology**, v.38, p.35- 42, 1999.

ANEXOS I**TES**

Solução A		Solução B	Diluyente TES
Pré- Diluição 500 ml			
TES	24,5g	Leite Desnatado 11g	Solução A 36,5 ml
TRIS	5,3g	Água Deionizada 100 ml	Solução B 36,5 ml
Frutose	1,08g		Glicerol 7 ml
Estreptomicina	700mg		Gema de Ovo 20 ml
Penicilina	70 mg		
Água Deionizada 500 ml			

TRIS

Solução A		Solução B	Diluyente TRS
Pré ó Diluição 100 ml			
TRIS	3, 876g	Leite Desnatado 11g	Solução A 84 ml
Ácido Cítrico	2,123g	Água Deionizada 100 ml	Glicerol 5,3 ml
Glicose	0,533g		Gema de Ovo 16 ml
Estreptomicina	100 mg		
Penicilina	100.0000 mg		
Água Deionizada 100 ml			

PBS

Solução A		Diluyente PBS
Pré ó Diluição 100 ml		100 ml
PBS (q.s.p.)	500 ml	Solução A 73 ml
Frutose	1,08g	Glicerol 7 ml
Estreptomicina	0,7 g	Gema de Ovo 20 ml
Penicilina	0,07g	