



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

GILSON FERREIRA DE ARAÚJO

**VIABILIDADE DA DOSE FRACIONADA DE SÊMEN
BOVINO CRIOPRESERVADO DESCONGELADA POR
DIFERENTES MÉTODOS.**

**Belém
2010**

GILSON FERREIRA DE ARAÚJO

**VIABILIDADE DA DOSE FRACIONADA DE SÊMEN
BOVINO CRIOPRESERVADO DESCONGELADA POR
DIFERENTES MÉTODOS.**

Trabalho apresentado ao programa de Pós-graduação
em Ciência Animal do Núcleo de Ciências Agrárias e
Desenvolvimento Rural da Universidade Federal do
Pará, para obtenção do grau de Mestre em Ciência
Animal

Área de concentração: Produção Animal.

Orientador Prof^o.: Dr. Haroldo Francisco Lobato
Ribeiro.

**Belém
2010**

GILSON FERREIRA DE ARAÚJO

**VIABILIDADE DA DOSE FRACIONADA DE SÊMEN
BOVINO CRIOPRESERVADO DESCONGELADA POR
DIFERENTES MÉTODOS.**

Trabalho apresentado ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal do Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural da Universidade Federal do Pará, para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal
Área de concentração: Produção Animal.

Data da aprovação. Belém - PA: 21/05/2010

Banca Examinadora

Prof. Dr. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro (Presidente)
Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA)

Prof. Dr. Jose Domingos Guimarães (Titular)
Universidade Federal de Viçosa (UFV)

Prof^a. Dr^a. Eliane V. Costa e Silva (Titular)
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

AGRADECIMENTOS

À Deus por iluminar e guiar nossos caminhos...

À Universidade Federal do Pará e as Instituições que juntas contribuem para oferecer este curso de Pós-graduação.

À Prof^a Dr^a. Sheyla Farhayldes Souza Domingues Coordenadora do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência Animal pelo empenho incansável no decorrer do Curso.

Ao Prof. Dr. Francisco Haroldo Lobato Ribeiro pela orientação, sugestões valiosas e apoio dedicado na elaboração deste trabalho.

Aos professores Aluizio Otávio, José de Sousa e Adriana Reis pela orientação competente, conhecimento transmitido, conselhos, críticas enfim pelo apoio e confiança depositada neste trabalho.

Aos colegas Alyson Sousa e Lucilene Monteiro pelas informações e auxílio sempre que foi necessário.

À minha esposa Marineide pelo estímulo, apoio e dicas que contribuíram para este trabalho.

O segredo de progredir é começar. O segredo de começar é dividir as tarefas árduas e complicadas em tarefas pequenas e fáceis de executar, e depois começar pela primeira.

Mark twain

RESUMO

Considerando a baixa concentração espermática necessária para promover a fecundação de oócitos na FIV, objetivou-se com este trabalho avaliar a qualidade da dose de sêmen bovino criopreservada após o seu fracionamento em duas partes visando um maior aproveitamento da mesma em programa de PIV. O experimento foi realizado utilizando 110 doses de sêmen congeladas em palhetas de 0,25 mL proveniente de 10 touros, que foram divididas em etapas: Uma dose representou o grupo controle, 5 foram destinadas para o grupo de descongelação direta (DD) e 5 para o grupo de descongelação indireta (DI). As doses foram fracionadas em duas partes, formando para cada grupo dois subgrupos, unidade da esfera (UE) e unidade do álcool polivinílico (UAP). O primeiro subgrupo teve análise imediata; e o segundo foi analisado após 24h de armazenamento em N₂. Os dados foram analisados por estatística descritiva, teste de Kruskal-Wallis e SNK (P < 0,05), apresentando motilidade e vigor: DI- imediata: 48,8% / 2,4; DI-24h: 54,2% / 2,5; DD-imediata: 67,8% / 3,0; DD-24h: 69,6% / 3,0; Controle: 70% / 3,0. Para lesão de acrossoma e integridade da membrana: DI- imediata: 24,3% / 40,5%; DI-24h: 36,2% / 44,3%; DD-imediata: 12,8% / 63,6%; DD-24h: 12,6% / 59,0%; controle: 11,9% / 57,5%. Média de concentração espermática: DI- imediata: $6,1 \times 10^6$ DI-24h: $7,2 \times 10^6$; DD- imediata: $8,2 \times 10^6$; DD-24h: $7,8 \times 10^6$ espermatozóide/fração de dose. Deste modo Para o fracionamento da dose de sêmen bovino criopreservado o melhor método de descongelação foi o direto, uma vez que apresentou os melhores resultados em todos os parâmetros analisados.

Palavras-chave: Fracionamento. Palhetas. Descongelação. Viabilidade. Sêmen. Bovinos.

ABSTRACT

Given the low sperm concentration necessary to promote the fertilization of oocytes in FIV, this paper aims at evaluating the quality of dose of bovine semen cryopreserved after its splitting into two parts to make better use of it on the PIV program. The experiment used 110 doses of frozen semen in pallets of 0.25 mL from 10 bulls, which were divided into stages: A dose represented the control group, five were assigned to the group of direct thawing (DT) and 5 for the group of indirect thawing (IT). Doses were fractionated into two parts, forming two subgroups for each group, the unit sphere (UE) and polyvinyl alcohol unit (PAU). The first subgroup analysis was immediate, and the second was analyzed after 24h storage in N₂. Results were obtained through descriptive statistics, Kruskal-Wallis and SNK (P <0.05), motility and force: immediate Indirect thawing: 48.8% / 2.4, IT-24: 54.2% / 2.5, immediate direct thawing: 67.8% / 3.0, direct thawing-24: 69.6% / 3.0, Control: 70% / 3.0. For acrosome injury and membrane integrity: immediate Indirect thawing: 24.3% / 40.5%, indirect thawing-24: 36.2% / 44.3%, immediate direct thawing: 12.8% / 63.6%, DT -24h: 12.6% / 59.0%, control: 11.9% / 57.5%. Average sperm concentration: DI-immediate: 6.1×10^6 DI-24: 7.2×10^6 , DD-immediate: 8.2×10^6 , DD-24: 7.8×10^6 sperm / dose fraction. Thus for the fractionation of the dose of bovine semen cryopreserved best thawing method was straightforward, since it showed the best results in all parameters.

Key words: Fractioning. Pallets. Thawing. Viability. Semen. Bovine.

LISTA DE SIGLAS

°C – Centígrados

CASA - computer assisted semen analysis

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal

CE – Concentração Espermática

CEBRAN – Central de Biotecnologia de Reprodução Animal

cm³ - Centímetro cúbico

CIV – Cultivo *In vitro*

CR – Concentração Relativa

CT – Concentração Total

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

DD – Descongelamento Direto

DD- imediato – Descongelamento direto imediato

DD-24h – Descongelamento direto após 24 horas

DI – Descongelamento Indireto

DI-24h – Descongelamento indireto após 24 horas

DI- imediato – Descongelamento indireto imediato

DP – Desvio Padrão

FIV - Fertilização *in vitro*

GC – Grupo Controle

IA – Integridade do Acrossoma

IM – Integridade da Membrana

LA – Lesão de Acrossoma

M – Motilidade

MIV – Maturação *in vitro*

MP - Membrana Plasmática

mm³ - Milímetros cúbico

mL – Mililitro

N₂ – Nitrogênio

OEP - Lauril Sulfato de Sódio

OPU - *Ovum Pick-up*

PIVE – Produção *In vitro*

SNK - Student-Newman-Keuls

SPSS - Statistical Package for the Social Sciences

SPTZ – Espermatozóide

TTR - Teste de Termo Resistência

TDM - Taxa de Degradação da Motilidade

TES - Ácido N-trishidroxmetil-metil-2-aminometanosulfônico

UAP - Unidade do Álcool Polivinílico

UE - Unidade da Esfera

V – Vigor

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	10
1.1-OBJETIVOS	11
1.1.2-Geral	11
1.1.3-Objetivos específicos	11
2-REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1-CARACTERÍSTICAS DOS ESPERMATOZÓIDES	12
2.1.1- Membrana plasmática dos espermatozóides	13
2.1.2- Membrana acrossômica dos espermatozóides	14
2.2-CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO	14
2.2.1-Eventos físicos da congelação/descongelação celular	16
2.2.2- Técnicas de descongelação do sêmen	18
2.2.3- Avaliação do sêmen pós-descongelação	19
2.4-CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA UTILIZADA NA FIV	20
3- MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1- LOCAL E ANIMAIS	21
3.2- PROCESSAMENTO DA DOSE DE SÊMEN	21
3.3-FRACIONAMENTO E ACONDICIONAMENTO DAS MINI-PALHETAS	22
3.4- DESCONGELAMENTO DAS AMOSTRAS E ANÁLISE SEMINAL	24
3.5- ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1- MOTILIDADE ESPERMÁTICA	29
4.2- VIGOR ESPERMÁTICO	30
4.3- AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO ACROSSOMA	31
4.4- AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA	32
4.5- CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA	32
5- CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35

1- INTRODUÇÃO

A importância do uso de tecnologias na bovinocultura brasileira está sendo cada vez mais reconhecida, principalmente no segmento de corte, com grande participação das raças zebuínas (*Bos taurus indicus*), como a raça Nelore, e também das raças taurinas (*Bos taurus taurus*) de origem europeia e seus cruzamentos. A perspectiva de retorno financeiro por meio da eficiência nos sistemas de produção pode ser intensificada com o uso de eficientes técnicas de manejo e biotecnologias aplicadas à reprodução animal (TORRES-JÚNIOR, 2009).

Inúmeras biotécnicas de reprodução vem sendo desenvolvidas na área de medicina veterinária, visando à melhoria da pecuária leiteira e de corte, pois auxiliam na identificação, seleção e multiplicação de animais geneticamente superiores (EMBRAPA, 2006). Uma das biotécnicas de reprodução animal que vem sendo cada vez mais utilizada comercialmente em bovinos do Brasil é a fertilização *in vitro* (FIV), principalmente em função do crescimento da demanda de oócitos (DAYAN et al., 2000) e da sua utilização como complemento para programas de Transferência de Embriões (DELL'AQUA et al., 2006).

Nos últimos quatro anos, o Brasil foi responsável por aproximadamente 50% da produção de embriões de bovinos proveniente da FIV, esse fato ocorreu devido à inversão na relação da produção embrionária, onde as transferências *in vitro* ultrapassaram as *in vivo*, o que coloca nosso país em destaque no mercado internacional. Esses números demonstram uma boa aceitação da técnica devido à rápida multiplicação da genética proporcionada pela mesma. Esta técnica, que sempre utiliza reprodutores de alto valor zootécnico, apresenta uma particularidade, a maximização do uso do sêmen, visto que poucos espermatozoides são necessários para promover a fecundação de vários oócitos (FABER et al., 2003; LIMA, 2006).

Segundo Saeki et al.(1995) e Gonçalves et al. (2008) a concentração média de espermatozoide zebuino utilizada na FIV varia de 1×10^6 a 2×10^6 /mL. Deste modo, considerando que a concentração espermática em palhetas de sêmen convencional varie de 20 - 40×10^6 de espermatozoides/dose (REICHENBACH et al., 2008) constata-se que, apenas de 5% a 10% da dose é aproveitada na FIV. Assim, quando uma dose de sêmen convencional é direcionada para tal procedimento, existe a possibilidade da

mesma não ser aproveitada por completo. Partindo desse princípio, este trabalho objetiva avaliar o fracionamento da doses de sêmen bovino criopreservada, após a sua exposição em dois diferentes métodos de descongelação, visando evitar a utilização de toda a dose de sêmen na FIV e reduzindo, dessa forma, o desperdício da mesma, bem como os custos com o emprego da técnica.

1.1- OBJETIVO

1.1.1- Geral

Avaliar a qualidade do sêmen bovino criopreservado após o seu fracionamento e descongelação.

1.1.2- Específicos

- Avaliar a viabilidade da dose de sêmen congelada dividida em duas partes utilizando técnicas que dispense a sua descongelação prévia;
- Analisar dois métodos de descongelação das frações do sêmen, através do contato direto e indireto das mesmas com água aquecida a 37°C;
- Verificar a viabilidade das frações da dose descongelada imediatamente após o corte e após 24 horas de armazenamento em nitrogênio líquido;
- Analisar a concentração espermática final das frações da dose descongelada visando sua utilização na PIV.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1- CARACTERÍSTICAS DOS ESPERMATOZÓIDES

O sêmen é um líquido contendo espermatozóides e secreções produzidas pelas glândulas anexas, testículo e epidídimo, conhecido como plasma seminal, cuja função é de suspensão e transporte dos espermatozóides através das vias espermáticas, além de fornecer os elementos essenciais para a sua manutenção e desempenho espermático (REICHENBACH et al.2008).

Os espermatozóides quando estão completamente desenvolvidos são estruturas alongadas, formadas por duas regiões altamente especializadas: a cabeça e a cauda ou flagelo. A cabeça apresenta forma achatada, na qual está contido o DNA (ácido desoxirribonucléico) com uma classe especial de proteínas conhecidas coletivamente como histonas espermáticas, e a região do acrossomo, vital para a interação espermatozóide-oócito. O flagelo é constituído pelo colo ou peça de conexão, a peça intermediária, a peça principal e peça terminal, os quais são envolvidos por uma mesma membrana, essa estrutura detém o aparelho necessário para a motilidade celular (HAFEZ, 1995).

O colo se ajusta dentro de uma depressão na superfície posterior da cabeça ligando-a a peça intermediária. Esta por sua vez, apresenta sua parte central formada por nove pares de microtúbulos envolvendo dois filamentos de axonema e circundado por nove fibras grossas, sendo recoberta externamente por mitocôndrias dispostas nas fibras longitudinais da cauda em forma de hélice, gerando energia para a motilidade espermática. A junção da peça intermediária com a peça principal é feita por um anel denso aderido a terminação abrupta da bainha fibrosa, sendo composta pelo axonema e associações de fibras grosseiras que se estende até a parte terminal da cauda. A peça terminal é constituída pelo axonema revestido pela membrana plasmática (BARTH; OKO, 1989; HAFEZ, 1995).

2.1.1- Membrana plasmática dos espermatozóides

Todas as células são delimitadas por uma membrana plasmática (MP), separando seu conteúdo do meio que a circunda. Por servir de barreira seletiva, a MP determina a composição do citoplasma celular, e tem papel fundamental na maioria dos fenômenos celulares (SINGER; NICOLSON, 1972). O modelo básico das membranas biológicas segue a organização estrutural de bicamada de fosfolípidos, colesterol, glicolípidos e diferentes tipos de proteínas associadas, conforme Singer e Nicolson descreveram em 1972. O mesmo modelo é também observado nas membranas espermáticas (WATSON, 1981), que embora seja contínua sobre a superfície dos espermatozóides a sua natureza difere regionalmente, sendo delimitada por demarcadores de superfície ou por diferenças nos componentes lipídicos (LADHA et al., 1997)

Os lipídios de membrana estão divididos em três classes principais: os fosfolípidos, glicolípidos e colesterol, sendo os fosfolípidos os mais abundantes (fosfatidilcolina, esfingomielina, fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina). Moléculas de fosfolípidos agrupam-se umas às outras de forma a afetar a fluidez da membrana. O conteúdo de colesterol também influencia a fluidez da membrana, pois este deixa a bicamada lipídica menos deformável e conseqüentemente diminui a permeabilidade da bicamada a pequenas moléculas hidrossolúveis (ALBERTS et al., 1997).

A orientação dos lipídios pode ser alterada por condições de resfriamento, o que pode afetar a estabilidade da membrana ou induzir a um rearranjo das moléculas formando pontos de fragilidade, permitindo permeabilidade excessiva ou ruptura da membrana (AMANN; GRAHAM, 1993). Danos nesta estrutura podem levar a perda da homeostase com posterior morte celular (AMANN; PICKETT, 1987). Portanto, a integridade da membrana plasmática exerce papel fundamental na sobrevivência do espermatozóide no trato genital da fêmea (PARKS; GRAHAM, 1992). Fatores externos às células espermáticas tais como PH, temperatura e osmolaridade do meio que as circundam, podem provocar alterações irreversíveis em suas membranas limitando a função fertilizante dos espermatozóides (WATSON, 2000).

2.1.2- Membrana acrossômica dos espermatozóides

A cabeça do espermatozóide, além do núcleo, contém no seu extremo apical uma estrutura chamada acrossoma, caracterizando-se com um capuz espesso, com uma fina cobertura com dupla camada de membranas formado a partir do aparelho de Golgi, (GUYTON; HALL, 1997). Essa estrutura tem sido citada como um lisossoma especializado, onde contém várias enzimas hidrolíticas como esterases, hidrolases ácidas, proacrosina e hialuronidase, responsáveis por dispersar e dissolver a corona radiata e a zona pelúcida do oócito para que ocorra o processo de fertilização (YANAGIMACHI, 1994; HAFEZ, 1995; CAMARGO et al.,2002).

A hialuronidase e proacrosina são as enzimas mais importantes na penetração dos oócitos, sendo a primeira, responsável pela expansão da camada intermediária das células do *cummulus oophorus*, e a segunda, está envolvida nos estágios iniciais da reação acrossômica, reconhecimento, ligação e/ou penetração dos espermatozóides à zona pelúcida. Deste modo a integridade do acrossoma espermático é de grande importância, uma vez que ele inicia a reação físico-química do processo de fertilização havendo, assim, uma correlação positiva entre a porcentagem de acrossomas intactos e a fertilidade (BARTH; OKO, 1989).

2.2- CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO

A necessidade de otimizar e preservar o material genético dos machos, fez com que os pesquisadores encontrassem biotecnologias para a reprodução que permitisse uma disseminação mais rápida do material genético dos machos (GONÇALVES et al, 2002). Polge et al., demonstraram em 1949, na Inglaterra, a função crioprotetora do Glicerol, sendo possível congelar o sêmen bovino (POLGE, 1985 apud GONÇALVES et al., 2008).

Apesar de vários crioprotetores, como o Glicerol, Dimetil Sulfóxido, Etileno Glicol e Propileno Glicol, assim como as combinações deles, serem utilizados para criopreservação dos espermatozóides, o Glicerol é utilizado com maior frequência

(LEBOEUF et al., 2000). Seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado, mas acredita-se que este atue reduzindo o ponto de solidificação da solução na congelação, promovendo um maior tempo para a desidratação da célula, diminuindo com isso, a formação de cristais de gelo intracelulares (MAZUR,1970; JONDET *et al.* 1984; BAUDOT et al., 2002).

A partir do ano de 1960 foram desenvolvidas inúmeras técnicas de congelação do sêmen em nitrogênio líquido (196°C), com base nos conhecimentos adquiridos em criobiologia (MAZUR, 2004). Estas importantes descobertas permitiram a conservação do sêmen individualmente em excelentes condições higiênicas por tempo indeterminado, o que permitiu a difusão da Inseminação Artificial (IA) e o incremento do comércio de sêmen (REICHENBACH et al., 2008)

Apesar dos efeitos benéficos do crioprotetor, não existe uma técnica de criopreservação celular que permita 100% de sobrevivência após a sua congelação e descongelação (FAHY, 1986). Esse procedimento ocasiona danos celulares devido à mudança na temperatura, formação de cristais de gelo, injúrias oxidativas, alterações na membrana do espermatozóide, lesões no DNA, estresse osmótico, além da toxicidade dos crioprotetores (BALL; VO, 2001). Em função disso cerca de 10 a 50% dos espermatozoides de um ejaculado não resistem a este processo (WATSON, 2000), sendo que outros fatores, como a qualidade do ejaculado, tipo de diluidor e tipo de envasamento (minipalheta, palheta média, ampolas, pellets), também podem estar envolvidos no aumento dos prejuízos às células, causando a morte celular (OHASHI; BARUSELLI, 2008).

A morte dos espermatozoides durante o processo de congelação ocorre como consequência das mudanças físico-químicas que se processam no meio diluidor e principalmente no próprio espermatozóide em razão de danos provocados em sua ultra-estrutura que inviabilizam sua sobrevivência (OHASHI; BARUSELLI, 2008). A própria refrigeração, quando efetuada de modo inadequado, causa choque térmico que induz a ocorrência de danos irreversíveis ao espermatozóide, que se caracterizam por padrão anormal de movimentação (movimento circular ou retrógrado), perda rápida da motilidade, lesões no acrossoma, danos à membrana plasmática, redução da atividade metabólica e perda dos componentes intracelulares (GRAHAM, 1996).

O início das injúrias das células espermáticas ocorre quando estas são submetidas á temperatura de refrigeração a 5°C (SQUIRES et al., 1999), devido à fase de transição da membrana plasmática do estado líquido cristalino para o estado de gel

(GRAHAM, 1996; MEDEIROS et al., 2002). Sob esta temperatura, a água intra e extracelular permanece super refrigerada, mas não cristaliza. No entanto, quando uma solução com crioprotetor alcança uma temperatura entre -5°C a -15°C , começa a formação de cristais de gelo e o aumento da concentração de soluto no meio extracelular, ocorrendo troca de água para manter o equilíbrio entre o meio extra e intracelular, ocasionando a desidratação da célula. Nessa fase da congelação as células espermáticas passam pela fase de maior desafio, o de suportar as mudanças ocorridas durante a fase intermediária de temperatura (-15°C a -60°C), pela qual passam por duas vezes, primeiro durante a congelação e depois durante a descongelação (MAZUR, 1984).

2.2.1- Eventos físicos da congelação/dcongelação celular

Os eventos físicos que ocorrem na célula dependem da velocidade de congelação. Quando este processo é muito lento ocorre a congelação da água extracelular com a conseqüente concentração de soluto, colocando a célula momentaneamente em um meio hipertônico e determinando perda rápida da água, pois esta se move através da membrana e se une a fase congelada do meio extracelular, ocorrendo desnaturação das macromoléculas e encolhimento excessivo da célula, bem como aumento da concentração de soluto intracelular, promovendo a morte da célula por desidratação. Por outro lado, quando a célula é congelada rapidamente, não há perda de água, promovendo, com isso, a formação de cristais de gelo intracelular (MAZUR, 1984; PICKETT; AMANN, 1993; OHASHI; BARUSELLI, 2008). Na maioria dos casos, as células submetidas à formação de cristais de gelo intracelular se tornam osmoticamente inativas ou lisadas devido à perda da integridade da membrana (DENVIREDDY et al., 2002). Segundo Salamon e Maxwell (1995), de uma motilidade de 40 a 60%, somente 20 a 30% dos espermatozoides permanecem biologicamente sem danos. outros autores reforçam que muitos espermatozoides lesionados permanecem móveis pela sua adequada produção de energia, mas nem sempre são férteis em função da perda de componentes importante para o processo de fertilização (VALCÁRCEL et al., 1994; SIQUEIRA, et al., 2007).

A criopreservação ideal deve, então, ter o compromisso de preservar o maior número de células possível por meio da manutenção da integridade de diferentes estruturas espermáticas. Assim as células espermáticas necessitam de uma curva de congelação adequada, onde se tenha um equilíbrio entre a congelação muito rápida e a muito lenta impedindo que um grande número celular seja afetado durante o processo (WATSON, 1995).

A curva de congelação de sêmen bovino está bem definida e consiste em baixar a temperatura do sêmen a uma velocidade de 0,3 a 0,5°C/minuto. O sêmen diluído a uma temperatura de 32°C atinge 4°C em cerca de 90 minutos, permanecendo assim o tempo restante, somando um tempo de equilíbrio de 3 a 4 horas. A etapa seguinte consiste na transferência do sêmen, para o vapor de nitrogênio líquido a uma temperatura aproximada de - 150°C por 15 minutos, ficando na posição horizontal, seguido de imersão à temperatura de 196°C negativos (OHASHI; BARUSELLI, 2008). Assim, com período de resfriamento e equilíbrio sendo controlados, os espermatozóides ao invés de sofrerem choque térmico sofrem modificações graduais na membrana plasmática e de fluxos iônicos, conferindo às células maior resistência durante o congelamento (WATSON, 1995).

O processo de descongelação depende de como o sêmen foi congelado. Em termos gerais, se os espermatozóides forem congelados lentamente, deverão ser descongelados lentamente, para haver tempo de reidratação da célula; caso a curva de congelação for rápida, a descongelação também deverá ser rápida, impedindo assim, o fenômeno de recristalização migratória, que consiste na formação de gelo intracelular a partir de pequenos cristais de gelo que se reestruturam em cristais maiores (MAZUR, 1984; WATSON, 1995; LEIBO; BRADLEY, 1999; CELEGHINI, 2005).

Evidências do mecanismo de recristalização foram observadas devido à redução da sobrevivência de células que foram congeladas rapidamente e passaram por descongelação lenta. A descongelação rápida dessas células permite a dissolução desses cristais antes que ocorra a recristalização, enquanto que o reaquecimento lento permite reorganização dos cristais, os quais são considerados lesivos para a célula espermática (CELEGHINI, 2005). Segundo Graham (1996), o método de descongelação rápida também pode danificar o espermatozóide, pois quando são descongelados rapidamente, o gelo derrete rapidamente, diluindo o soluto do meio e a água entrará muito rapidamente na célula, causando ingurgitamento e danos à membrana plasmática.

2.2.2- Técnicas de descongelção do sêmen

A descongelção do sêmen é uma operação delicada, não podendo ser efetuada em condições aleatórias, visto que o sucesso final de um procedimento de congelação também é limitado pelo processo de descongelção do sêmen (LEITE, 2008). Para a descongelção da dose de sêmen é necessário levar em consideração certo número de variáveis, tais como a espessura da parede da palheta, a condutividade de calor, (AMANN; PICKETT, 1987); o meio ambiente em que se processa a operação (água, ar, animal) e a temperatura deste meio que condiciona o tempo de exposição (MIES FILHO, 1987).

No decurso de um ensaio de fecundação realizado em 4.016 vacas, foi comparada a capacidade fecundante de ejaculados acondicionados em palhetas de 0,25 mL submetida à descongelção em banho maria a 35°C por 7 e 21 segundos. Os resultados foram 71,2% de não retorno aos 60-90 dias para a descongelção em 21 segundos, contra 68,6% para a descongelção por 7 segundos, sendo que estatisticamente não houve diferença entre os resultados. O mesmo pesquisador em experimentos anteriores, preconizava a descongelção do sêmen no interior do sistema genital da vaca (37,5°C a 39,5°C), técnica que se revelou satisfatória nas regiões de clima temperado, pois seus resultados foram comparáveis àqueles alcançados com a descongelção a 37°C por vinte segundos (JONDET, 1976 apud MIES FILHO, 1987).

Ohashi e Baruselli (2008) indicam que a descongelção de sêmen bovino deve ser realizada em água a 38°C, durante 45 segundos. Para Reichenbach et al.(2008), a qualidade seminal fica garantida quando a descongelção é realizada em banho-Maria à 35°C a 37°C por 20 segundos (palheta fina de 0,25 mL) ou 30 segundos (palhetas média 0,50 mL).

O método de descongelção do sêmen bovino considerado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA (HENRY; NEVES, 1998) é o realizado diretamente na água a uma temperatura entre 35 e 37°C por 30 segundos. Para Ruas (2010) nenhuma outra temperatura se mostra tão eficiente quanto a esta, pois proporciona uma descongelção com velocidade considerada adequada para evitar a reorganização de cristais de gelo, promovendo a sobrevivência de um maior número de

espermatozoides viáveis, proporcionando assim maior poder fecundante da dose descongelada. Em contrapartida, quando o sêmen é descongelado de modo indireto (no bolso, na mão, na água a temperatura ambiente, no sistema genital da vaca, etc.) em temperaturas inferiores a esta, o tempo de descongelação é maior permitindo assim, nova organização de cristais de gelo, que provoca danos em várias partes dos espermatozoides, como a quebra da cauda, rompimento das membranas plasmáticas e do acrossoma.

2.2.3- Avaliação do sêmen pós-descongelação

Para que os espermatozoides sejam considerados viáveis em programas de reprodução assistida, devem ser capazes de expressar várias características de fertilidade em uma determinada ordem de tempo, devendo apresentar pelo menos quatro atributos básicos pós-descongelação, tais como: 1) metabolismo para a produção de energia, 2) motilidade retilínea, 3) enzimas acrossomais e 4) proteínas da membrana plasmática intactas (AMANN; PICKET, 1987). A avaliação de somente um desses aspectos não garante a condição de normalidade dos outros, sendo que a análise de vários fatores seria mais apropriada para o diagnóstico da funcionalidade do espermatozoide (MELO, 2003).

Rotineiramente as avaliações laboratoriais realizadas com o objetivo de estimar o potencial de fertilidade de uma partida de sêmen são: motilidade (não inferior a 30%); vigor (não inferior a 3); concentração e anormalidades espermáticas (menor que 30%). Estes parâmetros convencionais utilizados seguem os padrões mínimos exigidos pelo CBRA após a descongelação do sêmen por 30 segundos (HENRY; NEVES, 1998).

Atualmente, algumas técnicas mais específicas tem sido estudadas e desenvolvidas para uma avaliação mais detalhada do potencial de fertilidade de uma partida de sêmen, tais como, teste de reação acrossômica, hiposmótico (teste HO), teste em penetração em muco servical bovino ou modificado entre outros.

2.4- CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE ESPERMATOZÓIDES UTILIZADA NA FIV.

A fertilização *in vitro* (FIV) faz parte de uma das etapas do processo de produção *in vitro* de embriões (PIVE), a qual inicia com a coleta, maturação (MIV) e fertilização (FIV) de oócitos e termina com o cultivo (CIV) de zigotos e estruturas embrionárias. Na etapa de fertilização os espermatozóides devem ser capacitados em gotas de meio FIV em uma concentração final que pode variar de 1 a 2×10^6 de espermatozóides/mL de meio (GONÇALVES et al., 2008).

Diversos estudos mostram que as concentrações espermáticas diferem bastante entre as raças: Saeki et al. (1995) verificaram que a concentração final necessária para a fecundação de ovócitos zebuínos é de 1×10^6 de espermatozóides/mL. Para touros europeus esses números variam entre 0,5 e 5×10^6 espermatozóides/mL (LONG et al., 1994; PARRISH et al., 1995); em touros da raça Nelore não foram observadas diferenças quando utilizaram 2 ou 4×10^6 espermatozóides/mL na FIV (WATANABE et al., 1996). Na raça guzerá não houve aumento na taxa de clivagem com concentrações entre 1 e 4×10^6 espermatozóides/mL, contudo, na concentração de $0,5 \times 10^6$ células/mL, a taxa de clivagem foi menor (CAMARGO et al., 2000). Esses resultados sugerem que concentrações entre 1 e 2×10^6 espermatozóides/mL são mais adequados para manter uma boa taxa de clivagem sem aumentar a taxa de poliespermia (DIAS et al., 2006).

Quando a concentração espermática é alta, possivelmente existe a liberação de alto teor de enzimas hidrolíticas e radicais livres no meio de fecundação, o que também pode provocar poliespermia, pois o excesso dessas enzimas facilita a penetração por mais de um espermatozóide (LONG et al., 1994; REHMAN et al., 1994; RAMOS et al., 2000; CAMARGO et al., 2000), afetando a taxa de clivagem e a produção de embriões (SAEKI et al., 1995).

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- LOCAL E ANIMAIS

Todas as etapas deste trabalho foram realizadas na Central de Biotecnologia de Reprodução Animal (CEBRAN), da Universidade Federal do Pará (UFPA), localizada na cidade de Castanhal, situada na região nordeste do Estado do Pará, latitude a 1° 18' 17,9" (S) e longitude 47° 56 ' 30,2" (W), com um clima equatorial úmido, temperatura média de 25°C, precipitação pluviométrica anual variando entre 2.500 e 3.000 mm e umidade relativa do ar entre 78% e 90% (CLIMA ..., 2008).

Neste estudo foi utilizado sêmen congelado de 10 touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), com idade entre dois a quatro anos, sem histórico de participação em programas de reprodução assistida. Esses animais seguiram o manejo de rotina desta central, onde permanecem em regime intensivo de criação, sendo mantidos em piquetes sombreados, nutrição baseada em capim elefante (*pennisetum purpureum* Schum) picado (50kg) e concentrado (2kg) duas vezes ao dia, complementada com sal mineral e água *ad libidum*.

3.2- PROCESSAMENTO DA DOSE DE SÊMEN

O sêmen utilizado para a realização deste experimento foi obtido pelo método de eletroejaculação, diluído inicialmente na proporção de 1:200 em meio TES® (ácido N-trishidroxmetil-metil-2-minometanosulfônico), e a determinação da concentração espermática, foi realizada por meio de espectrofotômetro¹, obtendo-se a taxa de diluição final com amostras apresentando uma concentração média de 20 milhões de espermatozoides por dose. O envase das doses foi feito em palhetas² de 0,25 mL

¹ MINITUB

² MINITUB

fabricada em cloreto de polivinil, medindo 133 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro.

As doses foram submetidas à curva de congelação conforme descrito por Ohashi & Baruselli (2008) em que as amostras são postas em geladeira para atingir a temperatura de 4°C, permanecendo nesta por 3 a 4 horas, em seguida são dispostas horizontalmente sobre o vapor de nitrogênio líquido por 15 minutos, a uma temperatura de 150°C negativos e só então se efetua a congelação e armazenamento em nitrogênio líquido a 196°C negativos.

3.3- FRACIONAMENTO E ACONDICIONAMENTO DAS MINIPALHETAS

As doses de sêmen foram retiradas do botijão de N₂ e depositadas imediatamente em uma tela de arame milimétrica colocada no interior de uma caixa térmica contendo aproximadamente 3 litros de N₂ e sobre esta tela foi feito o fracionamento das doses de sêmen. A base da tela permaneceu a 2cm acima da lâmina de N₂, esta altura proporcionou às doses, no momento da sua manipulação, uma temperatura de - 163,5°C, cuja aferição foi realizada em um ambiente a 25°C. O corte das palhetas foi realizado com o auxílio de tesoura, pinça anatômica e um aplicador de Inseminação Artificial (IA) com tamanho adaptado para o encaixe das palhetas de sêmen, dando suporte às medidas e ao fracionamento das mesmas (Figura 1).



Figura 1: Material utilizado no corte e acondicionamento das doses de sêmen: Mesa com tela milimétrica, tesoura, pinça, rack e aplicador de IA com tamanho adaptado para a medida e corte das minipalhetas.

Foi obtido de cada touro um total de 11 doses de sêmen acondicionado em palhetas de 0,25 mL de mesma partida e mantidas congeladas entre 2 a 7 anos. Uma dose representava o grupo controle, que consistia de uma palheta não fracionada, descongelada imediatamente após a retirada do N₂ em temperatura de 37°C por 30 segundos; 5 foram destinadas para o grupo da descongelação direta (DD), ou seja, quando a fração da dose entrou em contato direto com a água a 37°C; e 5 para o grupo da descongelação indireta (DI), isto é, quando não houve contato da fração diretamente com a água, visto que a mesma estava acondicionada dentro de palhetas média de 0,5 mL formando uma espécie de embalagem de proteção. Cada um desses grupos de 5 doses foram fracionadas em duas partes (resultando em 10 frações por grupo e total de 20 frações por animal), assim cada grupo continha dois subgrupos experimentais denominados, Unidade da Esfera (UE), analisadas imediatamente após o corte das frações e Unidade do Álcool Polivinílico (UAP), que retornou para o botijão criobiológico (-196°C) sendo analisado após 24 horas (Figura 2).

Todas as frações das doses, mesmo aquelas que tiveram descongelação imediata, foram acondicionadas em palhetas médias (embalagem), que foram obliteradas com álcool polivinílico, para que todas as frações passassem pelo mesmo procedimento, bem

como não haver o contato direto da dose fracionada com Nitrogênio líquido, a fim de impedir contaminação biológica, como cita Bielanski et al (2003).

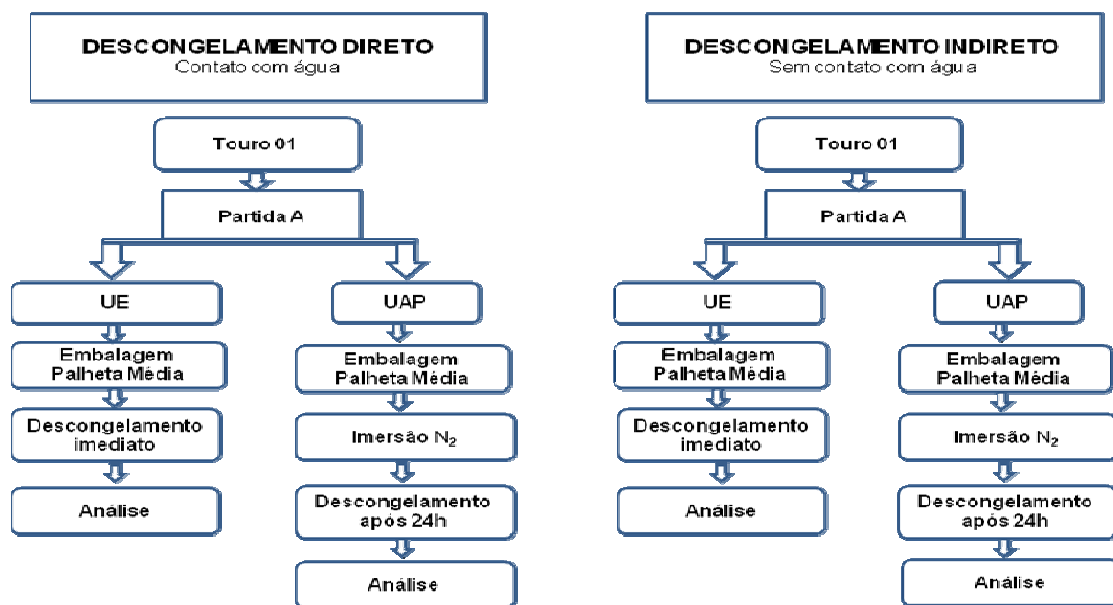


Figura 02: Representação esquemática das etapas do processamento das amostras e dos tipos de descongelamento aos quais as frações foram submetidas.

3.4- DESCONGELAÇÃO DA AMOSTRA E ANÁLISE SEMINAL

As doses do grupo controle foram descongeladas em água a 37°C por 30 segundos. No grupo da descongelação direta (DD) o processo ocorreu da seguinte forma: as frações pertencentes ao subgrupo UE e UAP foram retiradas de suas embalagens, em seguida foram colocadas em um tubo de ensaio contendo água aquecida a 37°C por 30 segundos; como uma das extremidades da dose estava sem proteção, em função do corte, foi imersa apenas 90% da alíquota para impedir a entrada de água na mesma, sendo os outros 10% descongelados por meio de irradiação do calor (Figura 3).

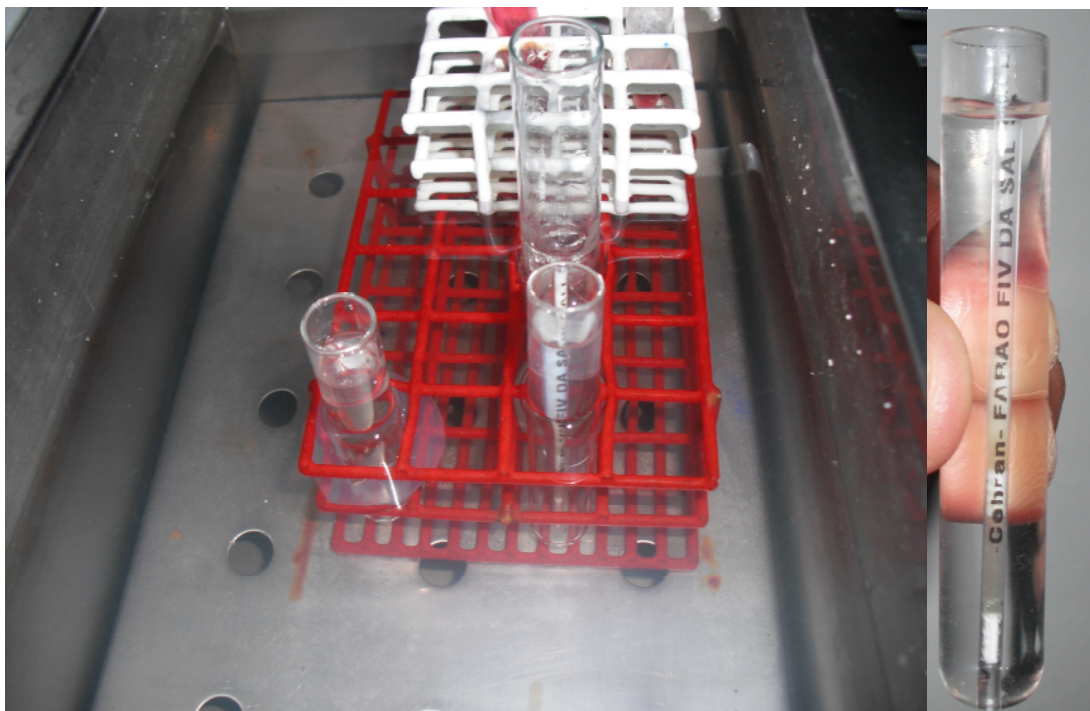


Figura 3: Foto ilustrando o descongelamento direto. Fração da dose sendo descongelada dentro de um tubo de ensaio com a extremidade da dose fora da água.

A única diferença na descongelção destes subgrupos foi que as frações da UE foram descongeladas imediatamente após o corte da dose e as frações da UAP, foram descongeladas depois de 24 horas de armazenamento em botijão criobiológico. Na observação da curva de descongelção deste tratamento (37°C/30 segundos), verificou-se que as amostras a -196°C elevaram a temperatura até 31,8°C em uma velocidade média de 22,8°C/segundo e de 31,8°C até 37°C, a velocidade foi de 0,52°C/segundo.

No grupo da descongelção indireta (DI) o tratamento ocorreu da seguinte forma: as frações pertencentes aos subgrupos da UE e UAP foram descongeladas dentro da própria embalagem, o que evitou o contato direto das amostras com a água e exigiu um tempo médio de 60 segundos para seu descongelamento total (Figura 4). Assim como no DD, a UA e a UAP foram descongeladas imediatamente após o corte e 24 horas depois de armazenamento em Nitrogênio líquido respectivamente. Na observação da curva de descongelção indireta (37°C/60 segundos), verificou-se que as amostras a -196°C ao serem imersas em água 37°C, tiveram a temperatura elevada até -59,6°C a uma velocidade de 13,6°C/segundo; de -59,6°C até -3,8°C a uma velocidade de 5,6°C/segundo; de -3,8°C até 13°C a uma velocidade de 1,7°C/segundo; de 13°C

até 26,4°C a uma velocidade de 1,3°C/segundo; de 26,4°C até 34,3°C a uma velocidade de 0,8°C/segundo; e de 34,3°C até 37°C a uma velocidade de 0,3°C/segundo.



Figura 4: Ilustração do descongelamento indireto. Palheta média imersa na água com a metade de uma dose de 0,25 mL (fração) sendo descongelada no seu interior.

Após a descongelação, o conteúdo das frações foi acondicionado em criotubos³ aquecidos a 37° e diferentes alíquotas foram utilizadas para análise física, morfológica e quantitativa dos espermatozóides de cada fração.

A avaliação física do sêmen descongelado foi feita por meio da observação da motilidade e do vigor espermático de forma subjetiva considerando o percentual de espermatozóides com motilidade progressiva retilínea, e o vigor espermático, na escala de 0 a 5. Estas análises foram realizadas sobre placa aquecedora em microscópio⁴ com contraste de fase utilizando objetivas de 20 e 40X. A análise da perda de motilidade promovido pelos diferentes métodos de descongelação foi estimada pela Taxa de Degradação da Motilidade (TDM) entre as médias obtidas do grupo controle

³ EPPENDORF

⁴ NIKON ECLIPSE E600

(motilidade inicial, MI) e a média de motilidade pós descongelação (Motilidade Final, MF), utilizando-se a equação de Maia (2006) para o cálculo da TDM, onde:

$$\text{TDM} = \frac{(\text{MI} - \text{MF}) \times 100}{\text{MI}}$$

Para avaliação das lesões de acrossoma, uma gota de sêmen foi adicionada em um criotubo contendo solução de formol salino tamponada. Em seguida analisou-se uma gota de sêmen sob lâmina e lamínula, sendo contadas 100 células espermáticas utilizando microscópio⁵ de contraste de fase com aumento de 100X sob imersão.

O exame adicional para avaliação da integridade da membrana dos espermatozóides foi realizado utilizando o método de coloração eosina-citrato de sódio (1g de eosina em 100mL de solução de citrato de sódio a 2,9%), conforme preconizado por Ohashi e Baruselli (2008). A técnica consistiu em colocar duas gotas de eosina citrada, previamente aquecida, em uma lâmina e logo em seguida adicionar uma gota do sêmen a ser avaliada sendo então a amostra homogeneizada e após 30 segundos foi feito o esfregaço e contadas 100 células imediatamente após a secagem da lâmina, utilizando microscopia de contraste de fase com aumento de 100X sob imersão. Foi considerado o percentual de espermatozóides vivos e verificado a taxa de perda com relação motilidade espermática.

A concentração espermática de cada fração da dose foi realizada por meio de câmara de Neubauer, e a contagem dos espermatozóides procedeu-se conforme a descrição de Henry e Neves (1998). O sêmen foi diluído na proporção de 1:200, ou seja 10 µL da fração de sêmen, em 2 mL de solução de formol-salina-tamponada; o retículo foi então preenchida com 10 µL em cada lado, sendo realizada a contagem espermática de 5 quadrados grandes, sendo 4 em cada canto e 1 central. Seguindo a técnica simplificada descrita por Mies Filho (1987), multiplicou-se a contagem dos espermatozóides dos cinco quadrados por 10⁴ obtendo-se a concentração relativa de espermatozóides por mm³ e multiplicando o resultado deste por 10³ obteve-se a concentração relativa em mL (fórmula e exemplo 1). Baseado nas fórmulas citadas por

⁵ NIKON ECLIPSE E400

Ohashi e Baruselli (2008), a concentração total de espermatozóides em movimento foi obtida multiplicando a concentração relativa pelo volume do sêmen (neste caso considera-se o volume da fração que foi de 0,125 mL, ou seja metade da dose de 0,25 mL) e pela motilidade espermática dividida por 100 (fórmula e exemplo 2).

Fórmula 1: Concentração Relativa (CR) = N° espermatozoides contados $\times 10^4$

Exemplo 1: CR = 10 sptz $\times 10^4$

$$CR = 10^5 \text{ sptz/ mm}^3 = 10^8 \text{ sptz/ mL}$$

Fórmula 2: Concentração total (CT) = CR \times volume \times motilidade $\div 100$

Exemplo 2: CT = 10^8 sptz / mL \times 0.125 mL \times 70 $\div 100$

$$CT = 8.75 \times 10^4 \text{ sptz/ fração}$$

3.5 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos das estatísticas descritivas e análises estatísticas dos testes e métodos aplicados nas amostras foram realizados utilizando os softwares estatísticos *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) e MINITAB. Sendo que para a conclusão das estatísticas foi utilizada a análise de variância (ANOVA) não paramétrica por meio do Teste de Kruskal-Wallis que mediu o grau de variação entre os tratamentos das variáveis de Motilidade (M), Vigor (V), Integridade de Acrossoma (IA) Integridade da Membrana (IM) e Concentração Espermática (CE). Para a finalização foi utilizado o método de Student-Newman-Keuls (NSK), o qual calculou as diferenças entre as médias amostrais para cada uma das variáveis em estudo ao nível de significância de 5%.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - MOTILIDADE ESPERMÁTICA

Os resultados obtidos no presente experimento quanto à motilidade espermática entre os métodos de descongelação direta e indireta demonstraram diferenças significativas entre eles, no entanto a motilidade das frações de sêmen que passaram pelo mesmo tratamento, não demonstraram diferença estatística ($p < 0,05$), entre descongelação imediata e após 24h. As frações que passaram pelo DI-imediato (48,8%) e DI-24h (54,2%) apresentaram motilidade inferior quando comparadas com o DD-imediato (67,8%) e DD-24h (69,6%) e com o grupo controle (70,0%) (Tabela 1).

O percentual de perda da motilidade após a manipulação e descongelação das frações (Taxa de Degradação da Motilidade-TDM) foi de 30,28% no DI-imediato; 22,57% no DI-24h; 3,14% no DD-imediato e 0,57% no DD-24h (Tabela 1). Segundo Salamon e Maxwell (1995) esta perda está relacionada com a variação de temperatura durante qualquer etapa do processo de criopreservação promovendo redução na motilidade espermática como consequência de danos ultraestruturais, bioquímicos e funcionais nos espermatozoides.

A motilidade espermática do grupo do DD (67,8% e 69,6%), foram superiores aos obtidos por Siqueira (2007), que obteve 53,48% de motilidade para o sêmen descongelado a 37°C por no mínimo 20 segundos, em seu estudo sobre a correlação entre testes complementares e motilidade pós-descongelamento com a taxa de gestação de bovinos utilizando Tris-gema como diluente, no entanto este índice (53,48%) coincide com as taxas de motilidade para o subgrupo DI-24h (54,2%) do presente experimento.

Leite (2008), ao descongelar o sêmen bovino utilizando o mesmo binômio tempo/temperatura deste estudo, também obteve valores de motilidade inferiores (41%) a todos os resultados para a mesma característica deste experimento, entretanto utilizando o método de avaliação computadorizada (CASA - computer assisted semen analysis). Valores inferiores também foram encontrados por Carreira (2008), que descongelou amostras de sêmen bovino a uma temperatura de 35°C por 30 segundos, o

que demonstrou uma variação de 30 a 45% de motilidade para doses envasadas em palhetas de 0,25 mL.

4.2 – VIGOR ESPERMÁTICO

No que se refere ao vigor espermático, pode-se observar que os resultados seguiram parâmetros semelhantes ao demonstrado na motilidade, visto que o grupo do DI-imediata (2,4) e DI-24h (2,5) apresentaram resultados inferiores e estatisticamente diferentes do grupo de DD-imediata (3,0) e DI-24h (3,0) e do grupo controle (3,0) (Tabela 1).

Os resultados do vigor de todos os grupos deste estudo foram inferiores aos de Carreira (2008) que em sua avaliação sobre a influência de gotas citoplasmática proximal (GCP) na qualidade do sêmen bovino, verificou um vigor de 4,5 para o grupo controle e 4 para o grupo com GCP ao descongelar o sêmen em banho maria a 35°C por 30 segundos.

Num estudo sobre repetidas exposições de doses de sêmen bovino criopreservadas à temperatura ambiente, seguida de sua descongelação a 37°C por 25 segundos, Horn et al.,(1997) observou o vigor decrescendo de 3,8 quando as palhetas não foram expostas ao ambiente e 2,4 após 10 dias de exposição ao ambiente por 10 a 40 segundos/dia. Para este autor, o vigor espermático está diretamente influenciado pela temperatura, por este motivo não se pode afirmar com certeza que essas variações de vigor poderiam comprometer o grau de fertilidade dessas amostras.

O vigor espermático (2,4) alcançado na DI-imediata coincidiu com o vigor obtido por Silva et al (1998), quando utilizou banho maria a 37°C durante 1 minuto, entretanto o vigor de 1,6 obtido ao descongelar o sêmen sob 50°C por 30 segundos, foi numericamente inferior a todos os resultados deste estudo.

Todas as frações de doses descongeladas apresentaram requisitos superiores aos exigidos para sêmen Bovino descongelado, quanto aos aspectos de motilidade (>30%) e vigor (>2), de acordo com as exigências do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

Tabela 1: Médias e DP dos estudos de acordo com a técnica de manipulação da palheta de sêmen bovino considerando os valores de motilidade, vigor, lesão de acrossoma, vivos, taxa de perda, taxa de degradação da motilidade e concentração espermática da UE e UAP nos tratamentos de DI-imediata, DI-24h, DD-imediata, DD-24h e grupo controle.

Parâmetro	DI- imediata UE	DI-24h UAP	DD-imediata EU	DD-24h UAP	Controle
Motilidade (%)	48,8 ± 16,9 ^a	54,2 ± 10,3 ^a	67,8 ± 4,2 ^b	69,6 ± 2,0 ^b	70,0 ± 0,0 ^b
TDM (%)	30,28	22,57	3,14	0,57	
Vigor	2.4 ± 0.6 ^a	2.5 ± 0.5 ^a	3.0 ± 0.2 ^b	3.0 ± 0.1 ^b	3.0 ± 0.0 ^b
IA	24.3 ± 14.5 ^a	36,2 ± 20,3 ^b	12,8 ± 7,4 ^c	12,6 ± 5,2 ^c	11,9 ± 3,0 ^c
IM (%)	40,5±17,4 ^a	44,3 ± 15,9 ^a	63,6 ± 8,3 ^b	59,0 ± 11 ^b	57,5 ± 7,8 ^b
Tx perda (%)*	17	18,26	6,38	15,23	17,86
CE	6,1×10 ⁶ ±2,9 ^a	7,2×10 ⁶ ±5,2 ^{ab}	8,2×10 ⁶ ±2,7 ^b	7,8×10 ⁶ ±2,1 ^b	

^{a, b} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05) pelo teste SNK. * Taxas de perda comparada entre porcentagem de vivos e motilidade espermática.

4.3 – AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO ACROSSOMA

Considerando os resultados obtidos na avaliação do acrossoma, verificou-se que houve uma diferença significativa entre os tratamentos DI e DD (p< 0,05), visto que ocorreu um efeito negativo significativo do método de DI sobre os aspectos morfológicos do acrossoma dos espermatozoides (p<0,05), sendo maior no grupo de DI-24h (36,2%) do que no grupo de DI-imediata (24,3%). No grupo de DD observou-se que não houve elevação da porcentagem de desprendimento de acrossoma (DD-imediata 12,8% e DD-24h - 12,6%), uma vez que não se diferenciou estatisticamente dos 11,9% do grupo controle (Tabela 1).

Carreira (2008), utilizando sondas fluorescentes, revelou que 39,67% dos espermatozoides avaliados após a descongelação a 35°C por 30 segundos, apresentavam lesão de membrana acrossômica, resultados estes, superiores aos encontrados em todos

os tratamentos do presente experimento. Este fato pode está relacionado com a maior precisão da técnica de fluorescência na indicação das lesões de membrana acrossômica.

4.4 – AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA

Com relação aos espermatozóides com membrana intacta, observou-se que os maiores índices ocorreram no grupo DD- imediato (63,6%) e DD-24h (59,0%), sendo que esses valores foram ligeiramente superiores ao tratamento do grupo controle (57,5%) não diferenciando estatisticamente ($p < 0,05$) (Tabela 1).

No presente experimento o percentual de membrana plasmática lesada foi maior do que a porcentagem de perda da motilidade em todos os tratamentos e no grupo controle, havendo uma diferença que variou de 6,3% a 18% (Tabela 1) . Apesar de esses valores não serem condizentes com os de Salamon e Maxwell (1995) e Watson (1995), os quais consideram 50% de lesão celular quando o sêmen passa pelo processo de criopreservação, verifica-se que os valores de motilidade estão sempre superiores aos de células com lesão de membrana. Dessa forma, deve-se levar em consideração que muitos espermatozóides lesionados permanecem móveis pela sua adequada produção de energia, mas nem sempre são férteis em função da perda de componentes importante para o processo de fertilização (VALCÁRCEL et al., 1994; SIQUEIRA et al., 2007).

4.5- CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA

Os dados obtidos da concentração espermática permitiu verificar que os resultados do DI- imediato teve diferença estatística significativa com relação ao grupo de descongelação direta. Observou-se que a média da concentração espermática obtida na UE do grupo de DI- imediata foi de $6,1 \times 10^6$, enquanto que na UAP do grupo de DI- 24h foi de $7,2 \times 10^6$, sendo que não houve diferença estatística entre ambos ($P < 0,05$); a UE do grupo de DD- imediata obteve a média de $8,29 \times 10^6$ e $7,88 \times 10^6$ para a UAP do grupo de DD-24h, não havendo diferença estatística entre eles, bem como com o grupo

DI-24, mas ocorreu diferença estatística com relação ao grupo de DI-imediata ($P < 0,05$) (Tabela 1).

Frente a esses resultados verifica-se que mesmo havendo diferenças estatísticas entre os grupos, todos apresentaram um número final com uma concentração superior ao mínimo necessário de espermatozóides móveis para a PIV, podendo-se viabilizar novos experimentos para potencializar o uso dessa técnica com um número maior de frações. Segundo Gonçalves (2008) a concentração espermática final utilizada na FIV pode variar de 1 a 2×10^6 de espermatozóides/mL, permitindo uma boa taxa de clivagem sem aumentar a taxa de poliespermia (DIAS et al., 2006).

No tocante aos resultados obtidos entre os dois grupos, que tange apenas a motilidade, vigor, lesão de acrossoma e de membrana a diferença pode estar relacionada ao método de descongelamento proporcionado ao grupo de DI, já que ambos os grupos de dose passaram pelo mesmo estresse pré-descongelamento, isto é, fracionamento das doses e seu retorno para o botijão criobiológico. Deste modo deve-se considerar que as frações dos grupos de DI não tiveram um contato direto com a água, pois eram imersas dentro das suas próprias embalagens e permaneciam por um tempo de 1 minuto. Mesmo com o aumento desse tempo, parece não ter ocorrido uma descongelamento homogêneo do sêmen resultando em altas taxas de lesão de membrana plasmática e acrossomal, bem como diminuição da motilidade e vigor.

Segundo Amann e Pickett (1987), a espessura da parede da palheta e condutividade de calor, pode afetar o descongelamento da dose de sêmen. Estes fatores podem estar relacionados com a baixa motilidade dos espermatozóides quando são submetidos ao método de DI, pois as alíquotas de sêmen, que já estavam acondicionadas dentro de minipalhetas, foram descongeladas dentro de palhetas médias, formando uma parede espessa. Esta parede, bem como o binômio tempo/temperatura ($37^{\circ}/60'$), pode ter levado as células espermáticas a sofrer um descongelamento inadequado afetando a suas condições físicas e morfológicas. Apesar dos índices adequados de motilidade e vigor para serem utilizados na FIV, seus índices de despreendimento de acrossoma inviabilizam sua utilização para a mesma, visto que essa característica tem correlação positiva com o processo de fertilização.

5 – CONCLUSÃO

Para o fracionamento da dose de sêmen bovino criopreservado o melhor método de descongelamento foi o direto, podendo uma fração ser criopreservada para uso posterior sem comprometimento da qualidade seminal pós-descongelamento.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, et. al. **Biologia molecular da célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1294p.

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K., Spermatozoa function. In: MCKINNON, A. O. VOSS, J. L. **Equine reproduction**. Malvern: Lea e Febiger, 1993. p. 715 – 745.

AMANN, R. P.; PICKETT. B. W. Principles of cryopreservation and review of cryopreservation off stallion spermatozoa. **Equine of Veterinary Science**. v. 7-3, p. 145-173. 1987.

BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectant on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v. 22, p. 1061-1069. 2001.

BARTH, A. D; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. 1. ed. USA: Iowa State University press/Ames, 1989. 285p.

BAUDOT, A. et al., Thermal study of simple aminoalcohol solution, **Cryobiology**, v. 44, p. 150-160. 2002.

BIELANSKI, A. et al. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. **Cryobiology**, v. 46, p. 146-152. 2003.

CAMARGO, L.S.A. et al . Concentração espermática na fecundação *in vitro*, com sêmen de touro da raça Guzerá. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, p. 59-64. 2000.

CARREIRA, J.T. **Avaliação da integridade do acrossoma, membrana citoplasmática, cromatina, potencial mitocondrial e produção de embriões in vitro de sêmen bovino com altos índices de gota citoplasmática proximal**. 2008. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias e Veterinárias) – Universidade Estadual Paulista, 2000.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre a membrana plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária e Reprodução Animal) – Universidade de São Paulo, 2005.

CLIMA brasileiro: Região Norte - Disponível em: <http://www.climabrasileiro.hpg.ig.com.br/norte.htm> Acesso em: 09 set. 2008.

DAYAN, A.; WATANABE, M.R.; WATANABE, Y. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FIV. **Arquivo da Faculdade de Veterinária UFRS**, v. 28: p.181-185. 2000.

DELL'AQUA JR. et al. Aplicação do sêmen sexado na produção de embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 34, p. 205-212. 2006.

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.

DIAS, L.P.B. et al. Concentração espermática e tempo de incubação na fecundação in vitro usando-se sêmen de touros da raça Guzerá. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p. 348-353. 2006.

FABER, D.C. et al. Commercialization of animal biotechnology, **Theriogenology**, v 59, p. 125-138. 2003.

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

FLORÊNCIO, R. S. et al. Efeitos do congelamento de sêmen humano e temperatura de descongelamento sobre a motilidade e morfologia. **Reproduction Clim**, v.10, p.24-26. 1995.

FRANCO, M. M., MELO, O. E. **Melhoramento animal: o uso de marcadores moleculares e da reprodução assistida**. Embrapa/Cenargen, 2006. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br>. Acesso em Jan. 2008.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIRÊDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2.ed. São Paulo: Varela, 2008. 395p.

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

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 1014.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 6.ed. São Paulo: Manole, 1995. 582p.

HENRY, M.; NEVES, J. P., **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. CBRA. 2.ed. Belo Horizonte: 1998. 49p.

HORN, M. M.; COSTA, A. S.; MORAES, J. C. F. Qualidade do sêmen bovino congelado submetido a repetidas exposições ao ambiente. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v.5. p. 353-355. 1997.

JONDET, M.; DOMINIQUE, S.; SCHOLLER, R. Effects of freezing and thawing on mammalian oocyte. **Cryobiology**, v.21, p.192-199. 1984.

LADHA, S., JAMES; P.S., CLARCK, D. C. et al., Lateral mobility of plasma membrane lipids in Bull spermatozoa: Heterogeneity between surface domains and rigidification following cell death. **Jornal of Cell Science**, v. 110, p. 1041 – 1050. 1997.

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

LEIBO, S.P.; BRADLEY, L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: GAGNON, C. **The male gamete**. Vienna: Cache River Press, 1999. p. 501-516.

LEITE, G. T. **Tempo de equilíbrio na criopreservação do sêmen: Efeitos sobre características de motilidade e de integridade das membranas espermáticas de touros Gir leiteiro**. 2008. 122 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2000.

LIMA V.F.M.H. Espermatozóide sexado bovino: quando utilizá-lo? **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34. p. 213-224. 2006.

LONG, C.R.; DMIANI, P.; PINTO-CORREIA, R.A. Morphology and subsequent development in culture of bovine oocytes matured *in vitro* under various conditions of fertilization. **Jornal of Reproduction and Fertility**, v.102, p.361-369. 1994.

LUCCI, C.M., RUMPF, R., FIGUEIREDO, J.R. et al. Isolation of ovarian preantral follicles from zebu cows: development and efficiency of a specific mechanical. **Arquivo da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.27, p.240. 1999.

MAIA, M. S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), trolox-C e catalase marciane da silva maia**. 2006. 165 f. Tese (doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, 2006.

MAZUR, P. Cryobiology: The freezing of biological systems. **Science**, v.199, p.939-949, 1970.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal Physiology**, v.247, p.125-142. 1984.

MAZUR, P. Principles of cryobiology. In: FULLER, B. J.; LANE, N.; BENSON, E. E. **Life in the Frozen State**, Boca Raton: CRC, 2004. p. 3-65.

MEDEIROS, C.M.O et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, p. 327-344. 2002.

MELO, M.C. Ação dos crioprotetores na biotecnologia de sêmen congelado. In: SEMINÁRIOS DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA, 19., Botucatu(SP), 2003. **Anais...** Botucatu: Universidade Estadual Paulista – UNESP, 2003. 19 p.

MIES FILHO, A. **Inseminação artificial**. 6. ed. Porto Alegre: Sulina, 1987. v. 2, 751 p.

OHASHI, O. M.; BARUSELLI, P. S. Biotécnicas da reprodução animal aplicadas em Bubalinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIRÊDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2008. p. 105-124.

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

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v.44, p.859-869. 1995.

PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Cryopreservation of semen. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993. p.769-789.

RAMOS, A. A. et al. Fecundação *in vitro* com sêmen de bovinos da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p.360-365. 2000.

REHMAN, N. et al. Development of in vitro matured and fertilized bovine oocytes co-cultured with buffalo rat liver cells. **Theriogenology**, v.41, p.1453-1462. 1994.

REICHENBACH et al., Transferência e criopreservação de embriões bovinos In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2008. p. 201 – 240.

REICHENBACH H. D.; MORAES J. C. F.; NEVES J. P. Tecnologia do sêmen e Inseminação Artificial em Bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2008. p. 57- 82.

RUAS, R. R. **Descongelamento do sêmen bovino**. Fazu, 2010. Disponível em: <http://www.fazu.br/01/?noticias/1772/1> , Acessado em: 21/04/10.

SAEKI, K. et al. Effects of heparin, sperm concentration and bull variation on *in vitro* fertilization of bovine oocytes in protein-free medium. **Theriogenology**, v.44, p.859-869. 1995.

SALAMON, S; MAXWELL, W. M. C. frozen storage of ram semen: causes of low infertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v. 38, p.1-36. 1995.

SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v.175, p.720-731. 1972.

SIQUEIRA, J. B. et al., Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p. 387-395. 2007.

SODERQUIST, L.; MADRID-BURY, N.; RODRIGUEZMARTINEZ, H. Assesment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. **Theriogenology**, v.48, p.1115-1125. 1997.

SQUIRES, E.L. et al., **Cooled and frozen Stallion Semen**. Colorado State University: Fort Collins, 1999. p. 80.

TORRES, J.R. S. et al., Considerações técnicas e econômicas sobre reprodução assistida em gado de corte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, p.53-58. 2009.

VALCÁRCEL, A. et al., fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of a ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 41, p. 483-489. 1994.

WATANABE, Y.F. et al.. Efeito de touros na produção *in vitro* de embriões com diferentes concentrações de heparina e de espermatozóides. **Arquivo da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.24, p.250, 1996.

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

WATSON, P. F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: MORRIS, E.J.; CLARK, A. **The effects of low temperatures on biological membranes**. London: Academic Press, 1981. p.189-218.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60/61, p. 481-492. 2000.

WILSON, R.D. et al., In vitro production of bovine embryos using sex-sorted sperm. **Theriogenology**, v. 65, p. 1007- 1015. 2006.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. **The physiology of reproduction**. New York: Raven press, 1994. p.189-317.