UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

COMPARAÇÃO DE DOIS DILUIDORES PARA O ARMAZENAMENTO DE SÊMEN BOVINO UTILIZADO NA FECUNDAÇÃO *IN VITRO*.

Rodolfo Bilachi Prado
Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

COMPARAÇÃO DE DOIS DILUIDORES PARA O ARMAZENAMENTO DE SÊMEN BOVINO UTILIZADO NA FECUNDAÇÃO *IN VITRO*.

Orientado: Rodolfo Bilachi Prado

Orientadora: Prof[a]. Adj. Marion Burkhardt de Koivisto

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2009

Prado, Rodolfo Bilachi
P869c Comparação de dois diluidores para o armazenamento de sêmen bovino utilizado na fecundação *in vitro* / Rodolfo Bilachi Prado. – – Jaboticabal, 2009
xiv, 78 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
Orientador: Marion Burkhardt de Koivisto
Banca examinadora: Paulo Henrique Franceschini / Sony Dimas Bicudo
Bibliografia

1. Bovinos. 2. Diluidores. 3. Fecundação *in vitro*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RODOLFO BILACHI PRADO – nascido em Novais – SP, ao dia 4 do mês de Julho de 1979; concluiu o ensino médio no Colégio Objetivo, na cidade de Catanduva – SP, em dezembro de 1997. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária no Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP) em março de 1999. Concluiu o curso de graduação em dezembro de 2003. De fevereiro de 2004 a dezembro de 2006 cursou especialização em Clínica e Cirurgia de Grandes Animais no Hospital Veterinário Dr. Halim Atique do Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP). Ingressou no curso de pós-graduação, nível de Mestrado, sob orientação da Prof^{a}. Adj. Marion Burkhardt de Koivisto, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista – UNESP, em março de 2007. Atualmente trabalha no Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP) – Laboratório FERTVITRO na área de produção *in vitro* de embriões bovinos.

“Se eu soubesse o que estava fazendo, não chamaria de pesquisa”

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

- Meu Senhor, que esteve comigo durante todos esses dias:

"Os céus proclamam a glória de Deus
e o firmamento anuncia a obra das suas mãos".
(Salmo 19)

- Pai e mãe:

"A vocês que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, não bastaria um obrigado. À vocês que iluminaram o caminho obscuro com afeto e dedicação para que eu trilhasse sem medo e cheio de esperança, não bastaria um muito obrigado. A vocês que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que muitas vezes, pudessem realizar o meu sonho. A vocês, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer, que não tenho palavras para agradecer tudo isso, mas é o que me acontece agora, quando procuro arduamente uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar. Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras. Amo vocês !"

- Jú, meu Amor:

Encontrei minha paz no teu sorriso, minha força no teu existir. São dois corações num mesmo destino, num mesmo segredo... São dois corações numa mesma vida, que se encaixam perfeitamente e dependem um do outro.
Você esteve ao meu lado em todos os momentos, me enchendo de certezas e otimismo, sem você, nada disso seria realidade. Você não só faz parte da conclusão desse trabalho, mas sim de todos os momentos da minha vida.
Obrigado por me fazer feliz, essa vitória é nossa. Te amo !

“Eu tenho tanto
Prá lhe falar
Mas com palavras
Não sei dizer
Como é grande
O meu amor
Por você...”

(Roberto Carlos e Erasmo Carlos)

- Halim e Tábata:

Obrigado por acreditarem em mim quando eu achei difícil acreditar em mim mesmo. Obrigado por dizerem, algumas vezes, o que eu realmente precisava ouvir, em vez do que eu queria que você dissessem, e por terem me mostrado um outro lado a considerar. Obrigado por se abrirem comigo, por confiar-me seus pensamentos, suas decepções e seus sonhos, por saberem que vocês podem contar comigo e por terem pedido minha ajuda quando precisaram dela. Obrigado por terem posto tanta sabedoria, cuidado e imaginação na nossa amizade, por compartilharem tantas coisas boas e por marcarem tantas lembranças sobre nós.

"Amigo é coisa pra se guardar
Debaixo de sete chaves
Dentro do coração..."
(Milton Nascimento)

Tio Diorante e Tia Bete

Não poderia deixar de dedicar esse trabalho à vocês que ajudaram na realização do sonho da minha vida, ser Médico Veterinário. Serei grato para sempre. Obrigado !

Aos meus familiares

Avós, tios, primos, Sr. Zé, Dona Amélia, Rê, Roger e minha linda sobrinha Amandinha.
Obrigado pelo apoio e incentivo durante esses anos.

"Paz e harmonia: eis a verdadeira riqueza de uma família."
(Benjamin Franklin)

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a minha orientadora **Prof^{a}. Dr^{a}. Marion Burkhardt de Koivisto** pela perseverança, confiança, paciência, amizade e principalmente pelos ensinamentos durante o mestrado e que levarei por toda minha vida. Sempre vou acreditar que: "tudo vai dar certo". Obrigado.

- Aos amigos e companheiros **Maurício Barros Fernandes**, à bióloga **Tatiane de Lima G. Torregrossa** e ao biólogo **Douglas Nogueira Seron** (Alemão) pela ajuda na fecundação *in vitro* e pelas madrugadas de cultivo.

- À colega de pós-graduação **Janaína T. Carreira** pela participação direta na análise do sêmen pelas sondas fluorescentes e na finalização desse trabalho. Obrigado pela força e amizade.

- Ao amigo **Daniel Bartoli de Sousa** e a estagiária **Ângela**, que não mediram esforços para o acompanhamento e desenvolvimento do projeto. Obrigado "Pepino"!

- Ao Coordenador do Curso de Medicina Veterinária da UNIRP, **Prof. Dr. Alan Peres Ferraz de Mello** pelo incentivo e apoio.

- À **Prof^{a}. Dr^{a}. Sílvia Helena Venturoli Perri** pela formulação e acompanhamento da análise estatística. Obrigado pela atenção disposta.

- À Lagoa da Serra, em especial à **Lúcia Helena Rodrigues** pelo fornecimento do sêmen usado no experimento.

- Ao **Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo** pelas dicas e disposição do laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Radiologia Veterinária e Reprodução Animal da UNESP – campus de Botucatu – SP para a análise computadorizada do sêmen.

- Aos Professores **Dr. Paulo Henrique Franceschini** (Cocão) e **Dr. Francisco Guilherme Leite** (Peixe) pela disposição e dicas na qualificação.

- Ao **Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP)** e ao laboratório **Fertvitro** pelo financiamento de parte do experimento e uso das instalações.

- À **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP)** – Câmpus de Jaboticabal pela oportunidade de realização do mestrado.

- À **Faculdade de Medicina Veterinária (UNESP) – campus de Araçatuba** – pelo fornecimento da estrutura e materiais para as análises do sêmen.

- Ao **Frigorífico Frigopoti** pelo fornecimento dos ovários usados no experimento.

- Ao amigo **Alfredo Maia Filho** pelo apoio e amizade sincera desde a graduação.

- Aos amigos e colegas de profissão **Igor, Bruno e Danilo** pelo apoio em meus momentos de ausência no laboratório Fertvitro.

- Aos colegas do laboratório Fertvitro: **Jhayson**, **Fabrício, Ellen e Karine** pela ajuda nas buscas e aspirações dos ovários.

- À todos os funcionários do **Hospital Veterinário "Dr. Halim Atique"** pelos anos de convivência, aprendizado e profissionalismo.

- A todas as pessoas que torceram por mim nessa fase da minha vida. Muito obrigado!

SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS.....iii

LISTA DE FIGURAS.....v

LISTA DE ANEXOS.....viii

LISTA DE ABREVIATURAS.....ix

RESUMO.....xiii

ABSTRACT.....xiv

I. INTRODUÇÃO.....1

II. REVISÃO DE LITERATURA.....3

2.1. Meios Diluidores.....3

2.2 Crioprotetores.....4

2.2.1. Gema de Ovo.....5

2.2.2. Extrato de Soja (Lecitina de Soja).....6

2.3. Análise do Sêmen Criopreservado.....7

2.3.1. Avaliação da Motilidade, Vigor, Concentração e Morfologia.....8

2.3.2. Análise Computadorizada do Sêmen (CASA).....9

2.3.3. Teste de Termo-resistência Lento (TTL).....10

2.3.4. Avaliação da Integridade da Membrana Plasmática.....10

2.3.4.1. Teste Hiposmótico (HIPO).....11

2.3.4.2. Iodeto de Propídeo (PI).....12

2.3.5. Avaliação da Integridade do Acrossoma.....13

2.3.5.1. *Pisum sativum* (PSA) e Isotiocionato de Fluoresceína (FITC).....13

2.3.6. Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial.....14

2.3.6.1. Carbocianina Catiônica Lipofílica (JC-1).....14

2.3.7. Avaliação da Integridade da Cromatina.....15

2.3.7.1. Laranja de Acridina (LA).....15

2.4. Produção *in vitro* de Embriões Bovinos (PIV).....16

III. OBJETIVOS.....18

3.1. Objetivo Geral.....18

3.2. Objetivos Específicos.....18

IV. HIPÓTESES.....19

V. MATERIAL E MÉTODO.....19

5.1. Local.....19

5.2. Seleção dos Animais e Colheita das Amostras.....19
5.3. Delineamento Experimental.....20
5.4. Experimento I (TESTES COMPLEMENTARES).....22
5.4.1. Motilidade e Vigor.....22
5.4.2. Avaliação da Integridade da Cromatina (AO).....23
5.4.3. Análise Computadorizada do Sêmen (CASA).....24
5.4.4. Concentração Espermática.....24
5.4.5. Morfologia Espermática.....24
5.4.6. TTL e Avaliação da Integridade do Acrossoma (PIA).....25
5.4.7. Avaliação da Integridade de Membranas.....25
5.4.8. Teste Hiposmótico (HIPO).....26
5.5. Experimento II (Produção *In Vitro* De Embriões).....27
5.5.1. Obtenção e Seleção dos oócitos.....27
5.5.2. Maturação *in vitro* dos oócitos (MIV).....29
5.5.3. Preparo do Sêmen e fecundação *in vitro* (FIV).....30
5.5.4. Cultivo *in vitro* (CIV).....31
5.5.5. Análise e Leitura dos Embriões.....31
5.6. Análise Estatística.....31
6. Resultados e Discussão.....32
6.1. Experimento I (Testes Complementares).....32
6.1.1. Motilidade, Vigor e Integridade da Cromatina.....32
6.1.2. Porcentagem de Acrossoma Intacto (PIA).....37
6.1.3. Análise Computadorizada do Sêmen (CASA).....38
6.1.4. Concentração Espermática.....40
6.1.5. Morfologia Espermática.....41
6.1.6. Sondas Fluorescentes.....41
6.1.7. Teste hiposmótico (HIPO).....46
6.2. Experimento II (Produção *in vitro* de Embriões).....49
6.3. Conclusão.....56
VI. REFERÊNCIAS.....57
VII. ANEXOS.....76

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1: Valores médios ($\bar{x}$), desvio padrão (s) e mediana (Md) das variáveis físicas (motilidade 0h, vigor 0h, DNA 0h, motilidade 3h, vigor 3h e DNA 3h) estudadas do sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da UNESP - campus Araçatuba – SP, 2008.....33

Tabela 2: Valores médios ($\bar{x}$) e desvio padrão (s) dos parâmetros espermáticos: VAP (velocidade de trajeto), VSL (velocidade linear), VCL (velocidade curvilinear), ALH (amplitude de batimento de cabeça), MT (motilidade total), MP (motilidade progressiva) e RAP (porcentagem de espermatozóides rápidos) do sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Radiologia Veterinária e Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – campus de Botucatu – SP.....38

Tabela 3: Valores médios ($\bar{x}$), desvio padrão (s) e mediana (Md) dos padrões de coloração fluorescentes obtidos pela associação das sondas FITC-PSA (aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com isotiocionato de fluoresceína), PI (iodeto de propídeo) e JC-1 (iodeto de 5, 5`, 6, 6`, - tetracloro – 1, 1, 3, 3` - tetraetilbenzimidazolilcarbocianina), após descongelação e lavagem do sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da UNESP - campus Araçatuba – SP, 2008.....43

Tabela 4: Valores médios ($\bar{x}$), desvio padrão (s) e mediana (Md) da integridade da membrana citoplasmática, integridade do acrossoma e presença de potencial mitocondrial obtidos pela associação pela associação das sondas FITC-PSA (aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com isotiocionato de fluoresceína), PI (iodeto de propídeo) e JC-1 (iodeto de 5, 5`, 6, 6`, - tetracloro – 1, 1, 3, 3` - tetraetilbenzimidazolilcarbocianina), após descongelação e lavagem do sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da UNESP - campus Araçatuba – SP, 2008.....44

Tabela 5: Valores médios ($\bar{x}$) e desvio padrão (s) da % de clivagem* do sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório Fertvitro / Unirp - São José do Rio Preto – SP, 2008.....50

Tabela 6: Valores médios ($\bar{x}$) e desvio padrão (s) da % de blastocistos do sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório Fertvitro / Unirp - São José do Rio Preto – SP, 2008.....52

Tabela 7: Valores médios ($\bar{x}$) e desvio padrão (s) da % de blastocistos eclodidos em relação ao numero de blastocistos no D7 do sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório Fertvitro / Unirp - São José do Rio Preto – SP, 2008.....55

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Delineamento experimental com as etapas: colheita do sêmen, fracionamento do ejaculado, adição do diluidor A (Tris e gema de ovo) e B (Andromed®), congelação do sêmen e realização dos experimentos I (Testes complementares do sêmen congelado) e II (Produção *in vitro* de embriões).....21

Figura 2. Representação esquemática dos padrões de coloração dos espermatozóides obtidos pela associação das sondas fluorescentes.....26

Figura 3. Aspiração de folículos ovarianos de ovários obtidos de animais abatidos em abatedouro (Frigopoti / Potirendaba – SP). Laboratório Fertvitro / Unirp - São José do Rio Preto – SP, 2008.....28

Figura 4. Procura e seleção dos oócitos aspirados de folículos presentes nos ovários obtidos de animais abatidos em abatedouro (Frigopoti / Potirendaba – SP). Laboratório Fertvitro / Unirp - São José do Rio Preto – SP, 2008.....28

Figura 5. Fotomicrografia de oócitos bovinos imaturos aspirados de folículos antrais obtidos de ovários de animais obatidos em abatedouro (Frigopoti / Potirendaba), observados em aumento de 100x. Laboratório Fertvitro / Unirp - São José do Rio Preto – SP, 2008.....29

Figura 6. Fotomicrografia de oócitos bovinos maturados *in vitro* em estufa a 38,5ºC, com 5% de CO_2 em ar e umidade relativa de 99% por 24hs . Aumento (200x). Laboratório Fertvitro / Unirp - São José do Rio Preto – SP, 2008.....30

Figura 7. Valores médios da motilidade espermática subjetiva logo após a descongelação (MOT 0h) e após a realização do teste de termo resistência lento (MOT 3hs) do sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da UNESP - campus Araçatuba – SP, 2008.....33

Figura 8. Valores médios do vigor espermático logo após a descongelação (MOT 0h) e após a realização do teste de termo resistência lento (MOT 3hs) do sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da UNESP - campus Araçatuba – SP, 2008.....34

Figura 9. Percentagens de acrossoma intacto (PIA) do sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja) após realização do teste de termo resistência lento. Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da UNESP - campus Araçatuba – SP, 2008.....37

Figura 10. Percentagens de defeitos maiores e defeitos menores segundo Blom (1973) do sêmen congelado de quatro touros com o diluidore A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da UNESP - campus Araçatuba – SP, 2008.....41

Figura 11. Fotomicrografia de espermatozóide com acrossoma lesado, membrana citoplasmática lesada e com baixo potencial mitocondrial (esquerda). Espermatozóide com acrossoma íntegro, membrana citoplasmática lesada e com baixo potencial mitocondrial (direita). (FITC-PSA, JC-1, PI, aumento 400x). Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da UNESP - campus Araçatuba – SP, 2008.....42

Figura 12. Percentagens de acrossoma íntegros, membrana plasmática íntegra e com potencial mitocondrial do sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da UNESP - campus Araçatuba – SP, 2008.....45

Figura 13. Fotomicrografia de espermatozóides reativos ao HIPO (membrana funcional). Aumento (1000x). Laboratório Fertvitro / Unirp - São José do Rio Preto – SP, 2008.....47

Figura 14. Percentagens de células reativas ao HIPO do sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório Fertvitro / Unirp - São José do Rio Preto – SP, 2008.....48

Figura 15. Valores médios da taxa de clivagem obtida com o sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório Fertvitro / Unirp - São José do Rio Preto – SP, 2008.....50

Figura 16. Valores médios de blastocistos produzidos *in vitro* pelo sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório Fertvitro / Unirp - São José do Rio Preto – SP, 2008.....53

Figura 17. Fotomicrografia de blastocistos produzidos *in vitro* no D7 após a FIV. Aumento (1000x). Laboratório Fertvitro / Unirp - São José do Rio Preto – SP, 2008.....54

Figura 18. Fotomicrografia de blastocistos produzidos *in vitro* no D9 após a FIV, detalhando a eclosão embrionária (seta branca). Aumento (500x). Laboratório Fertvitro / Unirp - São José do Rio Preto – SP, 2008.....55

Figura 19. Valores médios de embriões blastocistos eclodidos produzidos *in vitro* pelo sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório Fertvitro / Unirp - São José do Rio Preto – SP, 2008.....56

LISTA DE ANEXOS

Página

VII. ANEXOS.....76

7.1.1. Tris-Gema de Ovo.....76

7.1.2. CASA - Hamilton IVOS 12.3 – *Setup* 12.3.....77

7.1.3. Solução de Frutose À 100 Mosm/Kg, empregado para realização do Hipo.....78

7.1.4. Meio para Transporte de Ovários.....78

7.1.5. Meio de Manutenção de Oócitos.....78

7.1.6. Meio de Maturação *In Vitro* (Meio Miv).....79

7.1.7. Meio de Fecundação *In Vitro* (Meio Fiv).....79

7.1.8. Meio Sêmen-Talp.....80

7.1.9. Meio de Cultivo *In Vitro* (Meio Civ).....80

LISTA DE ABREVIATURAS

ALH = Amplitude de batimento de cabeça

ANOVA = Análise de variância

ATP = Adenosina trifosfato

BCF = Freqüência de batimento de cauda

BE = Blastocisto eclodido

BI = Blastocisto inicial

BL = Blastocisto

BSA = Albumina sérica bovina

BX = Blastocisto expandido

CASA = Computer-assisted semen analyses

CFDA = Diacetato de carboxifluoresceína (CFDA)

CIV = Cultivo *in vitro*

CO_2 = Dióxido de carbono

°C = Graus centígrados

D0 = Dia zero

D2 = Dia dois

D4 = Dia quatro

D7 = Dia sete

D9 = Dia nove

DIC = Interferência diferencial de fase

DMSO = Dimetilsulfoxide

DNA = Ácido desoxirribunucleico

FITC-PSA = Isotiocionato de fluoresceína - *Pisum sativum*

FIV = Fecundação *in vitro*

FSH = Hormônio folículo estimulante

g = gramas

G = Gauge

hCG = Gonadotrofina coriônica humana

HEPES / **H 199** = N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid); 4 (2Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid

h = Hora

hs = Horas

HIPO = Teste hiposmótico

IA = Inseminação artificial

IIC = Acrossoma íntegro, membrana citoplasmática íntegra e com potencial mitocondrial

IIS = Acrossoma íntegro, membrana citoplasmática íntegra e sem potencial mitocondrial

ILC = Acrossoma íntegro, membrana citoplasmática lesada e com potencial mitocondrial

ILS – Acrossoma íntegro, membrana citoplasmática lesada e sem potencial mitocondrial

JC-1 = Carbocianina catiônica lipofílica (iodeto de 5,5 6,6 tetracloro 1,1 3,3 tetraetilbenzimidazolocarbocianina)

KCL = Cloreto de potássio

Kg = Quilo

LA = Laranja de Acridina

LDL = Fração lipoprotéica de baixa densidade da gema de ovo

LIC = Acrossoma lesado, membrana citoplasmática íntegra e com potencial mitocondrial

LIN = Linearidade

LIS = Acrossoma lesado, membrana citoplasmática íntegra e sem potencial mitocondrial

LLC = Acrossoma lesado, membrana citoplasmática lesada e com potencial mitocondrial

LLS = Acrossoma lesado, membrana citoplasmática lesada e sem potencial mitocondrial

M = Molar

Md = Mediana

MIV = Maturação *in vitro*

mL = Mililitros

mm = Milímetros

mM = Milimolar

MO = Mórula

MOT 0H = Motilidade analisada logo após a descongelação do sêmen

MOT 3Hs = Motilidade analisada após 3 horas de incubação do sêmen

MT = Motilidade espermática total

MP = Motilidade espermática progressiva

mOsm/L = Osmolaridade

nm = Nanômetros

O_2 = Oxigênio

OPU = Ovum Pick Up - Aspiração folicular transvaginal

PHE = Penicilamina, hipotaurina e epinefrina

PI = Iodeto de propídeo

PIA = Porcentagem de acrossoma intacto

PIV = Produção *in vitro* de embriões

PSA = Aglutinina de *Pisum sativum*

PVP = Polivinil pirrolidona

RAP = Porcentagem de espermatozóides com movimento rápido

S = Desvio padrão

SAS = “Statistical Analysis System”

SFB = Soro fetal bovino

SPTZ = Espermatozóides

STR = Retilinearidade

TALP = Tyrode´s albumin lactate and pyruvate

TRIS = Tris-hidroximetil-aminometano - H2NC (CH2OH) 3

TTL = Teste de termo-resistência lento

UI = Unidades internacionais

VCL = Velocidade curvilinear

VAP = Velocidade de trajeto

VSL = Velocidade linear

µL = Microlitros

µg = Microgramas

< = Menor

> = Maior

% = Percentagem

COMPARAÇÃO DE DOIS DILUIDORES PARA O ARMAZENAMENTO DE SÊMEN BOVINO UTILIZADO NA FECUNDAÇÃO *IN VITRO.*

RESUMO – O processo de criopreservação afeta a capacidade funcional dos espermatozóides, diminuindo a fertilidade. Tendo conhecimento desses danos a diluição do sêmen é necessária antes de submetê-lo ao choque térmico. O objetivo deste trabalho foi avaliar o sêmen bovino congelado com dois diferentes diluidores. O ejaculado de quatro touros foi dividido em duas partes iguais, uma delas submetida ao diluidor Tris e gema de ovo (A) e a outra ao diluidor à base de lecitina de soja (Andromed®) (B). Após a diluição o sêmen foi congelado e armazenado em nitrogênio líquido de acordo com os padrões pré-estabelecidos da central de inseminação artificial. No experimento I, cinco palhetas do diluidor A e B de cada touro foram descongeladas e avaliadas quanto à motilidade (análise subjetiva e computadorizada), vigor, concentração, morfologia espermática e teste de termo-resistência lento (TTL), avaliação da integridade de membranas por meio da associação das sondas Iodeto de Propídio (PI), Isotiocionato de Fluoresceína - *Pisum sativum* (FITC-PSA) e Carbocianina Catiônica Lipofílica (JC-1) e avaliação funcional da membrana plasmática através do teste hiposmótico (HIPO). A avaliação da integridade da cromatina foi realizada pelo método de coloração com laranja de acridina (LA). No experimento II, o sêmen congelado com os diferentes diluidores foi utilizado na fecundação *in vitro* (FIV), sendo observada as taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário *in vitro*. A análise estatística foi efetuada através dos testes de Análise de Variância (ANOVA), teste de Tukey e teste de Wilcoxon. Em relação aos resultados obtidos com os experimentos I e II não foi observado diferença estatística entre os diluidores testados, concluindo-se que o diluidor composto por lecitina de soja pode substituir o diluidor composto por Tris e gema de ovo, respeitando as variações individuais de cada touro utilizado no presente experimento.

Palavras Chaves: Bovinos, diluidores, embriões, fecundação *in vitro* e sêmen.

COMPARISON OF TWO EXTENDERS FOR STORING BOVINE SEMEN USED FOR *IN VITRO* FERTILIZATION.

ABSTRACT – The cryopreservation process affects sperm functional capacity, diminishing fertility. Being aware of such damage, semen dilution is required before thermal shock. This paper aims to assess bovine semen frozen with two distinct extenders. The ejaculate of four bulls was divided into two equal parts, one subjected to egg-yolk-Tris diluter (A) and the other one to a soy-lecithin based part (Andromed®) (B). After dilution, semen was frozen and stored in liquid nitrogen according to pre-established patterns of the artificial insemination center. In experiment I, five pallets of diluter A and B of each bull were thawed and assessed regarding motility (subjective and computerized analysis), vitality, concentration, spermatic morphology and slow thermoresistance (STR), evaluation of membrane integrity through association of propidium iodite probes (PI), fluorescein isotiocianate - *Pisum sativum* (FITC-PSA) and lipophilic cationic carbocyanine (JC-1) and functional evaluation of the plasmatic membrane through Hyposmotic Swelling Test (HOST). An evaluation of chromatin integrity was performed by the acridine orange staining procedure. In experiment II, the semen frozen with distinct extenders was used for *in vitro* fertilization (IVF), with observance of cleavage rates and *in vitro* embryo development. The statistical analysis was performed through the Analysis of Variance (ANOVA), Tukey´s test and Wilcoxon test. Concerning the results obtained with experiments I and II, any statistical difference between the tested extenders has been identified, which leads to the conclusion that the extender composed of soy lecithin may substitute the egg-yolk-Tris diluter, respecting individual variations of each bull used in this experiment.

Keywords: Bovines, extenders, embryos, *in vitro* fertilization and semen.

I. INTRODUÇÃO

Com a descoberta do uso do glicerol como crioprotetor há 50 anos, o armazenamento de sêmen foi revolucionado.

Essa importante inovação possibilitou que os espermatozóides pudessem ser congelados por um período prolongado e depois usados com sucesso na inseminação artificial (IA) (HOLT, 2000) e mais tarde, em programas de produção *in vitro* de embriões (PIV) (LEIBFRIED-RUTLEGE, 1999) permitindo uma melhora na seleção genética em bovinos (MEDEIROS et al., 2002; AIRES et al., 2003).

A criopreservação contribui para a preservação de espécies em extinção, tratamentos da infertilidade humana (WATSON, 2000) e permite o aprofundamento dos conhecimentos relativos aos processos fisiológicos e bioquímicos da espécie em interesse (GONÇALVES, 2002).

No Brasil, no ano de 2007, foram comercializadas entre doses nacionais e importadas, 7.496.324 doses de sêmen congelado de touros de aptidão leiteira e de corte a serem usados em programas de IA e PIV (ASBIA, 2008).

O processo de criopreservação afeta a capacidade funcional dos espermatozóides, diminuindo a fertilidade (CELEGHINI et al., 2007).

Segundo Watson (2000), as lesões provocadas pela criopreservação dos espermatozóides têm sido atribuídas às mudanças de temperatura, formação de cristais de gelo, danos oxidativos, alterações de membrana, composição e toxicidade dos diluidores e ao estresse osmótico. Somente 40% a 50% da população espermática sobrevivem ao processo de criopreservação (CURRY, 2000).

As células sobreviventes à descongelação podem apresentar lesões que diminuem a motilidade, a capacitação espermática e a reação acrossomal, diminuindo a fertilidade do macho (MARTIN et al., 2004; NAGY et al., 2004; TARTAGLIONE & RITTA, 2004; CELEGHINI et al., 2007) ainda podendo causar danos ao desenvolvimento embrionário precoce ou à embriogênese (WATSON, 2000; SAACKE et al., 2000; D'OCCHIO et al., 2007; KHALIFA et al., 2008).

A diluição do sêmen é imprescindível antes de submetê-lo à congelação. Os diluidores são utilizados com a finalidade de proteger os

espermatozóides, oferecendo condições mínimas de sobrevivência no trato reprodutivo da fêmea para que ocorra a fertilização.

A proteção oferecida durante a fase de desidratação, congelação e a estabilização da bicamada lipídica, depende das substâncias que compõem o diluidor (CROWE, 1987), onde as mais comuns são: substâncias iônicas e não iônicas para manutenção da osmolaridade, crioprotetores contra o choque térmico, uma fonte de energia e aditivos, como enzimas e antibióticos (VISHWANATH & SHANNON, 2000; AIRES et al., 2003).

Além disso, diluidores que contêm produtos de origem animal, como a gema do ovo e o leite, podem trazer riscos de contaminação por bactérias ou outros microorganismos, sendo uma possível fonte de endotoxinas capazes de afetar a capacidade de fecundação dos espermatozóides (BOUSSEAU et al., 1998).

Do ponto de vista sanitário, para a comercialização internacional do sêmen bovino, o uso de diluidores quimicamente definidos compostos de substâncias de origem vegetal é recomendado em relação aos diluidores tradicionais, compostos por substâncias de origem animal (JANUSKAUSKAS et al., 2000).

O objetivo deste trabalho foi avaliar através de testes complementares e a PIV, a proteção e viabilidade oferecida aos espermatozóides bovinos utilizando um diluidor composto por proteína vegetal, no caso, o extrato de soja e compará-lo com um diluidor à base de gema de ovo.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. MEIOS DILUIDORES

Os espermatozóides não sobrevivem por muito tempo no sêmen *in natura*, mesmo se conservados em temperaturas mais baixas. Por essa razão adicionam-se os diluidores, para melhorar ou manter o meio que envolve os espermatozóides, fornecendo suplemento energético e proteção contra produtos do metabolismo e às mudanças de temperatura. Um diluidor desejável deverá prover energia e nutrientes ao sêmen armazenado (i), fornecer ação tamponante para compensar as alterações no pH causado pela formação de ácido láctico (ii), fornecer proteção contra o resfriamento rápido e choque térmico (iii), manter a pressão osmótica ideal e o balanço de eletrólitos para o meio (iv), inibir o crescimento de microorganismos, incluindo aqueles que são patológicos (v), além de aumentar o volume do ejaculado inicial para que possa ser usado em muitos animais (vi) (CONCANNON & BATTISTA, 1989; HERMAN et al., 1996; VISHWANATH & SHANNON, 2000).

A interação entre o meio diluidor e os espermatozóides representa um fator crucial para a preservação da integridade espermática e habilidade de fertilização (MANJUNATH et al., 2002), onde o preparo e a composição do meio diluidor podem interferir na qualidade do sêmen criopreservado (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000; SNOECK et al., 2007).

Durante décadas vários pesquisadores testaram diferentes diluidores na criopreservação do sêmen de bovinos (PACE & GRAHAM, 1974; BECKER et al., 1977; JEYENDRAN & GRAHAM, 1980; FOOTE & ARRIOLA, 1987; LONERGAN et al., 1993; BOUSSEAU et al., 1998; GIL et al., 2000; MOUSSA et al., 2002; THUN et al., 2002; AIRES et al., 2003; AMIRAT et al., 2004; JANET et al., 2005; MUINO et al., 2007), pequenos ruminantes (GIL et al., 2003; MAIA, 2006; FUKUI et al., 2008), búfalos (CHACUR, 1996; HEROLD et al., 2006), eqüinos (PAGL et al., 2006; SNOCK et al., 2007), suínos (GONSALES et al., 1999), cães (SILVA et al., 2000; NÖTHLING et al., 2007) e coelhos (DALIMATA & GRAHAM, 1997).

Porém, diluidores compostos por diferentes substâncias protegem de forma variada as células espermáticas entre diferentes espécies e indivíduos da mesma espécie (HOLT, 2000).

Um dos aditivos mais estudados e avaliados nos diluidores são os crioprotetores. O glicerol, a lipoproteína de baixa densidade da gema de ovo (LDL) e o leite são habitualmente usados para a criopreservação do sêmen bovino (MUINO et al., 2007).

2.2. CRIOPROTETORES

Uma das etapas mais importantes para o sucesso da criopreservação espermática é a escolha do crioprotetor a ser usado (HINSCH et al., 1997a), são necessários para a prevenção da formação de cristais de gelo intracelular e redução das injúrias da membrana durante e após a congelação (AMIRAT et al., 2004). Assim não causam danos à estrutura e a fisiologia dos espermatozóides (MEDEIROS et al., 2002), parâmetros esses necessários para a manutenção da fertilidade (THUN et al., 2002).

Polge et al. (1949) descobriram o efeito crioprotetor do glicerol. Essa importante observação possibilitou que os espermatozóides poderiam ser congelados e armazenados por muito tempo (HOLT, 2000). Depois dessa descoberta muitos outros crioprotetores foram desenvolvidos e testados (CURRY, 2000).

Diversos estudos testaram a eficácia do glicerol em diferentes concentrações (HAMMERSTEDT et al., 1990; WATSON, 1995; AIRES et al., 2003). Ele é classificado como crioprotetor penetrante, promovendo uma proteção intracelular, devido às ligações de hidrogênio com as moléculas de água, criando assim um ambiente menos nocivo para as células (DALIMATA & GRAHAM, 1997).

Tem sido o crioprotetor penetrante mais utilizado no processamento do sêmen bovino (VISHWANATH & SHANNON, 2000; MEDEIROS et al., 2002; GONZALEZ, 2004), com concentrações em torno de 0,25 M (2,25%) a 1 M (9%), sendo que esta última concentração tem sido tóxica aos espermatozóides (FAHY, 1986), causando danos à membrana e motilidade (MEDEIROS et al., 2002).

Outros crioprotetores penetrantes utilizados em meios diluidores para congelação de sêmen em animais domésticos são: os álcoois, etanol, etilenoglicol, metanol e polietilenoglicol (DE LEEUW et al., 1993) as amidas, incluindo a acetamida, formamida, lactamida e o dimetilsulfoxide (DMSO) (JEYENDRAN & GRAHAM, 1980; ASHWOOD–SMITH, 1987; NIEMANN, 1991; SNOECK, 2003).

Porém, para a sobrevivência espermática ao processo de criopreservação, o uso de crioprotetores não-penetrantes também é necessária, promovendo um meio hipertônico que induz a saída de água das células ocasionando uma desidratação, ou seja, eles agem no meio extracelular, reduzindo assim a possibilidade da formação de cristais de gelo. Eles são representados por moléculas de alto peso molecular, como os açúcares, lipoproteínas da gema do ovo e proteínas do leite (AMANN & PICKET, 1987).

2.2.1. GEMA DE OVO

A gema de ovo é um dos principais crioprotetores não-penetrantes e é muito utilizada em associação ou não com outros componentes (AMIRAT et al., 2004). Seu principal benefício é fornecer uma fração LDL que previne a perda de fosfolipídios da membrana, aumentando assim a tolerância ao choque térmico e ao processo de congelação. O glicerol e a gema de ovo atuam sinergicamente, protegendo a membrana celular (PACE & GRAHAM, 1974; HOLT, 2000; VISHWANATH & SHANNON, 2000; MOUSSA et al., 2002; THUN et al., 2002; AMIRAT et al., 2004; BERGERON et al., 2004).

Os diluidores usados para criopreservação de espermatozóides bovinos geralmente contêm em torno de 20% de gema de ovo (HINSCH et al., 1997a; AMIRAT et al., 2004; SNOECK et al., 2007).

Apesar de seus efeitos benéficos a gema de ovo apresenta alguns inconvenientes, como à possibilidade de contaminação com subseqüente produção de endotoxinas capazes de prejudicar a capacidade de fecundação dos espermatozóides (BOUSSEAU et al., 1998; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al. 2000; THUN et al., 2002; AIRES et al., 2003; PAGL et al., 2006). Além disso, a gema de ovo é de difícil padronização (WALL & FOOTE, 1999).

Ela contém substâncias que podem inibir a atividade mitocondrial dos espermatozóides diminuindo sua motilidade (PACE & GRAHAM, 1974) e hormônios esteróides que podem diminuir a capacidade de fecundação dos espermatozóides (MUINO et al., 2007). Como também pode interferir na análise microscópica do sêmen pela presença de glóbulos de gordura (VISHWANATH & SHANNON, 2000).

Uma das alternativas seria a pasteurização da gema de ovo (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000), a sua separação e o uso da fração crioprotetora, a LDL (AMIRAT et al., 2004) ou o uso de diluidores quimicamente definidos compostos por produtos de origem vegetal (HINSCH et al., 1997a).

Houve várias tentativas de se substituir a gema de ovo por componentes definidos e estáveis (VISHWANATH & SHANNON, 2000; AMIRAT et al., 2004; MUINO et al., 2007) como o extrato de soja (AIRES et al., 2003).

Embora uma grande quantidade de diluidores livres de produtos de origem animal esteja disponível comercialmente (HINSCH et al., 1997a), a gema de ovo ainda é amplamente usada como crioprotetor (MUINO et al., 2007).

2.2.2. EXTRATO DE SOJA (LECITINA DE SOJA)

Dois dos primeiros diluidores disponíveis, compostos por substâncias de produtos não originados de animais, são o Biociphos Plus® (IMV®, L'Aigle, France) e o Andromed® (Minitub®, Tiefenbach, Germany). São compostos por extrato de soja e já foram testados por vários grupos de pesquisadores (MUINO et al., 2007) onde foi provada a viabilidade do uso desses para a congelação espermática (HINSCH et al., 1997 a,b; GIL et al., 2000; AIRES et al., 2003; JANETT et al., 2005).

No entanto, outros pesquisadores não encontraram resultados positivos em relação à crioproteção espermática com o uso de diluidores livres de proteína animal (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al. 2000; HEROLD et al. 2006; MUINO et al., 2007; NÖTHLING et al. 2007; FUKUI et al., 2008).

2.3. ANÁLISE DO SÊMEN CRIOPRESERVADO

Para que o espermatozóide seja considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil é necessário que possua morfologia, atividade metabólica e membranas normais (YANAGIMACHI et al., 1994).

Os danos causados aos espermatozóides durante o processo de criopreservação podem resultar na redução de células viáveis. Iniciam-se na membrana plasmática atingindo posteriormente a membrana acrossomal e por último às membranas mitocondriais afetando o movimento progressivo dos espermatozóides e consequentemente a fertilidade (WATSON, 2000).

Considerando a importância tanto biológica como econômica do sêmen congelado de touros, é necessário avaliar os danos irreversíveis impostos pela criopreservação (TARTAGLIONE & RITTA, 2004).

Nenhum teste isolado é capaz de predizer a fertilidade de uma amostra de sêmen, mas o exame de várias características físicas pode determinar uma maior fertilidade potencial. Os métodos de avaliação da qualidade de sêmen congelado estão associados com a motilidade e acrossomas intactos (HERMAN et al., 1996; HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Normalmente as avaliações realizadas no sêmen criopreservado incluem volume, aspecto, motilidade, concentração, morfologia espermática (MARCHETTI et al., 2004, RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005) e teste de termo-resistência (DIMITROPOULOS, 1967), porém, a avaliação da capacidade de fecundação também deve incluir testes que predizem a competência funcional dos espermatozóides (PETRUNKINA et al., 2007) contribuindo para a identificação de indivíduos sub-férteis (GADEA et al., 2004).

A maioria desses testes avaliam aspectos funcionais e estruturais como a integridade das membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e a reação acrossomal (HOLT, 2000).

Assim, avaliações sofisticadas foram desenvolvidas, como a análise computadorizada da motilidade espermática e a integridade de membranas e DNA com sondas fluorescentes (AURICH, 2005; SILVA & GADELLA, 2006; PETRUNKINA et al., 2007).

Esses exames são quantitativos, sensíveis e permitem repetibilidade. São usados em laboratórios modernos de andrologia como rotina, sendo

considerados como promissores na avaliação individual da fertilidade em animais domésticos (CHRISTENSEN et al., 2005; PETRUNKINA et al., 2007).

2.3.1. AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE, VIGOR, CONCENTRAÇÃO E MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

A motilidade espermática tem sido reconhecida por muito tempo como a característica mais importante na avaliação da fertilidade do sêmen, pois ela é responsável pelo transporte do espermatozóide ao longo do genital feminino, (VERSTEGEN et al., 2002), sendo requisito básico para que ocorra a fertilização (SCHOBER et al., 2007). É um teste simples e de rápida execução (FOOTE, 2003). Uma diminuição na motilidade é observada em espermatozóides que são submetidos ao processo de criopreservação (WATSON, 2000; OEHNINGER et al., 2000).

A avaliação subjetiva dessa característica tem sido utilizada como meio de qualificar o sêmen após a descongelação, (LASLEY, 1944; SWANSON & HERMAN, 1944; JOHNSTON et al., 1952; HERMAN et al., 1996). Alguns pesquisadores contestam a correlação entre a motilidade e a fertilidade (SCHOBER et al., 2007), uma vez que o espermatozóide pode estar móvel, mas danificado, impedindo a penetração e fertilização do oócito (SALAMON & MAXWELL, 1995).

Já Amirat et al. (2004) afirmam que tanto a fertilização *in vitro* (FIV), o teste hiposmótico (HIPO) e a integridade do acrossoma devem ser relacionados com a motilidade espermática.

O vigor e a a motilidade são as avaliações mais antigas para predizer a qualidade seminal à campo (FONSECA, 1999).

Barth & Oko (1989) descreveram a importância da morfologia espermática na identificação de anormalidades na motilidade progressiva e na espermatogênese, refletindo a integridade dos túbulos seminíferos epidídimos e glândulas anexas. Blom (1973) classificou as patologias espermáticas em dois grupos: defeitos maiores (relacionados com a espermatogênese) e defeitos menores.

2.3.2. ANÁLISE COMPUTADORIZADA DO SÊMEN (COMPUTER-ASSISTED SEMEN ANALYSES - CASA)

Os sistemas computadorizados de avaliação do movimento espermático (CASA) vêm substituindo as técnicas de análise subjetiva em laboratório de pesquisa em andrologia e de centros de processamento de sêmen (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1997).

As primeiras pesquisas com o CASA foram iniciadas em 1979, por Dott e Foster com o sêmen de bovinos, suínos, coelhos, ratos e carneiros (SCHÄFER-SOMI & AURICH, 2007).

O CASA identifica precisamente células móveis e imóveis de uma amostra de sêmen e o registro das trajetórias espermáticas individuais oferecendo automatização, rapidez e a possibilidade de repetição nas avaliações (FARRELL et al., 1997).

Os valores individuais e médios das variáveis do movimento espermático são calculados, dentre as quais se destacam: motilidade espermática total (MT), motilidade espermática progressiva (MP), velocidade curvilinear (VCL), velocidade de trajeto (VAP), velocidade linear (VSL), linearidade (LIN), retilinearidade (STR), amplitude de batimento de cabeça (ALH), freqüência de batimento de cauda (BCF), porcentagem de espermatozóides com movimento rápido (RAP) e concentração espermática (BOYER et al., 1989; VERSTEGEN et al., 2002).

A análise computadorizada de sêmen foi relatada em humanos (MARCK et al., 1988; MACLEOD & IRVINE, 1995), eqüinos (FERREIRA et al., 1997; BALL et al., 2001), ovinos (SOUSA et al., 1999), bovinos (FARRELL et al., 1997; BOERSMA et al., 2001; JANUSKAUSKAS et al., 2001), búfalos (MANDAL et al., 2003), cães (GÜNZEL-APEL et al., 1993; IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 2001; PENA et al., 2006; SCHÄFER-SOMI & AURICH, 2007) e ratos (SLOT et al., 1993).

2.3.3. TESTE DE TERMO-RESISTÊNCIA LENTO (TTL)

O teste de termo-resistência foi proposto por Dimitropoulos (1967) para avaliação de partidas de sêmen congelado bovino, sendo posteriormente, adaptado para as demais espécies.

Tem sido estudado há muito tempo mostrando uma relação positiva das características seminais, mensuradas em laboratório e a fertilidade (PAPA et al., 2005).

A motilidade progressiva e o vigor espermático são as características seminais analisadas logo após a incubação do sêmen (ZUCCARI, 1998).

O sêmen bovino será de boa qualidade quando, depois de submetido ao teste de termo-resistência, apresenta pelo menos 15% de motilidade espermática progressiva retilínea e 3 de vigor espermático (escala de 0 a 5) (CBRA, 1998).

Vários pesquisadores relataram que o TTL é um importante teste a ser realizado na rotina de avaliação do sêmen congelado e descongelado (CASAGRANDE et al., 1980; ARRUDA, 1988).

2.3.4. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA

A membrana plasmática envolve toda a célula espermática e mantém as organelas e componentes citoplasmáticos em um mesmo ambiente: por ser semi-permeável, retém os gradientes químicos, íons e outros solutos. Proteínas específicas da membrana facilitam o transporte de glicose e frutose do meio externo para dentro da célula (SCHURMANN & AXER, 2002).

Esses transportes são indispensáveis para o ganho de energia da célula, já que em uma célula adulta, 90% de seu ATP são produzidos por meio de glicólise anaeróbica (MUKAI & OKUNO, 2004; MARIN et al., 2003).

Tanto a membrana plasmática, acrossomal e mitocondrial são vulneráveis ao processo de criopreservação espermática (THUN et al., 2002).

A susceptibilidade ao choque térmico entre as espécies pode estar associada com a composição lipídica da membrana plasmática (MEYERS,

2005), em proteínas específicas e no citoesqueleto pela mudança da temperatura (WATSON, 2000).

Sua integridade é essencial para o metabolismo normal do espermatozóide, capacitação e reação acrossômica, podendo ser também usada para avaliar a viabilidade do espermatozóide (REVELL & MRODE, 1994; GARNER et al., 1997; JANUSKAUSKAS et al., 2000; BRITO et al., 2003).

Para sua avaliação foi desenvolvido o teste hiposmótico (HIPO), que avalia a função bioquímica e recentemente as sondas fluorescentes, que avaliam a integridade da membrana plasmática (BRITO et al., 2003).

2.3.4.1. TESTE HIPOSMÓTICO (HIPO)

Durante o processo de maturação espermática, ejaculação e fertilização o espermatozóide atravessa mudanças osmóticas (YEUNG et al., 2004). Além disso, durante o processo de criopreservação, as células sofrem desafios osmóticos adicionais (PETRUNKINA et al., 2007) podendo afetar a integridade da membrana plasmática (AURICH, 2005).

As células quando submetidas a diferenças osmóticas, tendem a restabelecer um equilíbrio (PETRUNKINA et al., 2007), na tentativa de ajustar o seu volume celular (YEUNG et al., 1999). Alguns testes são capazes de avaliar a capacidade de ajuste do volume celular (PETRUNKINA et al., 2007).

O HIPO foi usado originalmente para predizer a integridade funcional da membrana plasmática de espermatozóides em humanos (JEYENDRAN et al., 1984; AMIRAT et al., 2004), tornando-se um teste complementar importante na avaliação *in vitro* do sêmen criopreservado (MELLO et al., 2005).

O teste baseia-se na observação de que um espermatozóide, com uma membrana celular íntegra, se colocado em solução hiposmótica, permite a passagem da água pela mesma até o restabelecimento do equilíbrio osmótico entre os fluídos extra e intracelulares. Com o influxo da água para a célula, há um aumento do volume celular (edema), com posterior dobramento da cauda, torcendo-se em helicoidal (reação positiva), sinal esse de que a membrana está fisicamente e funcionalmente intacta, ou seja, bioquimicamente ativa (JEYENDRAN et al., 1984; ROTA et al., 2000; AMIRAT et al., 2004).

Nas células espermáticas com membrana plasmática lesada não acontece o influxo de água e aumento do volume celular, com isso não há o dobramento da cauda. Enquanto técnicas de coloração avaliam o dano físico da membrana, o HIPO também avalia a atividade bioquímica desse compartimento celular (BRITO et al., 2003).

Foi considerado como um indicador de fertilidade em diversas espécies: humanos (JEYENDRAN et al., 1984; VAN DER VEN et al., 1986; CHAN, et al., 1991; HOSSAIN et al., 1998), eqüinos (NIE, 1998; MELLO & HENRY, 1999; NEILD et al., 1999; ALVES et al., 2004), caninos (KUMI-DIAKA, 1993), ovinos (OBERST et al., 2003), caprinos (FONSECA et al., 2001; SALGUEIRO et al., 2003), suínos (PÉREZ-LLANO et al., 2001) e touros (CORREA et al., 1997; ROTA et al., 2000; TARTAGLIONE & RITTA, 2004).

Consiste em um método fácil, acessível e barato (CORREA & ZAVOS, 1994; TARTAGLIONE & RITTA, 2004).

Revell & Mrode (1994) correlacionaram positivamente o HIPO com a fertilidade em programas de IA na espécie bovina. Já Rota et al. (2000) observaram uma baixa correlação entre HIPO e FIV na mesma espécie.

O HIPO deve ser associado com outras avaliações como a integridade estrutural da membrana plasmática, realizados pela associação de sondas fluorescentes permitindo uma avaliação rápida e precisa da viabilidade espermática (GARNER et al., 1997).

2.3.4.2. IODETO DE PROPÍDIO (PI)

Para a avaliação da membrana plasmática várias sondas fluorescentes podem ser utilizadas, como o Brometo de Etídio (HALANGK et al., 1984), corantes supravitais Hoechst 33258 (H258), 33342 (H342), (CASEY et al., 1993), SYBR-14 (GARNER et al., 1997) e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) (SOUZA, 2001).

Todavia, o PI vem se destacando em pesquisas pela sua facilidade de preparação, aplicação da técnica, estabilidade e eficiência na avaliação da integridade da membrana plasmática, além de apresentar êxito nos resultados, tanto com o sistema de citometria de fluxo quanto em microscopia de

epifluorescência. Esta sonda possui afinidade ao DNA e cora em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada, espermatozóides viáveis apresentam a membrana plasmática impermeável ao PI, com isso seus núcleos não são corados (PAPAIOANNOU et al., 1997; CELEGHINI, 2005).

2.3.5. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO ACROSSOMA

2.3.5.1. *PISUM SATIVUM* (PSA) E ISOTIOCIONATO DE FLUORESCEÍNA (FITC)

A extremidade anterior do núcleo espermático é recoberta pelo acrossoma, uma fina cobertura com dupla camada de membranas que envolvem intimamente o núcleo durante os últimos estágios da formação do espermatozóide (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

É uma vesícula que contém enzimas hidrolíticas necessárias para a penetração do espermatozóide na zona pelúcida do oócito, imprescindível para a fertilização (GADELLA et al., 2000).

Espermatozóides que são incapazes de reconhecerem e se ligarem à zona pelúcida, não sofrem reação acrossomal e falham em fertilizar o oócito (TÖPFER-PETERSEN et al., 2000).

Técnicas para identificação do acrossoma sob microscopia de epifluorescência têm sido utilizadas (CASEY et al., 1993). A PSA, quando conjugada ao FITC, marca com sucesso o acrossoma na cor verde amarelado, o que facilita a visualização e a identificação dos acrossomas lesados em espermatozóides humanos (CROS et al., 1986), bovinos (GRAHAM et al., 1990; CELEGHINI, 2005), eqüinos (FARLIN et al., 1992; ARRUDA, 2000) e suínos (MATTIOLI et al., 1996).

Nagy et al. (2004) observaram que após a descongelação de espermatozóides bovinos 3,45% das células apresentavam danos acrossomais aumentando para 67% após 4 horas de incubação a 37°C.

Saacke & White (1972) mostraram correlações positivas em acrossomas normais e fertilidade à campo. Já Den Daas (1997) não encontrou nenhuma correlação.

2.3.6. AVALIAÇÀO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

2.3.6.1. CARBOCIANINA CATIÔNICA LIPOFÍLICA (JC-1)

As mitocôndrias espermáticas estão localizadas na peça intermediária. São responsáveis pela produção de ATP (Adenosina Trifosfato) pelo processo de fosforilação oxidativa, fornecendo suplemento energético para os batimentos flagelares (COSSON, 1996).

A motilidade e o metabolismo espermático dependem da energia produzida pela mitocôndria. A danificação do potencial mitocondrial pelo choque térmico é uma das principais razões para a qualidade do sêmen pós-descongelação estar diminuída, causando danos irreversíveis às funções mitocondriais, não sendo diagnosticado por exames rotineiros de avaliação espermática (SCHOBER et al., 2007).

Existem sondas fluorescentes próprias para avaliação da funcionalidade mitocondrial, dentre as quais se destacam a JC-1 (iodeto de 5,5 6,6 tetracloro 1,1 3,3 tetraetilbenzimidazolocarbocianina) (SMILEY et al., 1991). Este corante necessita de potencial de membrana mitocondrial altamente negativo para penetrar na organela e emitir fluorescência nos comprimentos de onda de luz vermelha ou verde, de acordo com a concentração interna final. Em altas concentrações, o corante apresenta-se de forma de j-agregado e emite coloração vermelha, enquanto que em baixas concentrações encontra-se na forma de monômero e emite coloração verde. Assim mitocôndrias com alto potencial de atividade de membrana fluorescem em vermelho alaranjado, enquanto aquelas com baixo a médio potencial, em verde. Desta forma, o JC-1 identifica populações de mitocôndrias com diferentes potenciais de membrana por meio de códigos de cor (REERS et al., 1991; GARNER et al., 1997; CELEGHINI, 2005).

Este corante fluorescente foi utilizado com sucesso para estimar o potencial de membrana mitocondrial em diferentes espécies como: a bovina (GARNER et al., 1997; CELEGHINI et al., 2005), eqüina (GRAVANCE et al.,

2000; LOVE et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2005; SCHOBER et al., 2007), ovina (MARTINEZ-PASTOR et al., 2004) e humana (TROIANO et al., 1998).

2.3.7. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA CROMATINA

2.3.7.1. LARANJA DE ACRIDINA (AO)

Nas fases finais da espermatogênese o espermatozóide adulto deve apresentar a cromatina compacta e resistente à desnaturação, a qual pode acontecer durante o trânsito epididimário ou no trato reprodutivo da fêmea (D'OCCHIO et al., 2007).

Substâncias químicas, radiação, intoxicações e o calor também são fatores que podem causar danos ao DNA dos espermatozóides (AHMADI & SOON-CHYE, 1999).

É importante que o DNA do espermatozóide esteja íntegro para que ocorra a fertilização e o desenvolvimento embrionário precoce (TEJADA et al., 1984; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2006; D'OCCHIO et al., 2007; KHALIFA et al., 2008).

Karabinus et al. (1991) observaram que sêmen de touros diluído e descongelado quando incubado por 30 minutos aumenta a susceptibilidade à desnaturação do DNA dos espermatozóides.

Alterações do DNA podem ser descobertas usando testes específicos, como a coloração com AO (FRASER, 2004; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2006). Essa coloração permite a diferenciação entre a fita dupla e simples do DNA devido às propriedades metacromáticas do corante, cujas moléculas se intercalam entre as bases nitrogenadas do DNA nativo não desnaturado (fluorescência verde-amarelada) ou se ligam aos grupos fosfato do DNA desnaturado (fluorescência vermelho-alaranjada) (ICHIUMARA, 1975).

A técnica do AO destaca-se por ser um procedimento simples, porém sua interpretação é subjetiva (NAVES et al., 2004).

Waberski et al. (2004) utilizaram a coloração com AO e concluíram que espermatozóides de touros com a cromatina fragmentada têm menor capacidade de ligação às células do oviduto *in vitro* e, conseqüentemente, menor capacidade de formação de blastocistos.

Khalifa et al. (2008) avaliaram a integridade da cromatina através da coloração com AO em sucessivos ejaculados de touros de raças de corte e de leite e concluíram que espermatozóides com a cromatina lesada têm influência no desenvolvimento embrionário.

Boe-Hansen et al. (2008) citam que danos ocasionados ao DNA dos espermatozóides estão associados com baixa fertilidade na espécie suína. Já Evenson (1999) concluiu que a fragmentação do DNA não apresenta correlação com os resultados de FIV.

2.4. PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS (PIV)

O primeiro bezerro nascido pela técnica de FIV foi no ano de 1981, desde então pesquisas proporcionaram consideráveis avanços da técnica em bovinos (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, 2006).

A PIV tem sido utilizada para estudar a fisiologia dos processos de maturação e fecundação dos oócitos, capacitação espermática, cultivo de embriões, clonagem, transferência de genes, microinjeção, sexagem embrionária, congelação e descongelação de oócitos e embriões (COELHO et al., 2000), além de acelerar a produção de animais geneticamente superiores (GONÇALVES et al., 2007).

Vários grupos de pesquisadores correlacionaram a PIV com testes de avaliação espermática como a concentração total, motilidade e penetração da zona pelúcida de oócitos (ZHANG et al., 1999; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2000; TANGHE et al., 2002; AIRES et al., 2003; GIL et al., 2003; TARTAGLIONE & RITTA, 2004).

Outros utilizaram a PIV para provar a capacidade de fecundação de espermatozóides criopreservados com diferentes diluidores (COELHO et al., 1996; BOUSSEAU et al., 1998; AMIRAT et al., 2004; ROASA et al., 2007).

A técnica de aspiração folicular transvaginal (“Ovum Pick Up” - OPU) tem sido descrita como a melhor opção para recuperação de oócitos *in vivo* na espécie bovina (BOLS et al., 2004). Além da OPU, a obtenção de oócitos a partir de ovários de abatedouro é descrita como uma ótima alternativa

(COELHO et al., 2000). Geralmente são recuperados oócitos de folículos de tamanho entre 2-8 mm de diâmetro (SIRARD, 2001).

Após a recuperação dos oócitos, as seguintes fases de desenvolvimento são necessárias: maturação oocitária, fecundação e cultivo embrionário. Na maioria dos laboratórios de PIV os oócitos bovinos são maturados em meio TCM 199 adicionado de soro fetal bovino (SFB), estradiol e gonadotrofinas, em estufa à 38°C em 5% de CO_2 e umidade saturada por 22 a 24 horas (GALLI & LAZARI, 1996; GUIXUE et al., 2001).

Durante a maturação o oócito reinicia a meiose até a metáfase II e ocorrem diversas alterações dentro do citoplasma, incluindo a migração dos grânulos corticais para a periferia. A camada de células do *cumulus* se expande e as "gap junctions" são quebradas (GORDON, 1994).

Somente espermatozóides viáveis podem interagir com os oócitos maduros e iniciar o processo de FIV. Por isso, após a descongelação, a remoção do diluidor, crioprotetor e plasma seminal são necessários para a obtenção de espermatozóides viáveis (WALTERS et al., 2004).

Vários métodos para separação e seleção espermática foram descritos: gradiente de Percoll e o "swim-up" (migração ascendente) são amplamente usados (WALTERS et al., 2004). Estes procedimentos, além de selecionar, concentram os espermatozóides normais de maior motilidade para serem usados na FIV (PARRISH et al., 1995).

O método do gradiente de Percoll consiste na deposição dos espermatozóides sobre duas ou mais camadas, com diferentes concentrações, dentro de um tubo que é submetido à centrifugação. O Percoll é formado de partículas de sílica coloidal cobertas com polivinil pirrolidona (PVP) não-dialisável (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1997).

Quando centrifugado em um meio apropriado, geralmente o TALP, o Percoll forma um gradiente de densidade, devido à grande variação no tamanho das suas partículas permitindo o fracionamento de sub-populações de espermatozóides. Este fracionamento separa claramente os espermatozóides normais e móveis de partículas do diluidor utilizado, como por exemplo, bactérias e outras células. Mas ainda existem dúvidas em relação à eficiência deste método na seleção de espermatozóides com motilidade e membrana intacta (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1997).

Somente espermatozóides viáveis reconhecem e se ligam aos oócitos, sofrem reação acrossomal e são capazes de penetrar na zona pelúcida (TOPFER-PETERSEN et al., 2000).

Após a FIV os zigotos são transferidos para o cultivo embrionário em estufa à 38°C, 5% CO_2 e umidade saturada, onde permanecem por um período de 7 dias, até atingirem o estágio de blastocisto (DODE & RUMPF, 2002).

Uma das principais aplicações da PIV em bovinos é a avaliação da capacidade de FIV dos espermatozóides, um teste complementar aos exames existentes (MARQUANT-LE GUIENNE & HUMBLOT, 1992), representando um método alternativo, barato e rápido em comparação aos testes *in vivo* (AIRES et al., 2003).

III. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar a fertilidade *in vitro* do sêmen bovino congelado com dois diferentes diluidores.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o sêmen bovino congelado com os diluidores A (Tris e gema de ovo) e B (Andromed® - lecitina de soja) quanto à motilidade subjetiva e computadorizada, vigor, concentração, morfologia espermática e a integridade da cromatina.
- Avaliar a integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial do sêmen bovino congelado com os diluidores A e B pela associação das sondas PI, FITC-PSA e JC-1 e funcionalidade da membrana plasmática através do HIPO.
- Avaliar o sêmen bovino congelado com os diluidores A e B na PIV.

IV. HIPÓTESES

- Sêmen bovino diluído e congelado com um diluidor livre de proteína animal é tão eficaz na criopreservação de espermatozóides bovinos quanto o diluidor à base de Tris e gema de ovo.

- Sêmen bovino diluído e congelado com um diluidor livre de proteína animal é eficaz na PIV.

V. MATERIAL E MÉTODO

5.1. LOCAL

O processamento e congelação do sêmen foram realizados em uma central de IA. A análise do sêmen descongelado foi conduzida no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da UNESP - campus Araçatuba – SP. A PIV foi realizada no Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP) – Laboratório Fertvitro em São José do Rio Preto – SP e o CASA no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Radiologia Veterinária e Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (UNESP) – campus de Botucatu – SP, durante os meses de agosto a dezembro de 2008.

5.2. SELEÇÃO DOS ANIMAIS E COLHEITA DAS AMOSTRAS

Foram utilizados quatro touros da raça Nelore em idade reprodutiva, mantidos em regime semi-extensivo da central de IA. Cada animal foi colhido uma vez pelo método da vagina artificial. O ejaculado de cada touro foi dividido em duas partes iguais e adicionado diluidor A (Tris e gema de ovo) e B (Andromed® - lecitina de soja), para depois serem resfriados, congelados e armazenados em nitrogênio líquido a - 196ºC seguindo os procedimentos padrões da central de IA.

5.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O estudo foi dividido em dois experimentos. No experimento I foram realizados testes complementares para avaliação espermática e no experimento II foi realizado a PIV, como elucidado na figura 1.

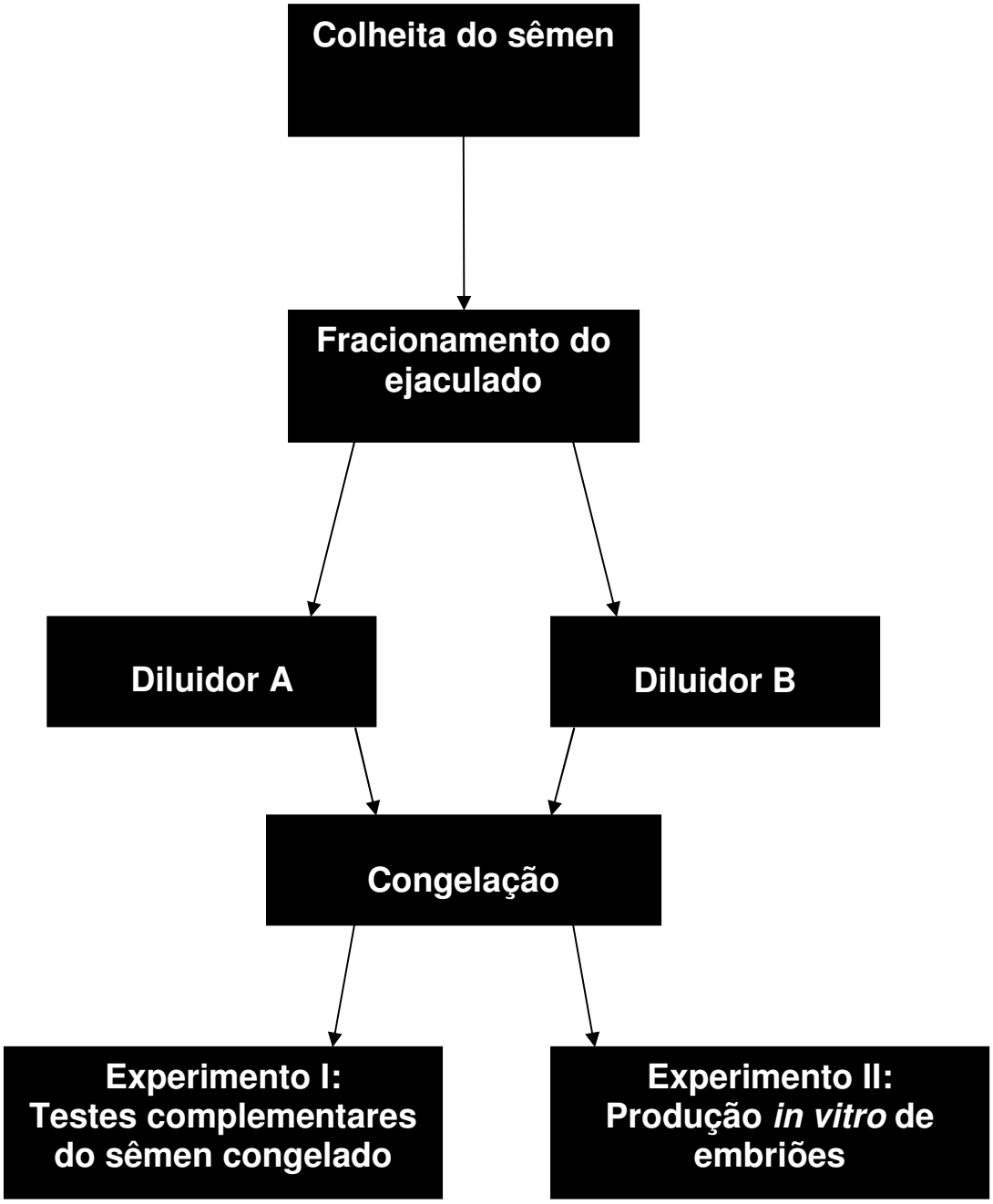

Figura 1 - Delineamento experimental com as etapas: colheita do sêmen, fracionamento do ejaculado, adição do diluidor A (Tris e gema de ovo) e B (Andromed®), congelação do sêmen e realização dos experimentos I (Testes complementares do sêmen congelado) e II (Produção *in vitro* de embriões).

5.4. EXPERIMENTO I (TESTES COMPLEMENTARES)

Cinco palhetas de 0,25 ml do diluidor A e B de cada touro foram descongeladas à 35°C por 30 segundos e transferidas para tubos de hemólise com tampa de látex mantidos em banho maria à 37°C.

Imediatamente após a descongelação foram avaliadas: a motilidade progressiva e retilínea subjetiva e computadorizada, vigor (0-5), concentração espermática (espermatozóides/mL), morfologia espermática e realizado o TTL (incubação do sêmen em banho maria a 37°C por 3 horas). As avaliações de motilidade subjetiva, vigor, porcentagem de acrossoma intacto (PIA) e a integridade do DNA foram repetidas após o TTL.

Para avaliação da membrana acrossomal, citoplasmática e mitocondrial foi utilizada a associação de sondas fluorescentes PI, FITC-PSA, JC-1. O HIPO foi utilizado como avaliação complementar da funcionalidade da membrana plasmática.

5.4.1. MOTILIDADE E VIGOR

A motilidade e o vigor foram avaliados imediatamente após a descongelação. Uma gota de sêmen foi colocada entre lâmina e lamínula pré-aquecidas à 37°C e observadas em microscópio de contraste de fase (200x). A motilidade foi determinada pela estimativa visual da porcentagem de células em movimento e também pela redução do campo pelo diafragma e contagem de células com movimento progressivo retilíneo e células imóveis. O vigor foi avaliado de acordo com a velocidade do movimento progressivo dos espermatozóides, e classificado de 0 a 5, sendo 0 o mais lento e 5 o mais rápido (CBRA, 1998). Tanto a motilidade subjetiva e o vigor foram repetidos após a realização do TTL.

5.4.2. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA CROMATINA (LARANJA ACRIDINA - LA)

A avaliação da integridade da cromatina foi realizada pela coloração com AO. Foram adicionados 100µL de sêmen à microtubos contendo 100µL de água destilada e centrifugado a 1500 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado, o sedimento ressuspendido em 200µL de água destilada, repetindo a centrifugação. Novamente o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido em 100 µL de água destilada.

Em seguida uma amostra de 30µL foi retirada e realizados pelo menos dois esfregaços. Após secagem em temperatura ambiente por 60 minutos, os esfregaços foram imersos em solução "Carnoy" (três partes de metanol e uma parte de acido acético), onde permaneceram por 12 horas. Após secagem as lâminas foram cobertas, por 3mL da solução de solução de acridina laranja (LA) (10 mL solução estoque de AO 1µg/mL + 40 mL de solução de ácido cítrico 0,1 M + 2,5 mL de solução de fosfato dissódico 0,3 M; pH 2-3), de modo a permanecerem coradas por 5 minutos em ambiente escuro. Os esfregaços foram lavados cuidadosamente em água destilada e antes de secar cobertas por lamínulas (24x40 mm). As lâminas foram examinadas em microscópio de epifluorescência (microscópio Olympus BX61 – Japão) em filtro com excitação de 460-570 nm e emissão de 460-610 nm.

Para cada esfregaço foram contadas 200 células e classificadas de acordo com Tejada et al. (1984), sendo que as células com emissão de fluorescência verde foram consideradas normais, ou seja, com cromatina íntegra, enquanto, as células com emissão de fluorescência vermelha, laranja ou amarela distribuída de forma regular ou irregular no interior da cabeça, foram consideradas anormais, indicando desnaturação total ou parcial da cromatina. A avaliação da integridade da cromatina foi repetida logo após a realização do TTL.

5.4.3. ANÁLISE COMPUTADORIZADA DO SÊMEN (CASA)

Para a análise computadorizada do movimento espermático (CASA – HTMA-IVOS 12.3 – Hamilton Research® – Beverly, M.A., U.S.A.) utilizou-se o *hardware* IVOS ("Integrat Visual Optical System" – Sistema Visual de Integração Óptica) versão 12.3 da empresa "Hamilton Thorne Biosciences"® constituído com o "Software Animal Breeders", configurado com "setup" recomendado pelo fabricante para touros conforme descrito no Anexo 12.1.2, o qual foi executado na plataforma Windows XP®.

Uma alíquota de 6 µL da amostra foi disposta em câmara de "Makler" previamente aquecida a 37º C, da qual avaliou-se, em três campos, os parâmetros da cinética espermática descritos a seguir. Os campos foram selecionados automaticamente sempre a partir do ponto central da câmara, observando-se a inexistência de artefatos como bolhas, partículas ou outros elementos que pudessem prejudicar a avaliação (VARNER et al., 1991; VULCANO et al., 1998; SOUSA et al., 1999; FERREIRA, 2000; SOUSA, 2002): VAP (velocidade de trajeto), VSL (velocidade linear), VCL (velocidade curvilinear), ALH (amplitude de batimento de cabeça), MT (motilidade total), MP (motilidade progressiva) e RAP (porcentagem de espermatozóides rápidos).

5.4.4. CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA

A contagem foi realizada em câmara de "Neubauer" à microscopia de contraste de fase (200x), diluindo-se 20µL de sêmen em 1mL solução de KCl (MITCHELL, J.R.-comunicação pessoal), como descrito em CBRA, (1998).

5.4.5. MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

Para a contagem das anormalidades espermáticas foi utilizada a técnica de câmara úmida, onde uma gota de sêmen diluído em solução de KCl (MITCHELL, J.R.-comunicação pessoal) foi depositada entre lâmina e lamínula. Foram contadas 200 células em microscopia de interferência diferencial de fase - DIC (1000x). A classificação das células segundo sua morfologia foi realizada

de acordo com a classificação preconizada por Blom (1973) e o resultado por amostra foi dado em porcentagem.

5.4.6. TESTE DE TERMO-RESISTÊNCIA LENTO (TTL) E AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO ACROSSOMA (PIA – PORCENTAGEM DE ACROSSOMAS INTACTOS)

As amostras de sêmen foram acondicionadas em tubos de hemólise e vedadas com rolhas de látex e mantidas em banho maria à 37ºC por 3 horas. Após este período a motilidade e o vigor foram reavaliadas (HERMAN et al., 1996). Na mesma amostra foi avaliada a presença do bordo apical sob microscopia de interferência diferencial de fase - DIC (1000x) diferenciando espermatozóides com acrossoma intacto ou não. Foram realizadas duas contagens de 100 espermatozóides por amostra para quantificar espermatozóides com acrossomas intactos e alterados. Se a variação entre as duas contagens excedesse 7% a contagem seria refeita. Para a PIA foi considerada a média das duas contagens (HERMAN et al., 1996).

5.4.7. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE MEMBRANAS

A integridade de membranas foi avaliada pela associação de corantes fluorescentes PI (28707-5, Sigma®), FITC-PSA (L-0770, Sigma®) e JC-1 (T3168, Molécula Probes®) de acordo com o protocolo utilizado por Arruda & Celeghini (2003) e modificado por Carreira (2008). O sêmen descongelado foi transferido para 500µL da solução de lavagem (TALP-sêmen Ca^{++} FREE) e centrifugada por 5 minutos a 94 x g. Desprezado o sobrenadante, o sedimento foi ressuspendido em 250µL da mesma solução e novamente centrifugado e ressuspendido. A concentração foi avaliada e realizado o ajuste da diluição para $25x10^6$ espermatozóides/mL em 150µL. Desta solução 30µL foram transferidos para microtubo e adicionados 2µL de PI (0,2mg/mL), 1,6µL de JC-1 (0,5mg/mL) e 10 µL de FITC-PSA (100µg/mL).

Em seguida as amostras foram incubadas (37°C) por oito minutos. Após a incubação, uma gota (10µL) foi utilizada para preparação úmida, entre lâmina

e lamínula (pré-aquecidas à 37ºC). A leitura foi realizada imediatamente sob microscopia de epifluorescência (microscópio Olympus® BX61 - Japão) em filtro com excitação de 460-570nm e emissão de 460-610nm. Foram contadas 200 células e classificadas de acordo com a fluorescência emitida por cada sonda utilizada (PI, FITC-PSA e JC-1) que resultaram em oito categorias de células descritas a seguir na figura 2:

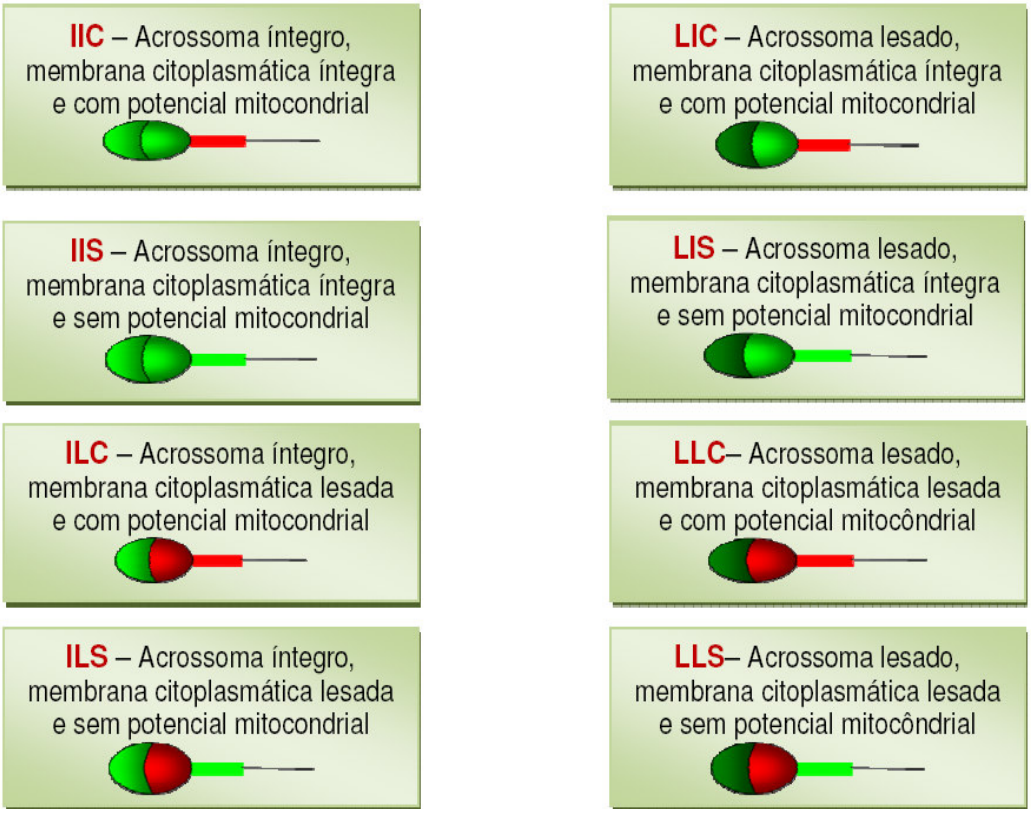

Figura 2 - Representação esquemática dos padrões de coloração dos espermatozóides obtidos pela associação das sondas fluorescentes (CARREIRA, 2008).

5.4.8. TESTE HIPOSMÓTICO (HIPO)

Para o HIPO, uma alíquota de 20µL de sêmen descongelado foi acrescentada a 1,0mL de uma solução com frutose e citrato trisódico na concentração de 100mOsm/L (Anexo 12.1.3), previamente aquecida à 37ºC (REVELL & MRODE, 1994; ROTA et al., 2000). Essa solução foi incubada em banho maria por 60 minutos à mesma temperatura.

Posteriormente, as amostras foram fixadas em 0,5mL de solução de formol-salina tamponada. Em seguida uma amostra de 20µL da solução foi colocada entre lâmina e lamínula para contagem de 100 espermatozóides, em microscopia de contraste de fase com aumento de 1000x em objetiva de imersão.

As células foram classificadas quanto à presença ou não de cauda dobrada ou enrolada e o resultado foi determinado em percentagem, efetuando-se o cálculo pela fórmula: HIPO (%) = (% de alterações na região da cauda após teste HIPO) – (% de alterações na região da cauda dos espermatozóides antes do teste HIPO) (REVELL e MRODE, 1994; MELO & HENRY, 1999).

5.5. EXPERIMENTO II (PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES)

Uma palheta do diluidor A e B de cada touro foram utilizadas na PIV, realizando-se oito repetições por amostra, sendo utilizados 25 oócitos em cada repetição.

5.5.1. OBTENÇÃO E SELEÇÃO DOS OÓCITOS

Os ovários provenientes de animais abatidos em abatedouro foram retirados das carcaças aproximadamente 20 minutos após o abate e transportados até o laboratório em garrafa térmica contendo solução salina fisiológica (NaCl) 0,9% estéril e solução antibiótica (Anexo 12.1.4) à 37ºC, não excedendo o limite de 6 horas desde o abate até o início da aspiração dos folículos. No laboratório os ovários foram lavados com a mesma solução e conservados em banho maria à 35ºC.

Folículos antrais (2-8mm) foram puncionados manualmente por meio de agulha de calibre 40x12G, adaptada a seringa de 10mL, ambas descartáveis (Figura 3). O líquido folicular recuperado foi depositado em placas de petri (60mm de diâmetro) acondicionada em placa aquecedora à 35ºC até o momento da identificação, seleção e classificação dos oócitos sob estereoscópio (Figura 4).

Figura 3 - Aspiração de folículos ovarianos de ovários obtidos de animais abatidos em abatedouro (Frigopoti / Potirendaba – SP). Laboratório Fertvitro / Unirp - São José do Rio Preto – SP, 2008.

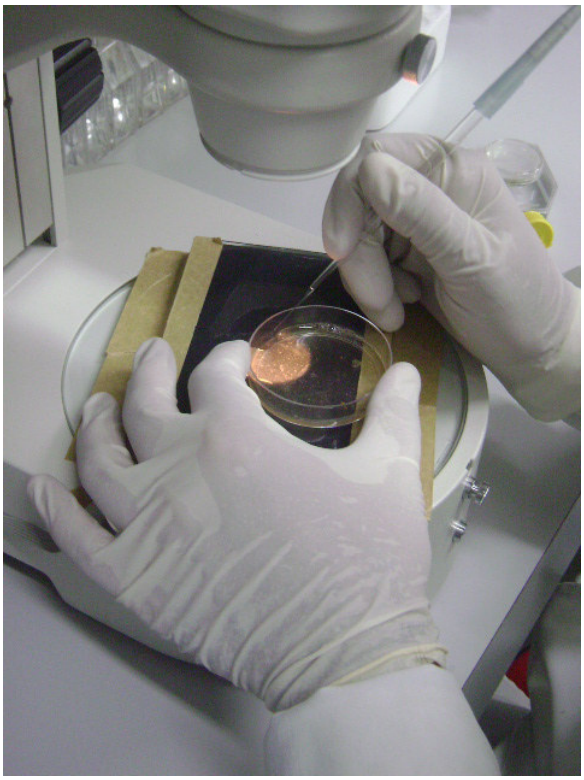

Figura 4 - Procura e seleção dos oócitos aspirados de folículos presentes nos ovários obtidos de animais abatidos em abatedouro (Frigopoti / Potirendaba – SP). Laboratório Fertvitro / Unirp - São José do Rio Preto – SP, 2008.

5.5.2. MATURAÇÃO *IN VITRO* DOS OÓCITOS (MIV)

Os oócitos com *cumulus* compacto, possuindo pelo menos 3 a 4 camadas de células e citoplasma de granulação homogênea e aspecto esférico, foram selecionados para a MIV (Figura 5 - setas vermelhas). Oócitos com *cumulus* expandido, desnudos ou com citoplasma muito claro e alterações de formato foram descartados (Figura 5 - setas brancas).

Os oócitos recuperados e selecionados foram lavados duas vezes em meio de manutenção H-199 (Anexo 12.1.5). Grupos de 25 oócitos foram transferidos para placa de cultura contendo meio de maturação *in vitro* (Anexo 13.1.6). A maturação dos oócitos ocorreu em estufa a 38,5ºC, com 5% de CO_2 em ar e umidade relativa de 99% por 24hs (Figura 6).

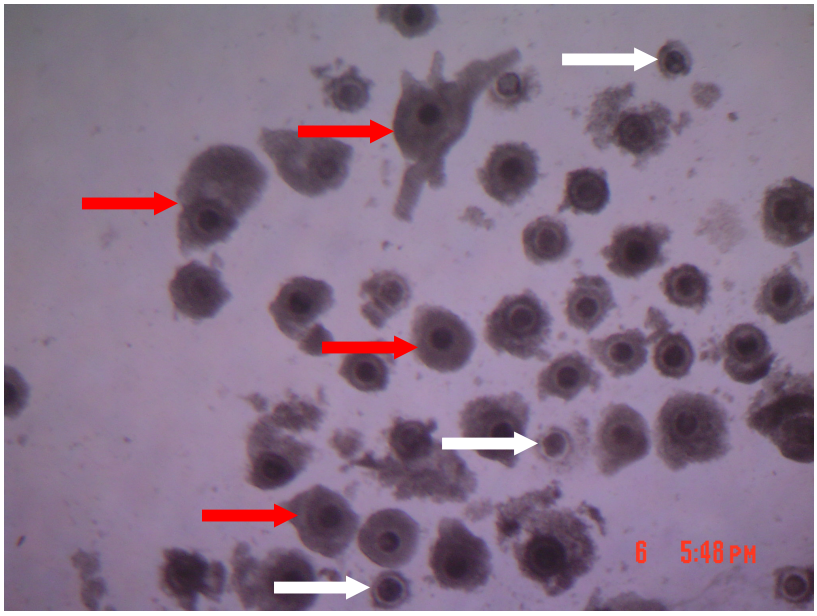

Figura 5 - Fotomicrografia de oócitos bovinos imaturos aspirados de folículos antrais obtidos de ovários de animais obatidos em abatedouro (Frigopoti / Potirendaba), observados em aumento de 100x. Laboratório Fertvitro / Unirp - São José do Rio Preto – SP, 2008.

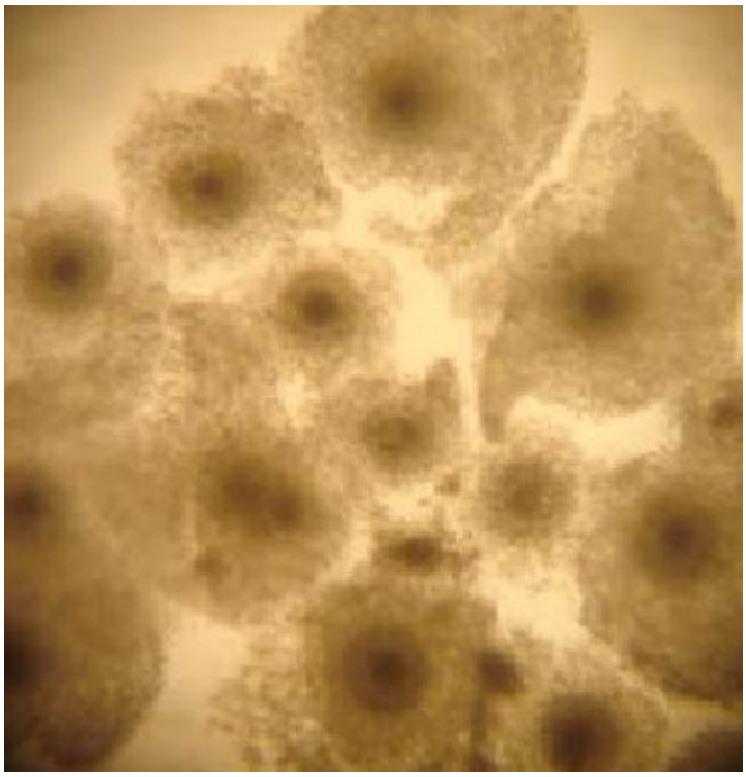

Figura 6 - Fotomicrografia de oócitos bovinos maturados *in vitro* em estufa a 38,5ºC, com 5% de CO_2 em ar e umidade relativa de 99% por 24hs . Aumento (200x). Laboratório Fertvitro / Unirp - São José do Rio Preto – SP, 2008.

5.5.3. PREPARO DO SÊMEN E FECUNDAÇÃO *IN VITRO* (FIV)

A descongelação do sêmen foi realizada a 35°C por 30 segundos. Em seguida os espermatozóides vivos foram separados do diluidor por sedimentação em gradiente descontínuo de Percoll® (Sigma®) de duas fases: 90 e 45%, em 780 a 900 x g de força de sedimentação durante 30 minutos. O sedimento foi diluído uma vez em solução de 1mg de heparina sódica (Liquemine® - Roche®) /mL em meio Talp-sêmen (Anexo 13.1.8) e incubado a 38,7ºC por 15 minutos. Após avaliação da motilidade progressiva e da concentração espermática, o número de espermatozóides foi ajustado para $25x10^6$/mL. Aproximadamente $100x10^3$ espermatozóides foram adicionados a cada gota de 100 µL de meio FIV designado a cada grupo experimental. Os oócitos foram lavados duas vezes em meio H-199, suplementado com 0,5% de BSA livre de ácidos graxos, e uma vez em meio FIV (Anexo 12.1.7). A fecundação foi realizada estufa à 38,5°C, em atmosfera contendo 5% de CO_2 em ar e umidade relativa de 99% por 24 horas.

5.5.4. CULTIVO *IN VITRO* (CIV)

Os zigotos foram retirados das gotas contendo meio FIV e submetidos à pipetagem para remoção do excesso de espermatozóides e células do *cumulus*. Grupos de 10 zigotos foram depositados em gotas de 50µL, contendo o meio CIV (12.1.9). O cultivo de embriões foi realizado nas gotas fixadas em óleo mineral, durante 168 horas após o início da FIV, em estufa à 38,5ºC, atmosfera contendo 5% de CO_2 em ar e umidade relativa de 99%.

No 4º dia ou 96 horas após a FIV, foram mantidos nas gotas de CIV somente os embriões que continham de 16 a 32 células. Em seguida, foi adicionado 30 µL de meio CIV nas microgotas (“feeding”).

5.5.5. ANÁLISE E LEITURA DOS EMBRIÕES

As gotas de CIV foram observadas para cálculo da taxa de clivagem (zigotos) e taxa de embriões (blastocistos) no D2 e D7, respectivamente (sendo que D0 foi considerado o dia da FIV). Tanto a taxa de clivagem como de embriões foram calculadas a partir do número de oócitos inseminados. A taxa de eclosão foi avaliada em D9 e foi calculada a partir do número de blastocistos obtidos no D7.

5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis motilidade subjetiva e computadorizada, vigor, integridade da cromatina, do acrossoma, da membrana plasmática e potencial mitocondrial foram analisados pelo teste de Wilcoxon para comparar os diluidores A e B. As variáveis percentagem de clivagem, de embriões e de eclosão foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey. As estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa computacional “Statistical Analysis System” (SAS) (ZAR, 1999).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. EXPERIMENTO I (TESTES COMPLEMENTARES)

6.1.1. MOTILIDADE ESPERMÁTICA, VIGOR E INTEGRIDADE DA CROMATINA

A análise da motilidade espermática subjetiva (microscopia de contraste de fase), vigor e integridade da cromatina (LA) foram realizados em todas as amostras de sêmen após a descongelação (0h) e após a realização do TTL (3hs) para ambos os diluidores. Na tabela 1 encontram-se os valores médios das características analisadas.

A motilidade espermática subjetiva variou entre 55% a 70% para o sêmen congelado com o diluidor A e de 50% a 60% para o sêmen congelado com o diluidor B após a descongelação (0h). Após a realização do TTL a variação foi de 50% a 70% de espermatozóides móveis para o diluidor A e de 40% a 60% para o diluidor B. Os valores médios obtidos para o diluidor A foi de 63,8% ± 7,5 e para o diluidor B de 55,0% ± 5,8 logo após a descongelação, como após o TTL (57,5% ± 9,6) e (48,8% ± 8,5) respectivamente, como elucidado na figura 7. Porém, não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) para ambos os grupos avaliados nos diferentes tempos (0h e 3hs).

A análise do vigor (escala de 0-5) após a descongelação do sêmen com o diluidor A variou entre 2,5 a 4,0 e de 3,0 a 4,0 para o diluidor B. Após o TTL a variação foi de 2,5 a 3,0 para o sêmen congelado com o diluidor A e 2,5 a 3,5 para o diluidor B. Esses resultados também demonstraram que não houve diferença estatística referente ao vigor espermático (Figura 8).

Houve pouca variação na análise da integridade da cromatina logo após a descongelação e após a incubação do sêmen para ambos os diluidores testados (99,5% a 100% de DNA íntegros). Os valores apresentados na tabela 1 mostram que não houve diferença significativa ($p>0,05$).

Tabela 1 - Valores médios ($\bar{x}$), desvio padrão (s) e mediana (Md) das variáveis físicas (motilidade 0h, vigor 0h, DNA 0h, motilidade 3h, vigor 3h e DNA 3h) estudadas do sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da UNESP - campus Araçatuba – SP, 2008.

Variáveis	Diluidor A		Diluidor B		p(1)
	$\bar{x} \pm s$	Md	$\bar{x} \pm s$	Md	
Motilidade 0h (%)	63,8 ± 7,5	65,0	55,0 ± 5,8	55,0	0,250
Vigor 0h (0-5)	3,3 ± 0,6	3,3	3,4 ± 0,5	3,3	1,000
DNA lesado 0h (%)	1,0 ± 0,0	1,0	1,0 ± 0,0	1,0	1,000
Motilidade 3h (%)	57,5 ± 9,6	55,0	48,8 ± 8,5	47,5	0,125
Vigor 3h (0-5)	2,9 ± 0,3	3,0	3,0 ± 0,4	3,0	1,000
DNA lesado 3h (%)	1,0 ± 0,0	1,0	1,0 ± 0,0	1,0	0,500

(1) Teste de Wilcoxon (p>0,05).

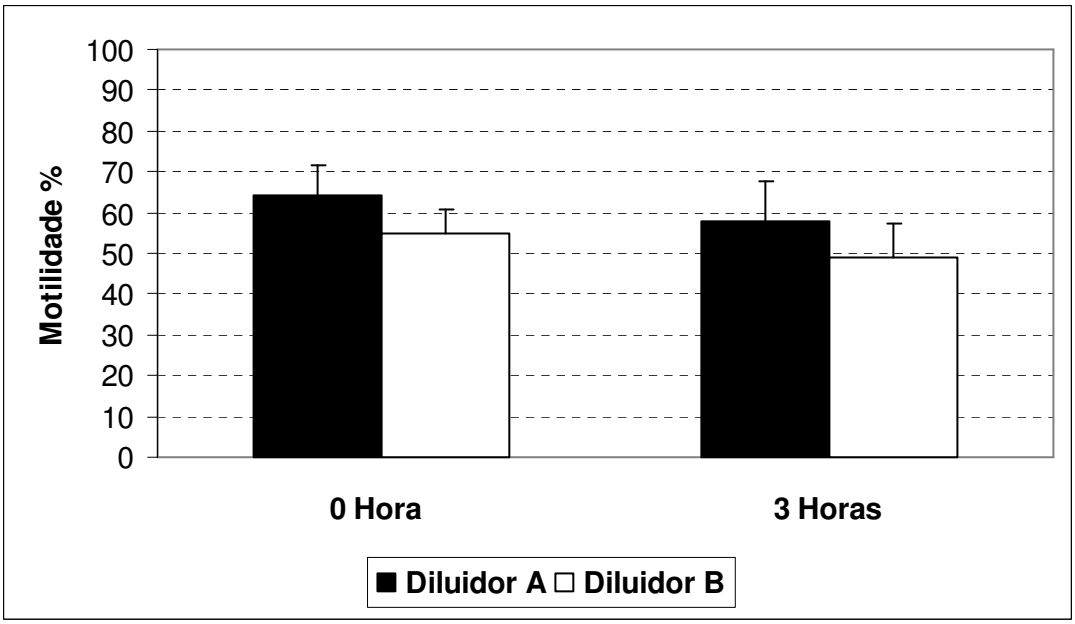

Figura 7 - Valores médios da motilidade espermática subjetiva logo após a descongelação (MOT 0h) e após a realização do teste de termo resistência lento (MOT 3hs) do sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da UNESP - campus Araçatuba – SP, 2008.

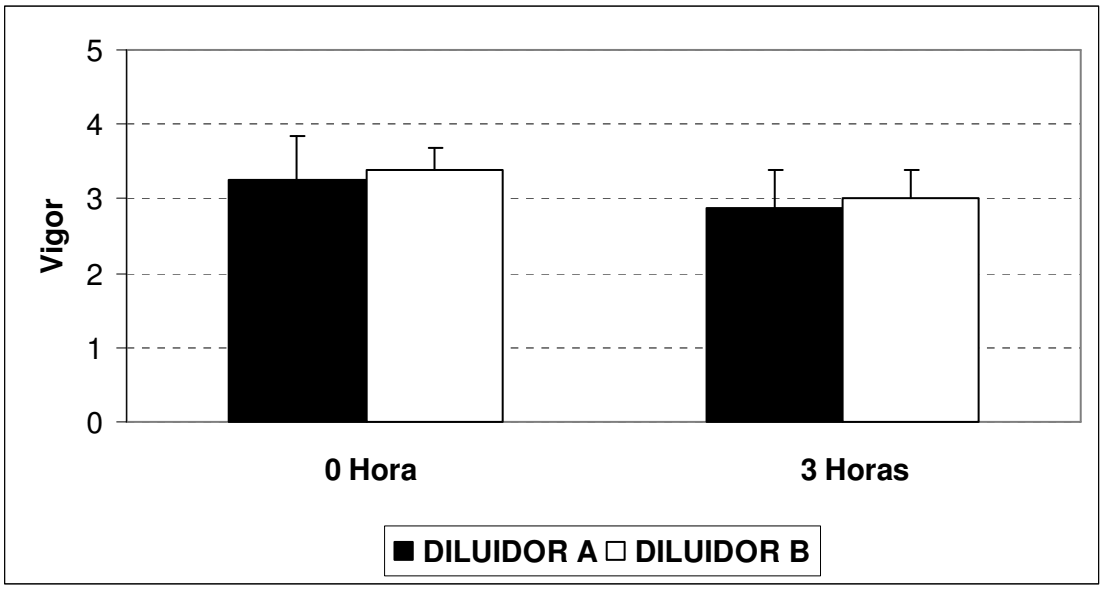

Figura 8 - Valores médios do vigor espermático logo após a descongelação (MOT 0h) e após a realização do teste de termo resistência lento (MOT 3hs) do sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da UNESP - campus Araçatuba – SP, 2008.

Esses resultados corroboram com estudos realizados por outros pesquisadores que avaliaram a motilidade espermática subjetiva do sêmen bovino (HINSC et al., 1997 a,b; GIL et al., 2000; MULLER-SCHLOSSER et al., 2001; AMIRAT et al., 2004) e sêmen de carneiro (GIL et al., 2003) criopreservado com diluidores livres de proteína animal e diluidores compostos por gema de ovo logo após a descongelação.

A literatura mostra dados divergentes, analisando a motilidade do sêmen bovino descongelado. Vários pesquisadores observaram um desempenho melhor com o diluidor à base de lecitina de soja quando comparado ao diluidor Tris e gema de ovo (AIRES et al., 2003; JANETT et al., 2005; AMIRAT et al., 2005; e DELL'AQUA JUNIOR et al., 2007), já outros obtiveram melhores resultados utilizando Tris e gema de ovo (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000; THUN et al., 2002).

O diluidor à base de gema de ovo também proporcionou uma melhor motilidade subjetiva no sêmen em outras espécies como: búfalos (HEROLD et al., 2004, 2006), cães (NÖTHLING et al., 2007) e caprinos (VIANA et al., 2006).

Os resultados encontrados na literatura correlacionando motilidade subjetiva espermática aos diferentes diluidores e à fertilidade de uma amostra seminal pós-descongelação são divergentes. Mies Filho (1987) e Garner et al. (1997) ponderam que na avaliação visual ocorre uma tendência de substimar a percentagem de espermatozóides móveis.

Assim, é desejável a realização de testes específicos da função espermática, como a avaliação computadorizada do sêmen, coloração das estruturas espermáticas por sondas fluorescentes, HIPO e PIV (GARNER & JOHNSON, 1995; FARREL et al., 1997; TARTAGLIONE & RITTA, 2004).

Após a descongelação e observação da motilidade subjetiva, vigor e integridade da cromatina, o sêmen foi submetido ao TTL, onde permaneceu incubado a 37°C por 3 horas em banho Maria. O TTL, um teste complementar, propõe avaliar a longevidade espermática após a incubação do sêmen em temperaturas próximas ao ambiente uterino.

Dimitropoulos (1967) obteve uma relação significante (r=0,78) quando correlacionou o TTL com a fertilidade *in vivo* (taxa de prenhez).

Em amostras de sêmen avaliadas pelo TTL (38°C / 5 horas) e que a motilidade subjetiva permaneceu acima de 20%, não foi verificada diferença na taxa de prenhez (ARRUDA, 1988).

Quando se analisou a correlação entre o TTL (38°C durante 5 horas) e o tipo de diluidor, verificou-se que a composição do diluidor pode influenciar na viabilidade espermática (CASAGRANDE et al., 1980).

Já em outra pesquisa onde se comparou a viabilidade de espermatozóides diluídos em meio à base de gema e à base de lecitina de soja, observaram que após 3hs de incubação à 37°C o meio diluidor composto por lecitina de soja não apresentou variação na viabilidade espermática, considerando que para os diluidores à base de gema de ovo a viabilidade espermática foi mantida por 6 horas (MUINO et al., 2007).

Os valores médios de motilidade observada após 3 horas de incubação do sêmen (57,5% ± 9,6 para o diluidor A e 48,8% ± 8,5 para o diluidor B) apresentaram-se dentro limites sugeridos pelo CBRA (1998) (mínimo de 15% de motilidade espermática progressiva retilínea).

Após a realização do TTL se observou uma queda gradual da motilidade espermática subjetiva para ambos os diluidores (Tabela 1), confirmando as

observações de Aires et al. (2003). Esta queda pode ser decorrente da perda de componentes intracelulares ou de lesões estruturais na cauda dos espermatozóides.

A disponibilidade de nucleotídeos cíclicos, envolvidos com a fosforilação oxidativa provavelmente são insuficientes, embora as mitocôndrias têm a capacidade de produzir energia (HARRISON & VICKERS, 1990).

Em relação aos resultados observados para o vigor espermático após a descongelação e após o TTL, os mesmos permaneceram dentro dos níveis aceitáveis (CBRA, 1998): escore 3 (escala de 1 a 5). Para ambos os diluidores houve uma redução do vigor após a realização do TTL.

A avaliação da integridade da cromatina confirmou os resultados obtidos por Celeghini et al. (2007) que utilizaram a técnica de coloração da Laranja de Acridina descrita por Tejada et al. (1984) e modificada por Unanian (2000) onde não foi observado efeito significativo dos diferentes diluidores sobre a estrutura da cromatina espermática, mesmo após a realização do TTL.

Os resultados do presente estudo sugerem que o DNA dos espermatozóides bovinos criopreservados, são resistentes à desnaturação do DNA, independente do tipo de diluidor, enquanto outros pesquisadores apontam uma maior proteção à cromatina do diluidor à base de gema de ovo quando comparado ao diluidor à base de leite (KARABINUS et al., 1991).

Vários estudos relacionam a baixa taxa de embriões e o bloqueio do desenvolvimento embrionário a danos do DNA (AHMADI & SOON-CHYE, 1999; WABERSKI et al., 2004; BOE-HANSEN et al., 2008; KHALIFA et al., 2008;). A correlação significativa entre o teste da avaliação da estrutura da cromatina e a fertilidade *in vitro* de touros foi verificada (BOCHENEK et al, (2001).

No presente estudo ambos os diluidores apresentaram proteção à cromatina espermática suficiente para se obter taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário aceitáveis na PIV (experimento II).

6.1.2. PORCENTAGEM DE ACROSSOMA INTACTO (PIA)

Após a realização do TTL, todas as amostras foram submetidas à avaliação da integridade do acrossoma (Figura 9). Os resultados obtidos para o diluidor A foi de 50,3% e para o diluidor B de 53,4%, onde não foi encontrado diferença significativa (p>0,05). Entre os touros, o touro D (57%) obteve a maior percentagem de acrossomas intactos após a incubação do sêmen e o touro A (48%) apresentou a menor percentagem de acrossomas intactos, onde ambos tiveram o sêmen diluído e congelado com o diluidor A.

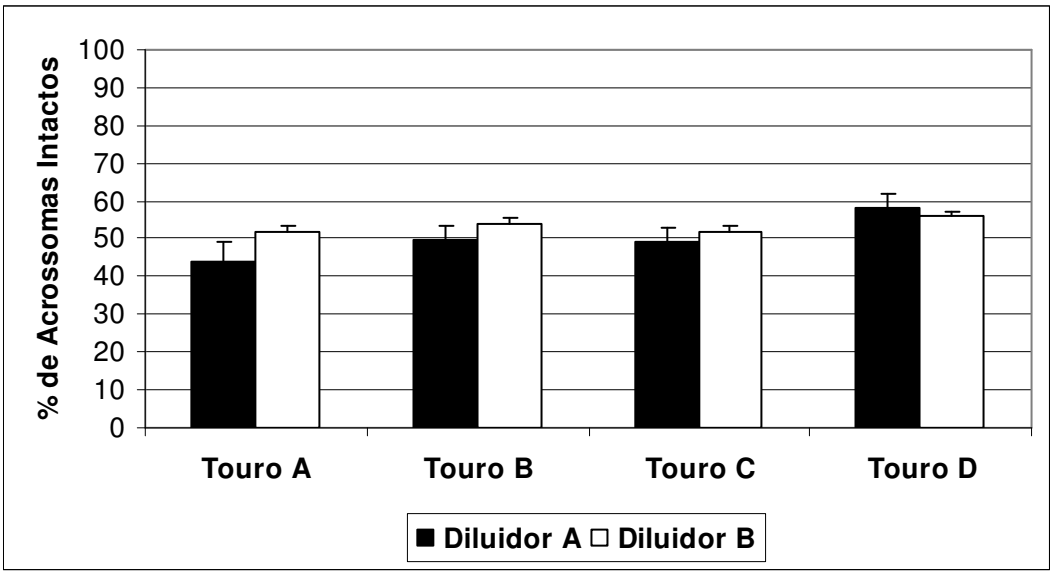

Figura 9 - Percentagens de acrossoma intacto (PIA) do sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja) após realização do teste de termo resistência lento. Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da UNESP - campus Araçatuba – SP, 2008.

A avaliação da percentagem de acrossomas íntegros consiste em teste complementar importante, já que os espermatozóides serão submetidos à temperaturas mais elevadas, como, por exemplo, a do ambiente uterino. Sem a presença do capuz cefálico, eles se tornarão inaptos e não ocorrerá a reação acrossomal, fundamental para a fertilização.

6.1.3. ANÁLISE COMPUTADORIZADA DO SÊMEN (CASA)

Todas as amostras descongeladas foram avaliadas pela análise computadorizada do movimento espermático.

A tabela 2 apresenta os valores médios e desvio padrão dos parâmetros analisados pelo CASA. De acordo com os resultados não houve diferença estatística (p>0,05) entre as análises para ambos os diluidores testados.

Os valores médios da motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e espermatozóides rápidos (RAP) obtidos com o diluidor A (69,5% ± 12,9; 34,5% ± 10,2 e 53,3% ± 14,8, respectivamente) e com diluidor B (57,7% ± 7,8; 25,5% ± 3,1; 47,2% ± 6,2, respectivamente), não sendo estatisticamente diferentes (p>0,05). Os valores médios de VAP (velocidade de trajeto), VSL (velocidade linear), VCL (velocidade curvilinear) e ALH (amplitude de batimento de cabeça) obtidos com o diluidor A (77,4 µm /s ± 9,1; 57,0 µm /s ± 7,0; 139,0 µm /s ± 14,6; 7,0 µm /s ± 0,3, respectivamente) e para o diluidor B (89,7 µm /s ± 5,7; 61,1 µm /s ± 5,5; 171,9 µm/s ± 10,8; 8,1 µm ± 0,38, respectivamente), e também não diferiram estatisticamente (p>0,05) entre os diluidores.

Tabela 2 - Valores médios ($\bar{x}$) e desvio padrão (s) dos parâmetros espermáticos: VAP (velocidade de trajeto), VSL (velocidade linear), VCL (velocidade curvilinear), ALH (amplitude de batimento de cabeça), MT (motilidade total), MP (motilidade progressiva) e RAP (porcentagem de espermatozóides rápidos) do sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Radiologia Veterinária e Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – campus de Botucatu – SP.

Variáveis	Diluidor A		Diluidor B		P(1)
	$\bar{x} \pm s$	Md	$\bar{x} \pm s$	Md	
VAP (µm /s)	77,4 ± 9,1	73	89,7 ± 5,7	89	0,125
VSL (µm /s)	57,0 ±7,0	54	61,1 ± 5,5	59	0,125
VCL (µm /s)	139,0± 14,6	134	171,9 ± 10,8	172	0,125
ALH (µm)	7,0 ± 0,3	7	8,1 ± 0,3	8	0,125
MT (%)	69,5 ± 12,9	71	57,7 ± 7,8	61	0,375
MP (%)	34,5 ± 10,2	34	25,5 ± 3,1	25	0,250
RAP (%)	53,2 ±14,8	51	47,2 ± 6,2	49	0,625

(1) Teste de Wilcoxon (p>0,05).

A análise computadorizada do sêmen foi padronizada na escolha de três campos, de acordo com estudos que concluíram não haver diferença significativa entre avaliações de três a sete campos (VARNER et al., 1991).

A temperatura durante a avaliação do sêmen pelo CASA variou entre 36,7°C e 37,2°C, isto é, próximo a temperatura corporal dos bovinos, em torno de 37,5°C a 38,0°C, obedecendo os procedimentos recomendados por Iguer-Ouada & Verstegen (2001).

Os valores médios obtidos para motilidade total (MT) representada pela soma de todas as células móveis, motilidade progressiva (MP) determinada pela percentagem de células que apresentam um movimento retilíneo progressivo e espermatozóides rápidos (RAP) corroboram com os resultados obtidos por Celeghini et al. (2007).

Os dados apresentados na literatura são divergentes. Motilidade espermática superior foi relatada empregando diluidores livres de proteína animal (HINSCH et al., 1997a; GIL et al., 2000; JANETT et al., 2005), enquanto outro grupo de pesquisa não observou diferença significativa quando compararam um diluidor à base de gema de ovo e outro à base de lecitina de soja.

A velocidade curvilinear (VCL) representa a média da velocidade medida ponto a ponto pela célula; a velocidade de trajeto (VAP) corresponde à média entre a VCL e a velocidade linear (VSL) ou ainda à velocidade média ininterrupta do trajeto da célula. VSL corresponde à média da velocidade entre o ponto inicial do movimento da célula ao ponto final.

A amplitude de batimento da cabeça (ALH) representa a largura média da oscilação da cabeça espermática ao longo do movimento. Consiste em importante parâmetro que pode afetar diretamente os resultados da PIV (JEULIN et al., 1996), já que percentagens elevadas não são desejadas, pois podem interferir na progressão da célula (ARRUDA, 2000).

Os valores médios apresentados para VAP, VSL, VCL e ALH no presente estudo corroboram com os resultados obtidos por Gil et al. (2000).

Diversas pesquisas descrevem que a percentagem elevada de VAP, VSL, VCL e ALH encontrada na análise do sêmen pelo sistema CASA, condiz com hiperativação espermática (YANAGIMACHI, 1994; VERSTEGEN et al., 2002).

No homem valores de VCL e ALH acima de 150 µm/s e 7.0 µm, respectivamente, indicam uma hiperativação (LUCONNI et al., 2006). A hiperativação é considerada um componente do processo de capacitação.

Mesmo identificando o movimento hiperativo, pouco se sabe sobre sua origem. Acredita-se, que enquanto a capacitação espermática for ativada pela presença de glicosaminoglicanos e regulada pela produção de AMPc celular, a hiperativação seria relacionada com a biodisponibilidade de íons de cálcio (JANUSKAUSKAS et al., 2000).

Sabe-se que a capacitação espermática e reação acrossomal são fundamentais para a fecundação. Esses eventos só apresentam benefícios para espermatozóides que se encontram na proximidade do oócito, podendo ocorrer a morte celular prematura em espermatozóides que iniciam o evento antecipadamente (MORTIMER, 1997; MARTINEZ-RODRIGUEZ, 2006).

Melhores padrões de velocidade pelo CASA foram observados com sêmen diluído em diluidor livre de proteína animal, sendo este fato atribuído à baixa viscosidade do diluidor (VERSTEGEN et al., 2002).

O CASA deve ser associado a outros exames de avaliação espermática (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005). O touro é o modelo animal que mais apresenta variação entre as análises realizadas pelo CASA, mas mesmo assim, há correlação entre o movimento espermático e a fertilidade (VERSTEGEN et al., 2002).

Alguns autores observaram a correlação positiva entre diferentes padrões do movimento espermático analisado pelo CASA e a fertilidade *in vitro* (JEULIN et al., 1996).

6.1.4. CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA

A concentração espermática adotada pela central de inseminação que processou o sêmen manteve-se próximo aos limites estabelecidos por Vale Filho (1989) (15 a 25 x 10^6 por palheta de 0,25mL) para que ocorram índices satisfatórios de fecundação.

6.1.5. MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

A análise da morfologia espermática, classificada em defeitos maiores e menores de acordo com Blom (1973) foi realizada em todas as amostras logo após a descongelação. O diluidor não interferiu (p>0,05) na percentagem de defeitos maiores, menores e totais (Figura 10).

Thun et al. (2002) observaram o efeito do diluidor na morfologia espermática e concluíram que o diluidor à base de Tris e gema de ovo apresentou uma quantidade maior de defeitos maiores e o diluidor a base de lecitina de soja de defeitos menores. O presente estudo mostrou uma tendência para as mesmas observações, porém, não foi observada diferença significativa.

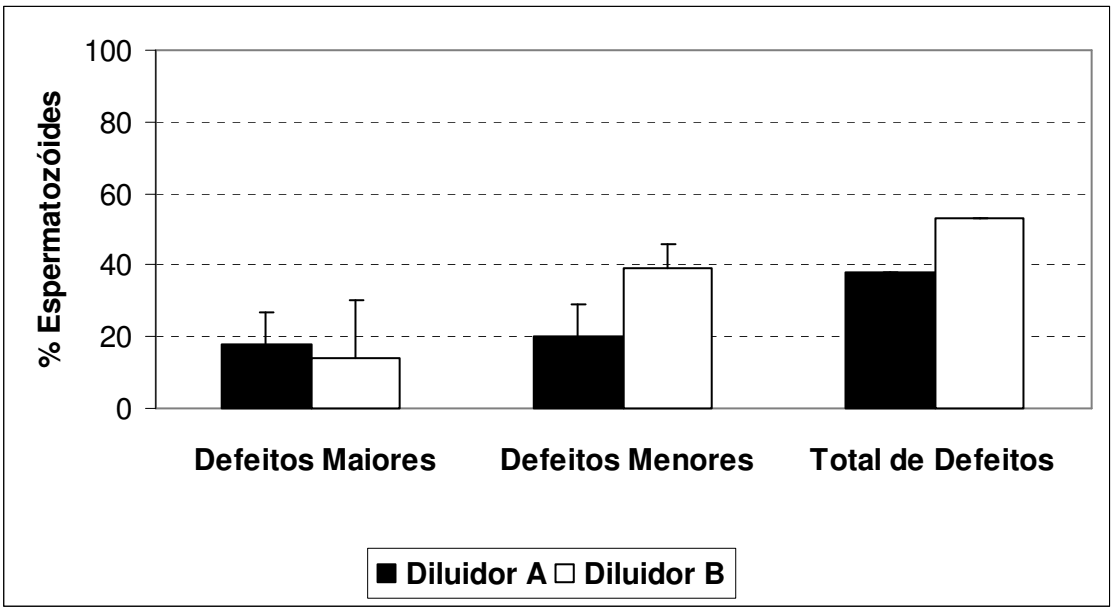

Figura 10 - Porcentagens de defeitos maiores e defeitos menores segundo Blom (1973) do sêmen congelado de quatro touros com o diluidore A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da UNESP - campus Araçatuba – SP, 2008.

6.1.6. SONDAS FLUORESCENTES

As avaliações da integridade da membrana plasmática, acrossomal e mitocondrial dos espermatozóides foram realizadas pela associação das sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1 (Figura 11), descrita por vários autores (EVENSON, 1980; CENTOLA et al., 1990; NAGY et al., 2004).

Para melhor visualização e análise das amostras houve a necessidade da retirada do diluidor por meio da centrifugação e ressuspensão em meio TALP-sêmen (CARREIRA, 2008). Esse procedimento permitiu uma melhor nitidez nas leituras das lâminas, provavelmente devido à redução da interação dos corantes com as partículas do meio diluidor.

Outros grupos de pesquisas também sugeriram a remoção das partículas da gema de ovo para uma avaliação espermática mais acurada pós-descongelação (VISHWANATH & SHANNON 2000; AIRES et al., 2003; NAGY et al., 2004; HALLAP, 2005).

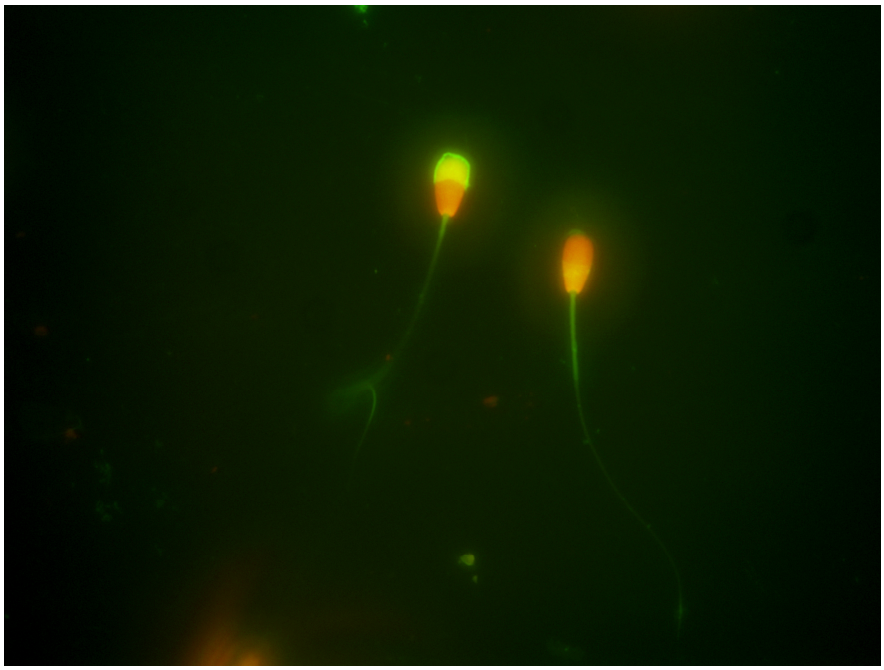

Figura 11 - Fotomicrografia de espermatozóide com acrossoma lesado, membrana citoplasmática lesada e com baixo potencial mitocondrial (esquerda). Espermatozóide com acrossoma íntegro, membrana citoplasmática lesada e com baixo potencial mitocondrial (direita). (FITC-PSA, JC-1, PI, aumento 400x). Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da UNESP - campus Araçatuba – SP, 2008.

Na tabela 3 encontram-se os valores médios, desvio padrão e mediana dos diferentes padrões de coloração para os diluidores A e B.

Tabela 3 - Valores médios ($\bar{x}$), desvio padrão (s) e mediana (Md) dos padrões de coloração fluorescentes obtidos pela associação das sondas FITC-PSA (aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com isotiocionato de fluoresceína), PI (iodeto de propídeo) e JC-1 (iodeto de 5, 5`, 6, 6`, - tetracloro – 1, 1, 3, 3` - tetraetilbenzimidazolilcarbocianina), após descongelação e lavagem do sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da UNESP - campus Araçatuba – SP, 2008.

Padrão (%)	Diluidor A		Diluidor B		p(1)
	$\bar{x} \pm s$	Md	$\bar{x} \pm s$	Md	
IIC	27,5 ±12,2	27	24,0 ± 19,6	24	0,875
IIS	8,0 ± 7,1	6	3,5 ± 7,0	0	0,125
ILC	0,5 ± 1,0	0	3,0 ± 6,0	0	1,000
ILS	36,5 ±12,7	37	51,0 ± 29,4	50	0,625
LIC	14,0 ±15,0	9	12,5 ± 9,9	10	0,875
LIS	0,5 ± 1,0	0	0,5 ± 1,0	0	1,000
LLC	6,5 ± 5,9	6	0,5 ± 1,0	0	0,250
LLS	106,5 ±20,2	109	105,0 ±18,0	114	0,750

(1) Teste de Wilcoxon (p>0,05).

IIC - Acrossomo íntegro, membrana citoplasmática íntegra e com potencial mitocondrial.
IIS – Acrossomo íntegro, membrana citoplasmática íntegra e sem potencial mitocondrial.
ILC – Acrossomo íntegro, membrana citoplasmática lesada e com potencial mitocondrial.
ILS – Acrossomo íntegro, membrana citoplasmática lesada e sem potencial mitocondrial.
LIC – Acrossomo lesado, membrana citoplasmática íntegra e com potencial mitocondrial.
LIS – Acrossomo lesado, membrana citoplasmática íntegra e sem potencial mitocondrial.
LLC – Acrossomo lesado, membrana citoplasmática lesada e com potencial mitocondrial.
LLS – Acrossomo lesado, membrana citoplasmática lesada e sem potencial mitocondrial.

A integridade da membrana plasmática foi avaliada pelo corante fluorescente PI. Os valores médios dos padrões IIC, IIS e LIC (membrana plasmática íntegra) obtidos com o sêmen congelado com o diluidor A (27,5% ± 12,2; 8,0% ± 7,1; 14,0% ± 15,0, respectivamente) e com o sêmen congelado com o diluidor B (24,0% ± 19,6; 3,5% ± 7,0; 12,5% ± 9,9, respectivamente), não havendo diferença estatística (p>0,05).

A integridade do acrossoma avaliado pelas sondas PSA-FITC para o sêmen congelado com o diluidor A foi de 72,5% ± 5,2 e com o diluidor B 81,5% ± 19,6, onde também não houve diferença estatística (p>0,05).

O potencial mitocondrial avaliado pela sonda JC-1 também não diferiu (p>0,05) entre o sêmen congelado com os diluidores testados.

Vários pesquisadores sugeriram o agrupamento dos padrões de coloração quanto à integridade do acrossoma, da membrana e potencial mitocondrial para facilitar a interpretação das leituras e resultados obtidos a partir da associação das sondas fluorescentes (CELEGHINI, 2005; GONÇALVES, 2006; CARREIRA, 2008). Os resultados seguem na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores médios ($\bar{x}$), desvio padrão (s) e mediana (Md) da integridade da membrana citoplasmática, integridade do acrossoma e presença de potencial mitocondrial obtidos pela associação pela associação das sondas FITC-PSA (aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com isotiocionato de fluoresceína), PI (iodeto de propídeo) e JC-1 (iodeto de 5, 5`, 6, 6`, - tetracloro – 1, 1, 3, 3` - tetraetilbenzimidazolilcarbocianina), após descongelação e lavagem do sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed®). Araçatuba, 2008.

Variável	**Diluidor A**		**Diluidor B**		p(1)
	$\bar{x}$ ± s	Md	$\bar{x}$ ± s	Md	
Acrossoma íntegro (%)	36,2 ± 5,2	71	40,7 ± 19,6	81	0,625
Membrana íntegra (%)	25,0 ± 22,8	51	20,2 ± 20,4	36	0,625
Potencial mitocondrial (%)	24,2 ± 29,4	45	20,0 ± 24,3	41	0,625

(1) Teste de Wilcoxon (p>0,05).

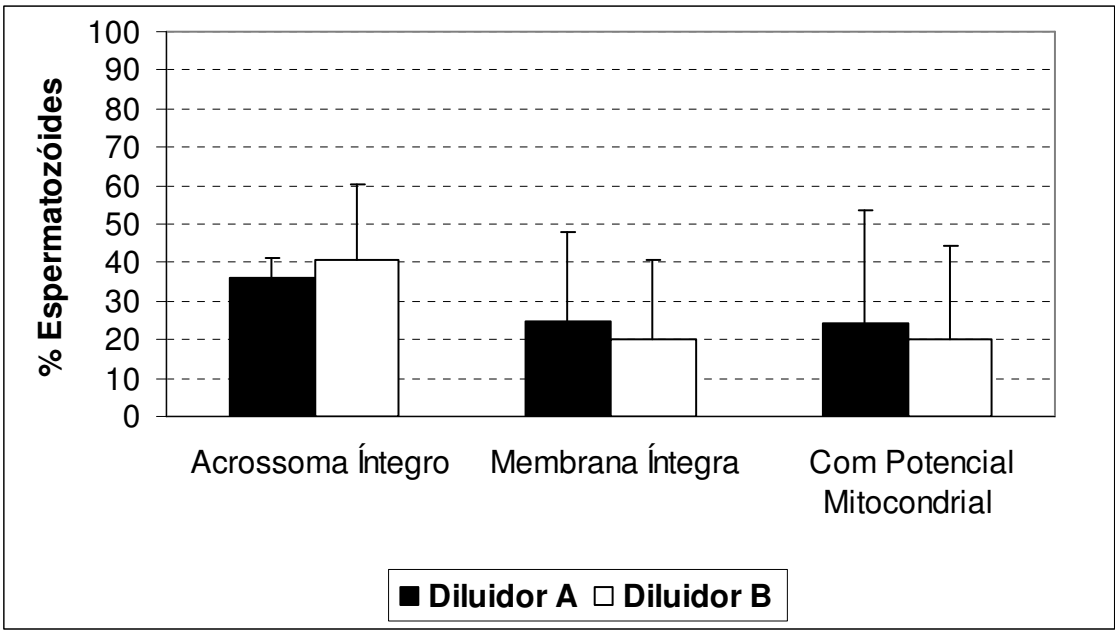

Figura 12 - Porcentagens de acrossoma íntegros, membrana íntegra e com potencial mitocondrial do sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da UNESP - campus Araçatuba – SP, 2008.

Como mostra a figura 12, não houve diferença significativa entre a percentagem de acrossoma íntegro, membrana plasmática íntegra e presença de potencial mitocondrial quando se comparou os diluidores A e B. Esses resultados corroboram com outros pesquisadores que avaliaram o efeito de diluidores à base de gema de ovo e à base de lecitina de soja na proteção à membrana plasmática de espermatozóides bovinos (GIL et al., 2000; CHRISTENSEN et al., 2005; JANETT et al., 2005).

Já Celeghini et al. (2007) utilizando o meio a base de Tris e gema de ovo observaram uma melhor proteção da membrana plasmática e manutenção do potencial mitocondrial espermático.

Sugere-se que diluidores à base de gema de ovo podem oferecer uma melhor proteção à membrana plasmática e ao potencial mitocondrial de espermatozóides bovinos criopreservados em relação à diluidores que não contêm gema de ovo (THUN et al., 2002).

As lipoproteínas e fosfolipídeos presentes na gema de ovo são responsáveis pelo mecanismo de proteção das membranas espermáticas, aumentando a proporção colesterol/fosfolipídeos dos espermatozóides e reduzindo a ocorrência de choque térmico.

O sêmen diluído e congelado com o diluidor B mostrou uma melhor crioproteção da membrana acrossomal (81,5% ± 19,6) em relação ao diluidor A (72,5% ± 5,2), porém não apresentou diferença estatística, corroborando com as observações feitas por vários grupos de estudo (HINSCH et al., 1997 a,b; GIL et al., 2000; AIRES et al., 2003).

Já outros pesquisadores observaram que o diluidor à base de Tris e gema de ovo protegeu melhor a membrana acrossomal (MUINO et al., 2007; CELEGHINI et al., 2007), divergindo dos resultados obtidos no presente estudo. Os resultados da percentagem de acrossomas íntegros realizada pelas sondas PSA-FITC sugerem que o diluidor B pode conferir melhor proteção ao acrossoma.

6.1.7. TESTE HIPOSMÓTICO (HIPO)

Para que ocorra capacitação espermática, reação acrossomal e penetração do espermatozóide no oócito, é necessário que a membrana espermática esteja bioquimicamente ativa.

O espermatozóide deve ter capacidade de regular o volume celular quando é submetido às diferenças osmóticas para manutenção de sua motilidade e fertilidade (LUCONI et al., 2006).

No presente experimento a HIPO foi utilizada para identificar a integridade funcional da membrana plasmática espermática.

Durante a leitura dos espermatozóides avaliados pela HIPO uma variedade de diferentes tipos de caudas enroladas e dobradas (Figura 13) foi observada, desde a porção final, a cauda fortemente enrolada e as caudas parcialmente enroladas. As flexões observadas em graus diferentes nos filamentos do axonema da cauda podem ocorrer conforme a quantidade de água que penetra a membrana (SIQUEIRA et al., 2007).

Figura 13 - Fotomicrografia de espermatozóides reativos ao HIPO (membrana funcional). Aumento (1000x). Laboratório Fertvitro / Unirp - São José do Rio Preto – SP, 2008.

A percentagem de espermatozóides reativos ao HIPO do sêmen congelado com o diluidor A (57%) foi superior ao grupo do diluidor B (43,5%) (Figura 14). Quando se comparou os valores médios entre os diluidores, não se verificou diferença significativa ($p>0,05$), corroborando com os resultados obtidos por Gil et al. (2000). Foram notadas diferenças individuais entre os touros, mas também não foram significantes ($p> 0,05$).

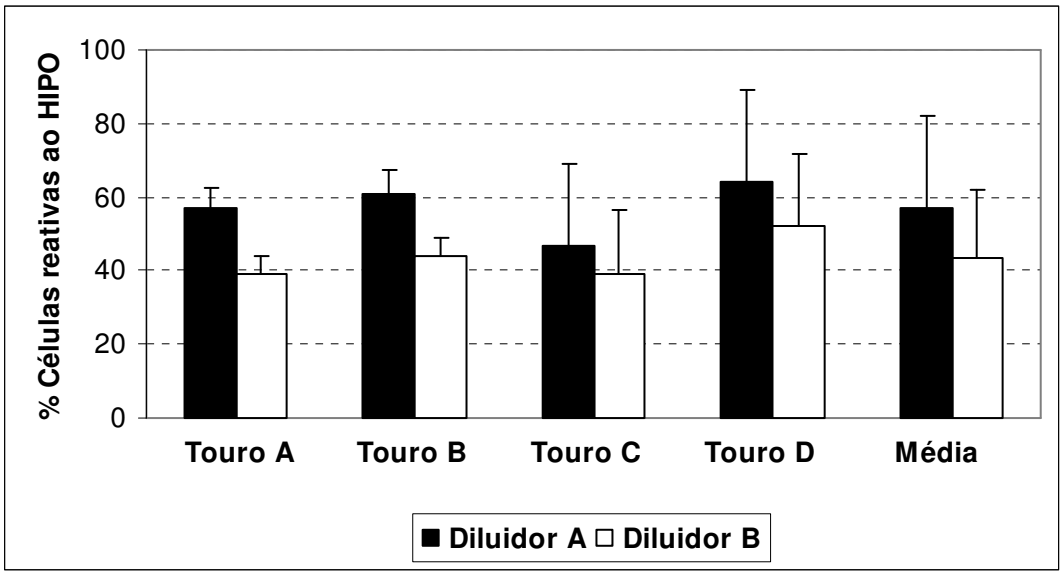

Figura 14 - Percentagens de células reativas ao HIPO do sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório Fertvitro / Unirp - São José do Rio Preto – SP, 2008.

Sugere-se que o diluidor à base de gema de ovo conferiu melhor funcionalidade à membrana plasmática em relação ao diluidor B. As lipoproteínas e os fosfolipídeos presentes na gema de ovo são responsáveis pelo mecanismo de proteção das membranas espermáticas, e o aumento na proporção colesterol/fosfolipídeos dos espermatozóides podendo reduzir a ocorrência de choque térmico (AMMAN & PICKETT,1987; HAMMERSTEDT et al., 1990; WHITE, 1993; AMIRAT et al., 2004) .

Thun et al. (2002) verificaram que o sêmen congelado com diluidor composto por lecitina de soja obteve baixa resistência osmótica comparado ao sêmen congelado com Tris e gema de ovo.

Na literatura os dados que relacionam o teste hiposmótico e a fertilidade *in vivo* e *in vitro* são divergentes (JEYENDRAN, et al., 1984; CORREA et al., 1997; BRITO et al., 2003).

Alguns trabalhos encontraram correlação positiva entre o HIPO e a fertilidade (JEYENDRAN, et al., 1984; CHAN et al., 1991).

Já no presente experimento não se observou correlação positiva entre o HIPO e a PIV, corroborando com os resultados obtidos por Rota et al. (2000).

A utilização do HIPO como único teste para predizer a capacidade de fecundação não é recomendado (JEYENDRAN et al., 1992; SALLAM et al., 2003).

6.2. EXPERIMENTO II (PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES)

A fertilidade *in vivo* de sêmen criopreservado em diferentes diluidores foi bem estudada, onde se concluiu que o sêmen bovino congelado em meio à base de lecitina de soja pode substituir a gema de ovo (HINSCH et al., 1997a; GIL et al., 2000; MULLER-SCHLOSSER et al., 2001; THUN et al., 2002; AIRES et al., 2003).

Na literatura, porém, existem poucos estudos utilizando a PIV para avaliar a capacidade de fecundação *in vitro* de espermatozóides bovinos criopreservados com diferentes diluidores (LONERGAN et al., 1993; COELHO et al., 1996; BOUSSEAU et al., 1998; COELHO et al., 2000; AMIRAT et al., 2004) e como a PIV mostrou-se ser um teste eficaz para avaliar a fertilidade. (MARQUANT-LE GUIENNE & HUMBLOT, 1992), procurou-se comparar a atuação dos diluidores A e B na taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário.

A Tabela 5 mostra que não houve diferença significativa em relação à taxa média de clivagem (calculada a partir do número de oócitos inseminados) entre os diluidores.

Quando avaliado o efeito dos diluidores em relação aos touros, o touro A (71,33%) e D (70,00%) obtiveram melhores resultados na clivagem com o diluidor B e os touros B (75,00%) e C (74,33%) com o diluidor A, mas os valores médios não diferiram estatisticamente ($p>0,05$) (Figura 15), corroborando com os resultados obtidos por outros estudos (BOUSSEAU et al., 1998; NABIEV et al., 2003).

Alguns pesquisadores avaliaram o número de espermatozóides ligados à zona pelúcida e a capacidade de indução da reação acrossomal de sêmen bovino congelado com diluidor à base de gema de ovo e à base de lecitina de soja e não encontraram diferença estatística entre os diluidores. Estes estudos, porém, não realizaram a técnica de PIV, mas verificaram a ligação à zona pelúcida e capacidade de reação acrossomal, condição básica para que ocorra

fecundação e clivagem (GIL et al., 2000; MULLER-SCHLOSSER et al., 2001; AIRES et al., 2003; NABIEV et al., 2003).

Assim, os espermatozóides que passaram pelo processo de diluição e criopreservação, há necessidade das membranas plasmática e acrossomal permanecerem íntegras.

Tabela 5 - Valores médios ($\bar{x}$) e desvio padrão (s) da % de clivagem* do sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório Fertvitro / Unirp - São José do Rio Preto – SP, 2008.

Touro	Diluidor ($\bar{x} \pm s$)		Total
	A	B	
A	63,67 ± 7,20 abA	71,33 ± 7,87 aA	67,50 ± 8,23
B	75,00 ± 7,97 aA	62,67 ± 4,13 aB	68,83 ± 8,84
C	74,33 ± 7,63 aA	63,00 ± 6,16 aB	68,67 ± 8,88
D	53,33 ± 5,61 bB	70,00 ± 6,07 aA	61,67 ± 10,33
Total	66,58 ± 11,26	66,75 ± 7,05	

* % de clivagem foi calculada pelo número de oócitos inseminados.

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

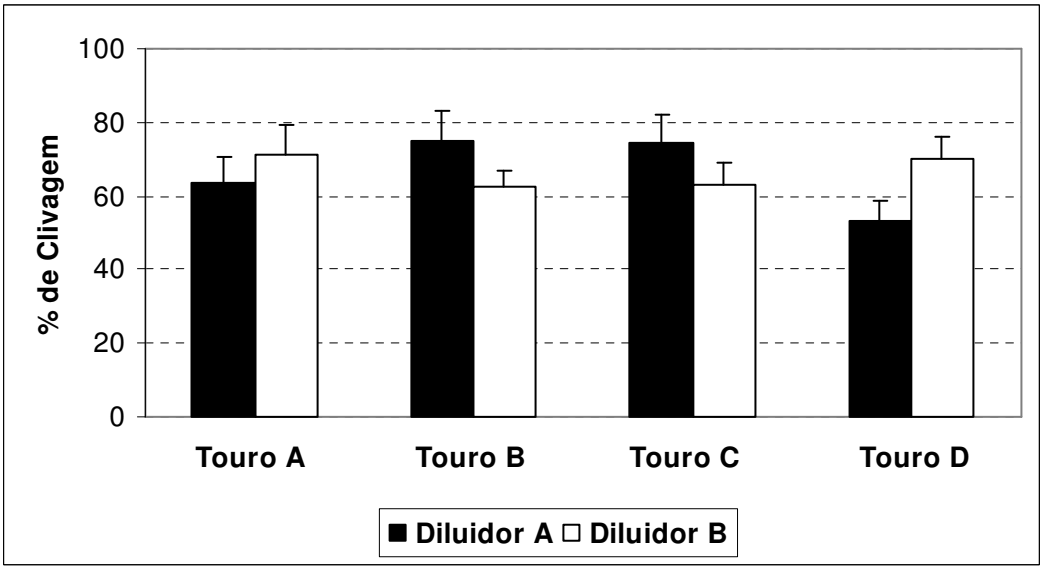

Figura 15 - Valores médios da taxa de clivagem obtida com o sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório Fertvitro / Unirp - São José do Rio Preto – SP, 2008.

Os resultados da taxa de clivagem dos touros A (71,33%) e D (70,00%), foi semelhante à obtida por Bousseau et al. (1998) que também pesquisaram o sêmen congelado com o diluidor à base de lecitina de soja de dois touros diferentes (70,00% e 70,50%).

Já Coelho et al. (2000) obtiveram taxa média de clivagem mais baixa quando utilizaram sêmen diluído e congelado com diluidor Tris e gema de ovo quando camparada ao estudo presente (54,50% e 66,58%, respectivamente).

Os diluidores A e B não interferiram na taxa de clivagem, contrastando com outras pesquisas que verificaram a influência do diluidor na taxa de clivagem (COELHO et al., 2000; LONERGAN et al., 1993).

Os resultados apresentados na tabela 5 e 6, referente à taxa média de clivagem e percentagem de blastocistos, mostram uma forte correlação positiva.

Na tabela 6 estão apresentados os valores médios e desvio padrão da percentagem de embriões produzidos *in vitro* (calculada a partir do número de oócitos inseminados). Não foi encontrada diferença estatística ($p>0,05$) entre a os diluidores testados.

O touro A (37,33%) e D (39,33%) apresentaram uma percentagem de embriões *in vitro* mais alta, quando o ejaculado foi diluído e criopreservado com o diluidor B. Já os touros B (40,67%) e C (37,00%) apresentaram uma percentagem melhor quando o ejaculado foi diluído e criopreservado com o diluidor A (Figura 16).

A taxa média de embriões bovinos que atingem o estágio de blastocisto em meios tradicionais de cultivo está entre 30% a 40% (GORDON et al., 1994; BAVISTER, 1995; CAROLAN et al., 1996), corroborando com os resultados do presente experimento.

Bousseau et al. (1998) não observaram diferença significativa na produção de blastocistos *in vitro* quando utilizaram sêmen congelado com diluidor à base de lecitina de soja em relação ao sêmen congelado com diluidor a base de leite.

A percentagem média de embriões produzidos *in vitro* (33,17%) foi superior ao resultado apresentado por Bousseau et al. (1998) (17,0%) quando utilizou-se sêmen congelado com diluidor livre de proteína animal.

Nabiev et al. (2003) compararam o uso do diluidor Andromed® com um diluidor à base de Tris e gema de ovo e não observaram diferença estatística no resultado da PIV, corroborando com os resultados obtidos no presente experimento.

Existem poucos trabalhos na literatura que testaram sêmen congelado com diluidor à base de lecitina de soja na PIV.

Alguns estudos mostraram que o diluidor não interfere significativamente no desenvolvimento embrionário *in vitro*, porém os autores não testaram diluidores à base de lecitina de soja (LONERGAN et al., 1993; COELHO et al., 2000; AMIRAT et al., 2004).

Tabela 6 - Valores médios ($\bar{x}$) e desvio padrão (s) da % de blastocistos do sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório Fertvitro / Unirp - São José do Rio Preto – SP, 2008.

Touro	**Diluidor ($\bar{x} \pm s$)**		**Total**
	A	**B**	
A	29,67 ± 4,08 bB	37,33 ± 4,32 abA	33,50 ± 5,66
B	40,67 ± 3,27 aA	29,67 ± 4,46 bcB	35,17 ± 6,85
C	37,00 ± 5,33 aA	26,33 ± 4,08 cB	31,67 ± 7,18
D	27,00 ± 3,03 bB	39,33 ± 8,55 aA	33,17 ± 8,88
Total	33,58 ± 6,75	33,17 ± 7,60	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

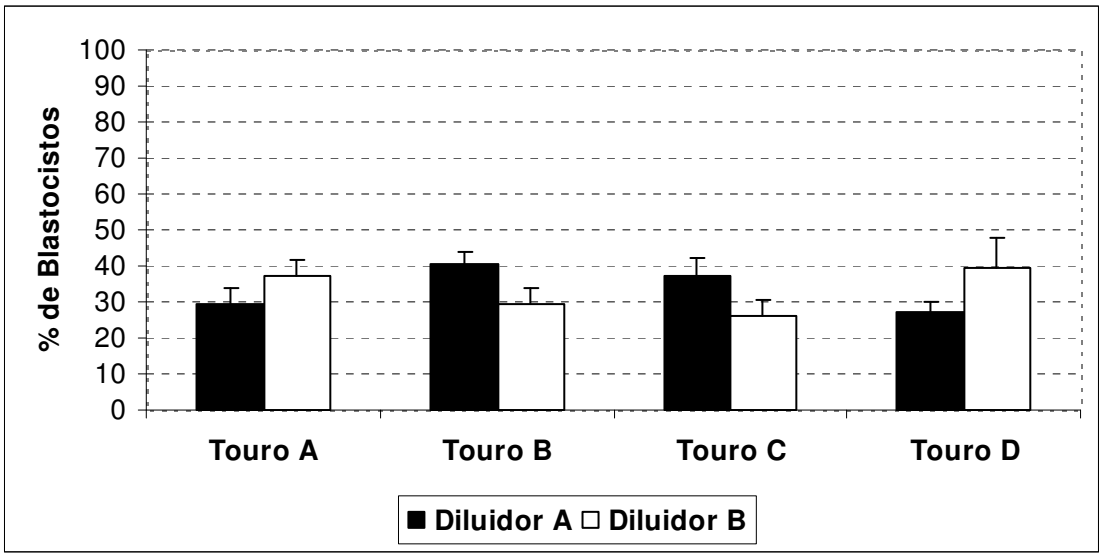

Figura 16 - Valores médios de blastocistos produzidos *in vitro* pelo sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório Fertvitro / Unirp - São José do Rio Preto – SP, 2008.

A diferença encontrada na FIV e no desenvolvimento embrionário entre touros (HILLERY et al., 1990; BARANDI et al., 1993; KATSKA & RYNSKA, 1994; GALLI et al., 2003) pode ser ocasionada por inúmeros fatores durante o procedimento, dentre eles o preparo do sêmen.

Os ejaculados congelados com os diluidores testados obtiveram taxas aceitáveis de clivagem e embriões produzidos *in vitro* (Figura 17).

Mesmo utilizando um método eficiente de seleção espermática *in vitro*, os processos de fecundação e desenvolvimento embrionário ainda podem ser afetados pelo diluidor do sêmen utilizado (ANZAR & GRAHAM, 1995).

Na PIV, dois touros obtiveram melhores taxas de clivagem e produção de embriões quando os ejaculados usados foram diluídos e congelados com o diluidor à base de lecitina de soja e dois touros apresentaram melhores resultados com o diluidor à base de Tris e gema de ovo, corroborando com os resultados obtidos por Lonergan et al. (1993) que sugeriram uma possível interação entre touro e diluidor utilizado no processamento do sêmen. Porém, outros estudos ainda devem ser estabelecidos.

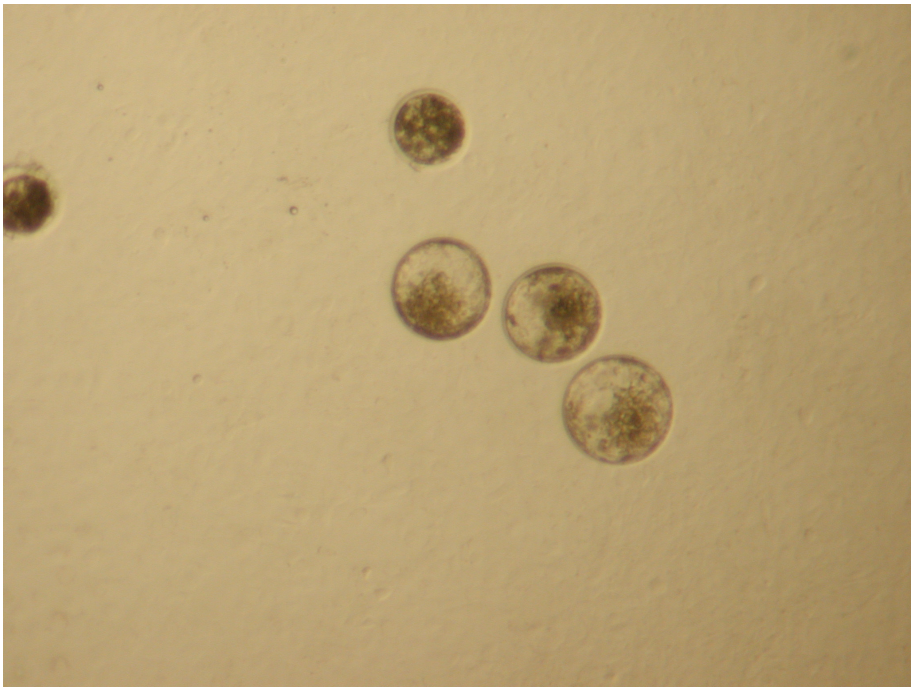

Figura 17 - Fotomicrografia de blastocistos produzidos *in vitro* no D7 após a FIV. Aumento (1000x). Laboratório Fertvitro / Unirp - São José do Rio Preto – SP, 2008.

No D9 foi observado a eclosão dos embriões produzidos *in vitro* (Figura 19). A percentagem de eclosão (calculada a partir do número de blastocistos obtidos no D7) mostrado na Tabela 7, porém não foi diferente ($p>0,05$) entre diluidores e entre os touros (Figura 20).

Tabela 7 - Valores médios ($\bar{x}$) e desvio padrão (s) da % de blastocistos eclodidos em relação ao numero de blastocistos no D7 do sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório Fertvitro / Unirp - São José do Rio Preto – SP, 2008.

Touro	Diluidor ($\bar{x} \pm s$)		Total
	A	B	
A	77,54 ± 5,06 aA	77,01 ± 5,52 aA	77,27 ± 5,06
B	77,92 ± 5,54 aA	75,19 ± 2,19 aA	76,55 ± 4,26
C	75,92 ± 4,07 aA	77,54 ± 4,12 aA	76,73 ± 3,99
D	73,24 ± 7,82 aA	77,29 ± 2,31 aA	75,26 ± 5,89
Total	76,15 ± 5,72	76,76 ± 3,66	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

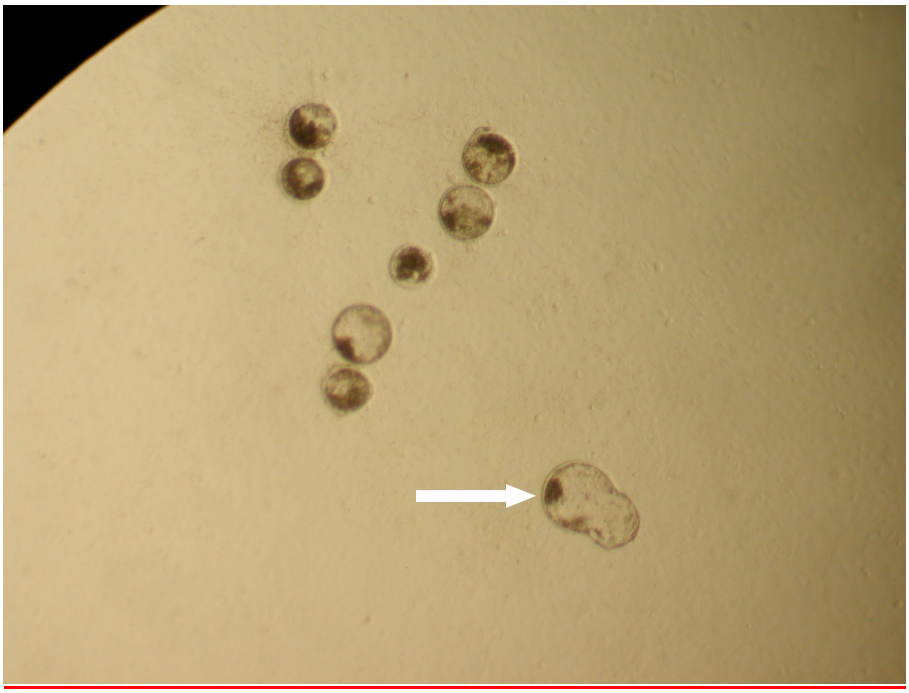

Figura 18 - Fotomicrografia de blastocistos produzidos *in vitro* no D9 após a FIV, detalhando a eclosão embrionária (seta). Aumento (500x). Laboratório Fertvitro / Unirp - São José do Rio Preto – SP, 2008.

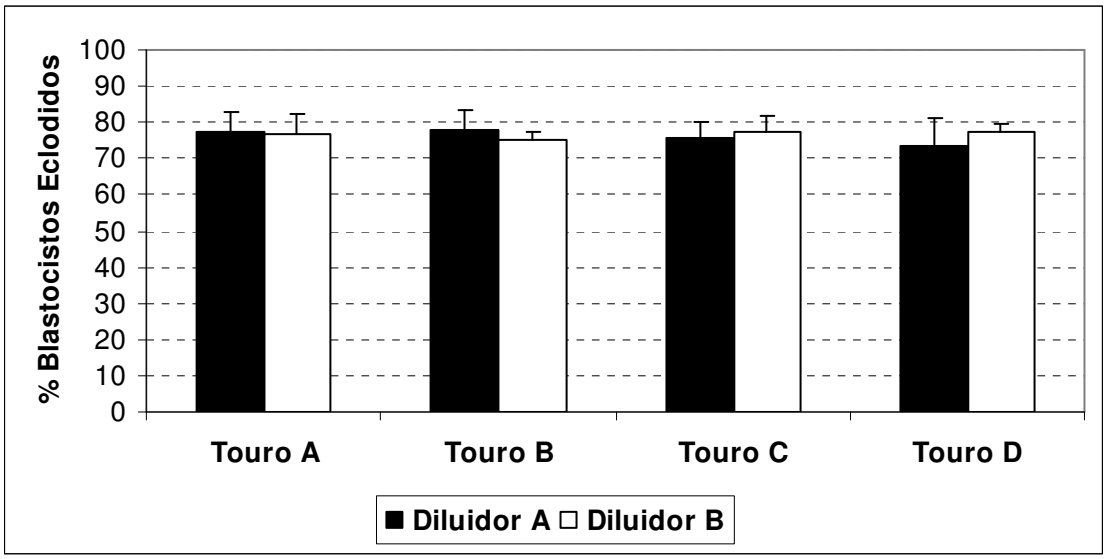

Figura 19 - Valores médios de embriões blastocistos eclodidos produzidos *in vitro* pelo sêmen congelado de quatro touros com o diluidor A (Tris e gema de ovo) e com o diluidor B (Andromed® - lecitina de soja). Laboratório Fertvitro / Unirp - São José do Rio Preto – SP, 2008.

6.3. CONCLUSÃO

Considerando os objetivos previamente delineados bem como os resultados obtidos nos experimentos I e II pode-se concluir que:

- Os testes complementares e a produção *in vitro* de embriões utilizados no experimento I e II foram satisfatórios para avaliar a qualidade de uma amostra seminal;
- O diluidor à base de soja pode substituir o diluidor composto pelo Tris e gema de ovo, respeitando-se as variações individuais relativas aos touros utilizados no presente experimento;
- Ambos os diluidores utilizados no presente experimento foram eficientes no processo de PIV, porém, sugere-se que a relação diluidor e touro pode afetar as taxas de clivagem e produção de blastocistos.

VI. REFERÊNCIAS

AHMADI, A.; SOON-CHYE, N.G. Fertilizing ability of DNA-damage spermatozoa. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v.284, p.696-704, 1999.

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

ALVES, S.G.G.; SNOECK, P.P.N.; RIBEIRO FILHO, A. de L.; BITTENCOURT, R.F.; PORTELA, A.P.M.; MELO, M.I.V.; HENRY, M. Effects of solution, incubation time and sperm fixation on equine cryopreserved sperm cells submitted to the hypoosmotic swelling test. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION,15., 2004, Porto Seguro. **Abstracts**… Belo Horizonte: CBRA, 2004.

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

AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GERARD, O. COURTENS, L.J.; ANTON, M. Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, New York, v. 61, p.895-907, 2004.

AMIRAT, L.; ANTON, M.; TAINTURIER, D.; CHATAGNON, G.; BATTUTT, I.; COURTENS, L.J. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. **Reproduccion**, Dordrecht, v.129, p.535-543, 2005.

ANZAR, M.; GRAHAM, E.F. Effect of filtration on post-thaw quality of bull semen. **Theriogenology**, New York, v.43, p.439-449, 1995.

ARRUDA, R. P. **Avaliação do sêmen congelado de bovinos. Provas lenta e rápida de termo-resistência: efeitos sobre a fertilidade.** 1988. 41f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.

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

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

ASBIA - Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Disponível em: <http:// .>. Acesso em: 30 mar. 2008.

ASHWOOD-SMITH, M.J. Mechanisms of cryoprotectant action. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, Cambridge, v.41, p.395-406, 1987.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.89, p.65-75, 2005.

AVERY, B.; GREVE, T. Impact of percoll on bovine spermatozoa used for in insemination. **Theriogenology**, New York, v.44, p.871-878, 1995.

BALL, B.A.; MEDINA, V.; GRAVANCE, C.G.; BAUMBER, J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. **Theriogenology**, New York, v.56, p.577-589, 2001.

BARANDI, Z.S.; SOLTI, L.; CSEH, S.; VARGA, Z.S.; MACHATY, Z.; VAJTA, G. Comparison of the in vitro fertilizing ability of sperm from endangered Hungarian Grey bulls. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.31, p.13-19, 1993.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iwoa State University Press, 1989. 285 p.

BAVISTER, B. D. Culture of preimplantation embryos: facts and artfacts. **Human Reproduction Update**, Oxford, v.1, p.91-148, 1995.

BECKER, W. C.; SENGER, P. L.; AALSHET, E. P.; MARSHALL, C. E. Influence of glycerol levels, diluent and post-thaw temperature on motility and acrosomal maintenance in bovine semen frozen in plastic straws. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.44, p.1067-1071, 1977.

BERGERON, A., CRETE, M.H., BRINDLE, Y. et al. Low density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of Reproduction**, Madison, v.70, n.3, p.708-717, 2004.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermiogran. **Nordisk Veterinaer medicin**,Vanlose, v.53, p. 383-391, 1973.

BOCHENEK, M.; SMORAG, Z.; PILCH, J. Sperm chromatin structure assay of bull qualified for artificial insemination. **Theriogenology**, New York, v.56, p.557-567, 2001.

BOE-HANSEN, G.B.; CHRISTENSEN, P.; VIBJERG, D.; NIELSEN, M.B.F.; HEDEBOE, A.M. Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility. **Theriogenology**, New York, v.69, p.728-736, 2008.

BOERSMA, A.; RABHOFE, R,; STOLLA, R. Influence of sample preparation, staining procedure and analysis conditions on bull sperm head morphometry using the morphology analyser integrated visual optical system. **Universität, Munich**, v.36, n.5, p.222-229, 2001.

BOLS, P. E. J. ; LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; SOOM, A.V. A comparison of a mechanical sector and a linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. **Theriogenology**, New York, v.62, p.906-914, 2004.

BOUSSEAU, S.; BRILLARD, .P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GUERIN, B.; CAMUS, A.; LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, New York, v. 50, p.699-706, 1998.

BOYER, S.P.; DAVIS, R.O.; KATZ, D.F. Automated semen analysis. **Current Problems in Obstetrics, Gynecology and Fertility**, St Louis, v.12, p.167-200, 1989.

BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; BILODEAU-GOESEELS, S.; PANICH, P.L.; KASTELIC, J.P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with *in vitro* fertilization rate. **Theriogenology**, New York, v.60, p.1539–1551, 2003.

CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; KHATIR, H.; MERMILLOD, P. *In vitro* production of bovine embryos using individual oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 45, p. 145-150, 1996.

CARREIRA, J. T. **Avaliação da integridade do acrossoma, membrana citoplasmática, cromatina, potencial mitocondrial e da capacidade de fertilização e desenvolvimento embrionário em FIV de sêmen bovino com altos índices de gota citoplasmática proximal.** 2008. 75f**.** Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Jaboticabal, 2008.

CASAGRANDE, J. F.; PINHEIRO, L. E. L.; ALMEIDA, C. A.; FERRAZ, J. B. S. A influência da motilidade e da velocidade espermática sobre a fertilidade do sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.3, n.2, p. 31-35, 1980.

CASEY, P.J.; HILLMAN, R.B.; ROBERTSON, K.R.; YUDIN, A.I.; LIU, I.K.M.; DROBINS, E.Z. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **Journal of Andrology**, Lenexa, v.14, p.289–297, 1993.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2.ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49p.

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes.** 2005. 186f.Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CELEGHINI E.C.C.; ARRUDA, R.P.;ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL C.F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin,v. 42, p.479–488, 2007.

CENTOLA, G.M.; MATTOX, J.H.; BURDE, S.; LEARY, J.F. Assessment of the viability and acrossome status of fresh and frozen-thawed human spermatozoa using single-wavelength fluorescence microscopy. **Molecular of Reproduction and Development**, New York, v..27, n.2, p.130-135, 1990.

CHACUR, M. G. M. **Avaliação da congelação de sêmen bubalino com os diluidores Glicina-gema, Tryladil® e TES em diferentes tempos de equilíbrio**. 1996. 105f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1996.

CHAN, P.J.; TREDWAY, D.R.; CORSELL,I J.; PANG, S.; SU, B.C. Combined supravital staining and hypoosmotic swelling. **Human Reproduction**, Oxford, v.6, p.1115-1118, 1991.

CHRISTENSEN, P.; HANSEN, C.; LIBORIUSSEN, T.; LEHN-JENSEN, H. Implementation of flow cytometry for quality control in four Danish bull studs. **Animal Reproduction Science,** Amsterdam, v.85, p.201-208, 2005.

COELHO, L.A., ESPER, C.R., GARCIA, J.M. The effect of extender on the production of bovine embryos fertilized *in vitro*. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 13., 1996, Sidney. **Proceedings**…Sidney: University of Sidney, 1996. p.8-13.

COELHO, L. A.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M.; VANTINI, R.; ALMEIDA Jr. I.L. Fecundação *in vitro* de oócitos bovinos com sêmen submetido a diferentes diluidores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.29, n.2, p.397-402, 2000.

CONCANNON P.W.; BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: Kirk R.W. (Ed.). **Current veterinary herapy**. Philadelphia: WB Saunders, 1989. p.1247-1259.

CORREA, J.R.; HEERSCHE, G.J.R.; ZAVOS, P.M. Sperm membrane functional integrity and response of frozen-thawed bovine spermatozoa during the hypoosmotic swelling test incubation at varying temperatures. **Theriogenology,** New York, v.47, p.715-712, 1997.

COSSON, J.A. A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. **Cell Biology International**, London, v.20, p. 83-94, 1996.

CROS, N.L.; MORALES, P.; OVERSTREET, J.W.; HANSON, F.W. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. **Gamete Research**, New York, v.15, p.213-226, 1986.

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

CURRY, M.R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Reviews of Reproduction**, v.5, p.46-52, 2000.

DALIMATA, A.M.; GRAHAM, J.K. Criopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, New york, v.48, p.831-841, 1997.

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

DELL'AQUA JUNIOR, J.A.; PAPA, F.O.; FREITAS, C.P.; ALVARENGA, M.A.; MELO, C.M.; CRESPILHO, A.; SIQUEIRA FILHO, E.R.; ALBERTI, K.; DE VITA, B.; BARCELLOS, G.; MEDEIROS, A.S.L. Nova proposta de diluidor para semen bovino quimicamente definido. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, Suplemento 3, v.35, p. 1001, 2007.

DEN DAAS, J.H.G. **Prediction of bovine male fertility**. 1997.168f. Thesis (PhD.)- Wageningen, Wageningen University, 1997.

DIMITROPOULOS, E. La signification du test de la thermoresistence dans l'appreciation de valeur fécondante du sperme congelé. **Ann. Méd. Vet**., v.4, p.215-24, 1967.

D'OCCHIO, M.J.; HENGSTBERGER, K.J.; JOHNSTON, S.D. Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.101, p.1-17, 2007.

DODE, M. A. N.; RUMPF, R. Produção *in vitro* de embriões na espécie bovina. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n.26, p.32-37, 2002.

EVENSON, D.P. Flow citometry evaluation of male germ cells. In: YEN, A. (Ed.). **Flow Citometry:** advanced research and clinical applications. Boca Ranton: CRC Press, 1980. p. 217-246.

EVENSON, D.P. **Alternations and damage of sperm chromatin structure and early embryonic failure.** Towards Reproductive Certainty: fertility and Genetics Beyond. New York: Parthenon Publishing Group, 1999. p.313-329, 1999.

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

FARLIN, M.E.; JASKO, D.J.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Assessment of *Pisum sativum* agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.32, p.23-27, 1992.

FARREL, P.B.; PRESICCE, C.C.; BROCKET, R. H.; FOOTE, R. H. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and relationship to fertility. **Theriogenology**, New York, v.49, p.871-879, 1997.

FERREIRA, J.C.P.; NEVES NETO, J.R.; PAPA, F.O. Avaliação computadorizada das características espermáticas de garanhões com fertilidade comprovada. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.21, p.131-132, 1997.

FERREIRA, J.C.P. **Avaliação subjetiva e computadorizada do movimento espermático pós-descongelação do sêmen eqüino**. 2000. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

FONSECA, V. O.; VALE FILHO, V. R.; MIES FILHO, A.; ABREU, J. J. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1992. p.30-31.

FONSECA, V.O. **Fisiologia da reprodução. Curso de Pós-Graduação Latu Sensu Tutoria à Distância Julgamento de Raças Zebuínas:** modulo V. Uberaba: Fazu Abcz, 1, 1999. p.128.

FONSECA, J.F.; TORRES, C.A.A.; ROVAY, H.; BORGES, A.M.; BARBOSA, L.P.; MAFFILI, V.V; FRAGA, D.B.M. Hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.25, n.3, p.436-457, 2001.

FOOTE, R.H.; ARRIOLA, J. Motility and fertility of bull sperm frozen-thawed differently in egg yolk and milk extenders containing detergent. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.70, p.2642-2647, 1987.

FRASER, L. Structural damage to nuclear DNA in mammalian spermatozoa: its evaluation techniques and relationship with male infertility. **Polish Journal of Veterinary Science**, v.7, n.4, p.311-321, 2004.

FUKUI, Y.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; HIWASA, M.; OKABE, K. Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender (Andromed®) in sheep. **Journal of Reproduction and Development**., Fuchu, 2008.

GADEA, J.; SELLES, E.; MARCO, M.A. The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.39, p.303–308, 2004.

GADELLA, B. M.; FLESCH, F. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1469, p.197-235, 2000.

GALLI, C.; LAZARRI, G. Practical aspects of IVM / IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.371-379, 1996.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUT, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**. v.59, p.599-616, 2003.

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

GIL, J.; JANUSKAUSKAS, A.; HAARD, M.Ch.; HAARD, M.G.M.; JOHANISSON, A.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-Plus® and Tryladil®. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.35, p.69–77, 2000.

GIL, J.; LUNDEHEIM, N.; SODERQUIST, L.;RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. **Theriogenology**, New York, v.59, p.1241-1255, 2003.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varrela, 2002. 195p.

GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.212-217, 2007.

GONÇALVES, F.S. **Efeitos de antioxidantes adicionados ao meio de fecundação *in vitro* sobre a capacitação espermática e desenvolvimento embrionário em bovinos.** 2006. 149f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

GONSALES, J. A. C.; DESCHAMPS, J. C.; CORREA, M. N.; LUCIA, T. JR.; MACHADO, A. C.; RECH, D. C. Fertilidade do sêmen suíno preservado a 5°C em dulente contendo trealose. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.5, n.3, p.233-236, 1999.

GONZALEZ, R.A.F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino**.2004. 94f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

GORDON, I. **Laboratory Production of Cattle Embryo**. Cambridge: CAB International, University Press, 1994. 640p.

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

GRAVANCE, C.G.; GARNER, D.L.; BAUMBER, J.; BALL, B.A. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**. v.53, p.1691-1703, 2000.

GUIXUE, Z.; LUCIANO, A. M.; COENEN, K.; GANDOLFI, F.; SIRARD, M.A. The influence of cAMP before or during bovine oocyte maturation on embryonic developmental competence. **Theriogenology**. v.55, p.1733-1743, 2001.

GÜNZEL-APEL, A.R.; GUNTHER, C.; TERHAER, P.; BADER, H. Computer-assisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**. v.47, p.271-278, 1993.

HAFEZ, E. S. E., HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7.ed., São Paulo: Manole. 2004. 509p.

HALANG, W.; FRANK, K.; BOHNENSACK, R. Zur bestimnung der menje intakter spermien in Bullenejakulaten. **Arquiv. Exper. Vet. Med**., Leipizig, v.38, n.1, p.105-114, 1984.

HALLAP, T. **Assessment of sperm attributes of frozen-thawed AI doses from Swedish and Estonian dairy bulls sires**. Tese de doutorado (Divison of comparative Reproduction, Obstetrics and Udder Health) – Department of Clinical Sciences-Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. 2005. 34p.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of Mammalian Sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**. v.11, p.73-88, 1990.

HERMAN, H.A.; MITCHELL, J.R.; DOAK, G.A. **The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle**. 8th ed. Illinois: Interstate Publishers, 1996. 382p.

HEROLD, F.C.; DE HAAS, K.; COLENBRANDER, B.; GERBER, D. Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from African buffalo (*Syncerus caffer*) using Triladyl® or AndroMed®. **Theriogenology**, New York, v.66, p.1123-1130, 2006.

HILLERY, F.L.; PARRISH, J.J.; FIRST, N.L. Bull specific effect on fertilization and embryo development *in vitro*. **Theriogenology**, New York, v.33, p.249, 1990.

HINSCH, E.; HINSCH, K.D.; BOEHM, J.G.; SCHILL, W.B.; MUELLER-SCHLOESSER, F. Functional parameters and fertilization success of bovine semen cryopreserved in egg-yolk free and egg-yolk containing extenders. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.32, p.143-149, 1997a.

HINSCH, E.; PONCE, A.A.; HAGELE, W.; HEDRICH, F.; MULLER-SCHLOSSER, F.; SCHILL, W.B.; HINSCH, K.D. A new combined *in vitro* test model for the identification of substances affecting essential sperm functions. **Human Reproduction**, Oxford, v.12, p.1673-1681, 1997b.

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

HOSSAIN, A.M.; RIZK, B.; BATIK, S.; HUFF, C.; THORNEYCROFI, I.H. Time course of hypo-osmotic swellings of human spermatozoa: evidence of ordered transition between swelling subtypes. **Human Reproduction**,Oxford, v.13, p.1578-1583, 1998.

ICHIUMURA, S. Differences in the red fluorescence of Acridine Orange bound to single stranded RNA and DNA. **Biopolymers**, New York, v.14, p.1033-1047, 1975.

IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J.P. Evaluation of the Hamilton thorne computer-based automated system for dog semen analysis. **Theriogenology**, New York, v.55, p.733-749, 2001.

JANETT, F.; FUSCHINI, E.; KEO, S.; THUN, R. Comparison of AndroMed® and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of buck semen. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.40, p.356, 2005.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNSSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membranes changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin stru cture, and field fertility. **Theriogenology**, New York, v.55, p.947-961, 2000.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen Swedish AI bulls. **Theriogenology**, New York, v.55, p.947-961, 2001.

JEULIN, C. LEWIN, L.M.; CHEVRIER, C.; SCHOEVAERT-BROSSAULT, D. Changes in flagellar movement of rat spermatozoa in the assessment of human male fertility. **Journal of Andrology,** Lenexa v.35, p.147-161, 1996.

JEYENDRAN, R.S.; GRAHAM, E.F. An evaluation of cryoprotective compounds on bovine spermatozoa. **Cryobiology**, Orlando, v.17, p.458-464, 1980.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN H.H., PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L J. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal** of **Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.70, p.219-228, 1984.

JEYENDRAN, R.S.; HOLMGREN, W.J.; BIELFELD, P.; WENTZ, A.C. Fertilizing capacity of various populations of spermatozoa within an ejaculate. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, New York,v.9, p.32-35, 1992.

JOHNSTON, J. E.; BRANTON, C., HATHOR, F. Semen evaluation techniques and fertility of dairy bulls. **Journal of Animal Science**., Savoy, v.11, n.4, p.740-741, 1952.

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

KHALIFA, T.A.A.; REKKAS, C.A.; LYMBEROPOULOS, A.G.; SIOGA, A.; DIMITRIADIS, I.; PAPANIKOLAOU, Th. Factors affecting chromatin stability of bovine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.104, p.143-163, 2008.

KĄTSKA, L.; RYŃSKA, B. Bull effect on developmental capacity of bovine *in vitro* matured and fertilized oocytes. In: EUROPEAN CONFERENCE ON EMBRYO TECHNOLOGY AND GENETIC ENGINEERING IN CATTLE AND SHEEP BREEDING, 1994, Kraków. **Proceedings**…p.215.

KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriogenology**, New York, v.39, p.1279-1289, 1993.

LASLEY, J. F. The relationship between spermatozoan motility and the percentage of live spermatozoa and fertilizing capacity of bull semen. **Journal of Animal Science,** Savoy**,** v.3, p.433, 1944.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L. Factors determining competence of *in vitro* produced cattle embryos. **Theriogenology**, New York, v.51, p.473-485, 1999.

LONERGAN, P.; HAFNE, A.L.; FARSTAD, W.; ANDRENSEN, O. Effect of semen extender on *in vitro* development of bovine embryos following IVF. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.28, p.174-175, 1993.

LOVE, C.C.; THOMPSON, J.A.; BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.L.; BLANCHARD, T.L.; LOWRY, V.K.; VARNER, D.D. Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques by flow cytometry. **Theriogenology**, New York, v.60, p.1127-1138, 2003.

LUCONI, M.; FORTI, G.; BALDI, E. Pathophysiology of sperm motility. **Frontiers in Bioscience**, v.11, p.1433-1447, May 1, 2006.

MACLEOD, I.C.; . The predictive value of computer-assisted semen analysis in the context of a donor insemination programme, **Human Reproduction,** Oxford**,** v.10, n.3, p.580-586, 1995.

MAIA, M.S **Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos** 60 **do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox – C e Catalase.** 2006. 147f**.** Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2006.

MANDAL, D.K.; NAGPAUL, P.K.; GUPTA, A.K. Motion characteristics of murrah buffalo bull spermatozoa in various seasons and its relationship with functional integrity of the plasmallema . **Theriogenology**, New York, v.60, p.349-358, 2003.

MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low density lipoprotein fraction of hen`s egg yolk. **Biology of Reproduction**, Madison, v.67, p.1250-1258, 2002.

MARCK, S.O.; WOLF, D.P.; TASH, J.S. Quantification of specific parameter of motility in large members of human sperm by digital image processing. **Biology of Reproduction**, Madison, v.38, p.270-281, 1988.

MARCHETTI, C.; JOUY, N.; LEROY-MARTIN, B.; DEFOSSEZ, A.; MARCHETTI, P. Comparison of four fluorochromes for the detection of inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. **Human Reproduction**, Oxford, v.19, p.2267-2276, 2004.

MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLOT, P. Tests de fertilité chez l'animal domestique par fecundation *in vitro*. **Ann. Zootech**., v.41, p.361-370, 1992.

MARIN, S.; CHIANG, K.; BASSILIAN, S.; LEE, W.N.; BOROS, L.G.; FERNANDEZ-NOVELL, J.M.; CENTELLES, J.J.; MEDRANO, A.; RODRIGUEZ-GIL, J.A.; CASCANTE, M. Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.554, p.342-346, 2003.

MARTIN, G.; SABIDO, O.; DURAND, P.; LEVY R. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. **Biology of Reproduction**, Madison, v.71, p.28-37, 2004.

MARTINEZ-PASTOR, F.; JOHANNISSON, A.; GIL, J.; KAABI, M.; ANEL, L.; PAZ, P.; RODRIGUES-MARTINEZ, H. Use of chromatin stability assay, mitochondrial satain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.84, p.121-133, 2004.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, H. Can we increase the estimative value of semen assessment? **Reproduction in Domestic Animals**. v.41, supl.2, p.2-10, 2006.
MATTIOLI, M.; BARBONI, B.; LUCIDI, P.; SEREN, E. Identification of capacitation in boar spermatozoa by chortetracicline staining. **Theriogenology**, New York, v.45, p.373-381, 1996.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better ? **Theriogenology**, New York, v.57, n.1, p.327-344, 2002.

MELLO, M.I.V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo horizonte, v.51, p.77-78, 1999.

MELLO, M.I.V.; HENRY, M; BEKER, A.R.C.L. Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen eqüino resfriado com diferentes diluidores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.57, n.6, p.757-763, 2005.

MEYERS, S. A. Spermatozoal response to osmotic stress. **Animal Reproduction Science**., Amsterdam, v.89, p.57-64, 2005.

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

MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, Oxford, v.3, p.403-439, 1997.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins: extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, New York, v.57, p.1695-1706, 2002.

MUINO, R.; FERNANDEZ, M.; PENA, A.I. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.42, p.305-311, 2007.

MULLER-SCHLOSSER, F.; AIRES, V.; HINSCH, E; HINSCH, K. D. Evaluation of the quality of a new generation of egg yolk-free semen diluters for cryopreservation of bovine semen. **Jahrestaung uber Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung**, v.34, p.54, 2001.

MUKAI, C.; OKUNO, M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 71, p.540-547, 2004.

NABIEV, D.; GILLES, M.; SCHNEIDER, H.; MAHABIR, E.; WIMMERS, K.; PONSUKSILI, S.; SCHELLANDER, H. K. Comparison of Andromed® and Tris-egg yolk extender bovine post-thaw sperm function parameters and *in vitro* fertility. **Theriogenology**, New York, v.1, p.226, 2003.

NAGY, S.; HALLAP, T.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.80, p.225-235, 2004.

NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E. C. C.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P. Avaliação da integridade das membranas plasmáticas, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial em diferentes concentrações e volumes de espermatozóides criopreservados eqüinos. **Acta Science Veterinary Suplement**., v.33, p.298, 2005.

NAVES, C. S.; BELETTI, M.E.; DUARTE, M.B.; VIEIRA, R.C.; DINIZ, E.G.; JACOMINI, J.O. Avaliação da cromatina espermática em eqüinos com azul de toluidina e “acridine orange”. **Bioscience Journal**, v.20, n.3, p.117-124, 2004.

NEILD, D.; CHAVES, G.; FLORES, M.; MORA, N.; BECONI, M.; AGUERO, A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, New York, v.51, p.721–727, 1999.

NIE, G. J. Development of a hypoosmotic swelling (HOS) test for stallion semen.. **Theriogenology**, New York, 1998.

NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, New York, v.35, p.109-124, 1991.

NOTHLING, J.O.; GERBER, D.; COLENBRANDER, B.; DIJKSTRA, M.;BAKKER, T.; DE CRAMER, K. The effect of homologous prostatic fluid on motility and morphology of dog epididymal spermatozoa extended and frozen in Biladyl® with Equex STM® paste or Andromed®. **Theriogenology**, New York,v.67, p.264-275, 2007.

OBERST, E.R.; JOBIM, M.I.M.; MATTOS, R.C.; KROTH, E.; LARA, G. SMIDERIE, W.; BRONZATTO, M. Teste hiposmótico e sua relação com outros métodos para avaliação da integridade da membrana plasmática do carneiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.27, n.3, p.375-376, 2003.

OEHNINGER, S.; DURU, N.K.; SRISOMBUT, C.; MORSHEDI, M. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Shannon, v.169, p.3-10, 2000.

PACE M.M.; GRAHAM E.F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.39, p.1144-1149, 1974.

PAGL, R.; AURICH, J.E.; MULLER-SCHLOSSER, F.; KANKOFER, M.; AURICH, C. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5℃. **Theriogenology**., New York, v.66, p.1115-1122, 2006.

PAPA, F. O.; VIANNA, F. P.; DELL'AQUA Jr. Eficiência dos testes de termo-resistência (lento e rápido) em relação à fertilidade de sêmen congelado na espécie bovina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005. Goiânia. **Anais**...

PAPAIOANNOU, K. Z.; MURPHY, R. P.; MONKS, R. S.; HYNES, N.; RYAN, M. P.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Assessment of viability and mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining and flow cytometry. **Theriogenology**, New York, v.48, p.299-312, 1997.

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

PENA, F.J.; NUNEZ-MARTINEZ, I.; MORAN, J.M. Semen technologies in dog breeding: an update. In: **Reproduction and obstetrics veterinary teaching**. Cáceres: Hospital University of Extremadura, 2006. v.41, p.21-29.

PÉREZ-LLANO, B.; LORENZO, L.; YENES, P.; TREJO, A.; GARCÍA-CASADO, P. A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. **Theriogenology**, New York, v.56, p.387-398, 2001.

PETRUNKRINA, A.M.; WABERSKI, D.; GUUNZEL APEL, A.R.; TÖUPFER-PETERSEN, E. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. **Reproduccion,** Dordrecht, v.134, p.3-17, 2007.

POLGE, C.; SMITH, A.; PARKES, A. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydratation at low temperatures. **Nature**, London, p.164-166, 1949.

REERS, M.; SMITH, T. W.; CHEN, L. B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. **Biochemistry**, Washington, v.30, p.4480-4486, 1991.

REVELL, S.G.; MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.36, p.77-86, 1994.

ROASA, L.M.; CHOI, Y.H.; LOVE,C.C.; ROMO, S.; VARNER, D.D.; HINRICHS, K. Ejaculate and type of freezing extender affect rates of fertilization of horse oocytes *in vitro***. Theriogenology**, New York, v.68, p.560-566, 2007.

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

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON, B.; PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean up. **Reproduction, Fertility and Development.,** Collingwood, v.9, n.3, p.297-308, 2000.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Methods for sperm evaluation and their relationship to fertility. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia. **Anais**...

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Can we increase the estimative value of semen assessment ? **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.41, n.2, p.2–10, 2006.

ROTA, A.; PENZO, N.; VINCENTI, L.; MANTOVANI, R. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing *in vitro* fertility of bovine spermatozoa. **Theriogenology**, New York, v.53, p.1415-20, 2000.

SAACKE R.G.; WHITE J.M. Semen quality tests and their relationship to fertility. In: TECHNICAL CONFERENCE ON ANIMAL REPRODUCTION, 4·· 1972, Local, **Proceedings**…p.22-27.

SAACKE, R.G.; DALTON, J.C.; NADIR, S.; NEBEL, R.L. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.60-61, p.663-670, 2000.

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

SALGUEIRO, C.C. de M.; NUNES, J.F.; MATEOS-REX, E.; CORDEIRO, M.A.; MAGALHÃES, D.M.; CAVALCANTE, J.M.M; PALÁCIO, A.R.S. Avaliação da qualidade do sêmen caprino pós-descongelamento através do teste hiposmótico. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.27, n.3, 2003.

SALLAM, H.N.; EZZELDIN, F.; SALLAM, A.; AGAMEYA, A.F.; FARRAG, A. Sperm velocity and morphology, female characteristics, and the hypo osmotic swelling test as predictors of fertilization potential: experience from the IVF model. **International Journal of Fertility and Women's Medicine**, v.48, p.88-95, 2003.

SCHAFER-SOMI, S.; AURICH, C. Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.102, p. 1-13, 2007.

SCHOBER, D.; AURICH, C.; NOHL, H.; GILLE, L. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. **Theriogenology**, New York,v.68, p.745-754, 2007.

SCHURMANN, A; AXER, H. The glucose transport facilitator GLUT8 is predominantly associated with the acrossomal region of mature spermatozoa. **Cell Tissue Research**, v.307, n.2, p.237-242, 2002.

SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology,** New York, v.55, p.1241-1254, 2001.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; DA SILVA, L.D.M. Congelação de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de tris e água de coco. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.6, nov./dec., 2000.

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, New York, v.65, p.958-978, 2006.

SIQUEIRA, J.B.; GUIMARAES, J.D.; COSTA, E.P.; HENRY, M.; TORRES, C.A.A.; SILVA, M.V.G.B.; SILVEIRA, T.S. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.36, n.2, p.387-395, 2007.

SLOT, V.L.; SUAREZ, J.D.; POS, P.M.; LINDER, R.E.; STRADER, L.F. Optimization of the Hamilton-Thorn Computerized Sperm Motility Analysis System for use with rat spermatozoa in toxicological studies. **Reproductive Toxicology Branch**. Developmental Toxicology Division, 1993.

SMILEY, S.T.; REERS, M.; MOTTOLA-HARTSHORN, C.; LIN, M.; CHEN, A.; SMITH, T.W.; STEELE JR., G.D.; CHEN, L.B. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. **Cell Biology**, v.88, p.3671-3675, 1991.

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

SNOECK, P.P.N.; HENRY, M.; MELO, M.I.V. Efeitos de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós-descongelação de sêmen eqüino. **Arquivo BrAsileiro de Médicina Veterinária**, Belo Horizonte, v.59, n.1, 2007.

SOUSA, D.B.; BICUDO, S.D.; PAPA, F.O. Study of two methods of collect the ram semen (Artificial vagina and eletrojaculation) being used conventional and computadorized analysis (HTMA-IVOS-10). In: WORLD VETERINARY CONGRESS, 26., 1999, Lyon. **Proceedings**...CD-ROM.

SOUSA, D. B. **Viabilidade do sistema Equitainer® na refrigeração do sêmen ovino avaliado pelas análises computadorizada, de microscopia epifluorescente e inseminação artificial.** 2002. 103f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

SOUZA, N. L. **Avaliação de técnicas para determinar a viabilidade e a integridade do acrossomo de espermatozóides criopreservados eqüinos.** 2001. 76f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia ,Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2001.

SWANSON, E. W.; HERMAN, H. A. The correlation between some characteristics of dairy bull semen and conception rate. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.4, n.27, p.397-401, 1944.

TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; STERCKX, V.; MAES, D.; DE KRUIF, A. Assessment of different sperm quality parameters to predict *in vitro* fertility of bulls. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.37, p.127-132, 2002.

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

TEJADA, R.I.; MITCHELL, J.C.; NORMAN, A.;MARIK, J.J.; FRIEDMAN, S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v.42, p.87-91, 1984.

THUN, R.; HURTADO, M.; JANETT, F. Comparison of Biociphos-Plus® and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. **Theriogenology**., New York, v.57, p.1087-1094, 2002.

TÖPFER-PETERSEN, E.; PETROUNKINA, A.M.; EKHLASI HUNDRIESER, M. Oocyte–sperm interactions. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.60-61, p.653-662, 2000.

TROIANO, L.; GRANATA, A. R.; COSSARIZZA, A.; BIANCHI, R.; PINI, G.; TROPEA, F.; CARANI, C.; FRANCESCHINI, C. Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility. **Experimental Cell Research**, Orlando, v.241, p.384-393, 1998.

UNANIAN, M.M. **Integridade da cromatina:** método complementar para avaliação da qualidade do sêmen bovino**.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 21p. (Documentos, 56).

VALE FILHO, V.R. Padrões de sêmen bovino para o Brasil. Análise e sugestões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO, 1989, Belo Horizonte. **Palestras**... Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1989. v.8, p.94-118.

VAN DER VEN, H. H.; JEYENDRAN, R. S.; AL-HASANI, S.; PEREZ-PELAEZ, M.; DIEDRICH, K.; ZANEVELD, L. J. D. Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (hypoosmotic swelling test) and *in vitro* fertilization. **Journal of Andrology**, Lenexa, v.7, p.190-196, 1986.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M.; HARING, R.M.; KAAL-LANSBERGEN, L.M.T.E.; DEN DAAS, J.H.G.; Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. **Theriogenology**, New York, v.54, p.57-67, 2000.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M. Ovum pick up and *in vitro* production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. **Theriogenology**, New York, v.65, p.914-925, 2006.

VARNER, D. D.; VAUGHAN, S. D.; JOHNSON, L. Use of a computerized system for evaluation of equine spermatozoal motility. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.52, p.224-230, 1991.

VERSTEGEN, J.; IGUER OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, New York, v.57, p.149-179, 2002.

VIANA, A.K.S.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A.L.; ALMEIDA, A.K.; PORTELA, A.P.M.; BITTENCORT, R.F.; ALVES, S.G.G.; BITTENCORT, T.C.C.; QUINTELA, A.T. Avaliação in vitro do sêmen caprino resfriado, com ou sem centrifugação do plasma seminal e diluído em leite desnatado-glicose e tris-gema de ovo. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, n.1, v.7, p.67-76, 2006.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.62, n.1-3, p.23-53, 2000.

VULCANO, G. J.; MOSES, D. F.; VALCÁRCEL, A.; LAS HERAS, M. A. A lineal equation for the classification of progressive and hyperactive spermatozoa. **Mathematical Biosciences**, New York, v.149, p.77-93, 1998.

WABERSKI, D.; KALIL, A.Y.Y.; ARDON, F.; MAGNUS, F.; HELMES, D.; WRENZYCKI, A.M.; PETRUNKINA, E.; TOPFER-PETERSEN, E. Sperm-oviduct binding in bull and boar and its relation to chromatin stability, sperm volume regulation and fertility. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTIO, 15., 2004, Porto Seguro. **Anais**…p.470.

WALL, R.J.; FOOTE R.H. Fertility of bull semen frozen and store in clarified egg yolk – Tris-glycerol extender. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.82, p.817-821, 1999.

WALTERS, A. H.; EYESTONE, W. E.; SAACKE, R. G.; PEARSON, R. E.; GWAZDAUSKAS, F. C. Sperm morphology and preparation method affect bovine embryonic development. **Journal of Andrology**, Lenexa, v.25, n.4, 2004.

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

YANAGIMACHI, R.; KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **The physiology of reproduction**: mammalian fertilization. New York: Raven Press, 1994. p.189-317, 1994.

YEUNG, C. H.; SONNENBERG-RIETHMACHER, E.; COOPER, T. G. Infertile spermatozoa of c-ros tyrosine kinase receptor knockout mice show flagellar angulation and maturational defects in cell volume regulatory mechanisms. **Biology of Reproduction**, Madison, v.61, p.1062–1069, 1999.

YEUNG, C.H.; ANAPOLSKI, M.; SETIAWAN, I.; LANG, F.; COOPER, T.G. Effects of putative epididymal osmolytes on sperm volume regulation of fertile and infertile c-ros transgenic mice. **Journal of Andrology**, Lenexa, v.25, p.216–223, 2004.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 4th ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1999. p.663.

ZHANG, B.R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N.; HAARD, M.G.; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H. Prediction of bull fertility by combined *in vitro* assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-program. **International Journal of Andrology**, Oxford, v.22, p.253–60, 1999.

ZÚCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina**. Botucatu. 121f. Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

VII. ANEXOS

7.1. ANEXO I

7.1.1. TRIS – GEMA DE OVO

MEIO 1 (FRAÇÃO SEM GLICEROL)

TRIS	200 mM
Acido Cítrico	65 mM
Frutose	56 mM
Gema de ovo	20%
Antibióticos - Tilosina	11,7 mg/mL
-Gentamicina	100 mg/mL
- Lincoespectina	50-100 mg/mL
pH	6,8

MEIO 2 (FRAÇÃO COM GLICEROL)

TRIS	200 mM
Acido Cítrico	65 mM
Frutose	56 mM
Gema de ovo	20%
Antibióticos - Tilosina	11,7 mg/mL
- Gentamicina	100 mg/mL
- Lincoespectina	50-100 mg/mL
pH	6,8
Glicerol	12%

7.1.2. CASA - Hamilton IVOS 12.3 – *Setup*[1] 12.3

ANALISES SETUP	
Frame Rate	60 Hz
Frame Acquire	30
Minimun Contrast	56
Minimu Cell Size	5
Threshold Straightness	80.0
Medium VAP Cut-Off	80.0
Low VAP Cut-Off	20.0
Low VSL Cut-Off	0.0
Nom-Motile Head Size	2
Nom-Motile Head Intensity	50

MINIMUN		**MAXIMUN**
0.43	Static Size Limits	10.0
0.64	Static Size Limits	1.35
10	Static Elongation Limits	80

CALIBRATION	
Magnification	1.95

VIDEO SOURCE	
Frequency	60 Hz
Field	Dark

ILUMINATION		
Intensity		2400
Photometer:	Low	73
	High	125

Technical Guide, Hamilton Thorne Biosciences, chapter 2: Starting Parameters for Various Species, 2005.

7.1.3. SOLUÇÃO DE FRUTOSE A 100 MOSM/KG, EMPREGADO PARA REALIZAÇÃO DO HIPO

Componente	Quantidade
Frutose	0,9 g
Citrato Trisódico	0,49 g
Água Destilada (q.s.p.)	100 mL

7.1.4. MEIO PARA TRANSPORTE DE OVÁRIOS

Componente	Quantidade
NaCl	0,9 g
H_2O	1000 mL
Solução Antibiótica*	500 µL

***Solução Antibiótica**

Componente	Quantidade
Penicilina	0,003g / 100 mL
Estreptomicina	0,005g / 100 mL
Neomicina	0,01g /100 mL

7.1.5. MEIO DE MANUTENÇÃO DE OÓCITOS

Componente	Estoque	Quantidade
M-199-HEPES (12.340-030, Gibco®)		9 mL
Soro Fetal Bovino		1 mL
Piruvato	0,11 g / 10mL	20 µL
Gentamicina	10mg / mL	50 µL

7.1.6. MEIO DE MATURAÇÃO *IN VITRO* (MEIO MIV)

Componente	Estoque	Quantidade
M-199-Bicarbonato (11150-059, Gibco®)		9 mL
Soro Fetal Bovino		1 mL
Piruvato	0,11g / 10mL	20 µL
Gentamicina	10mg / mL	50 µL
FSH (Foltropin, Vetpharm®)	0,0050g / 10mL	10 µL
LH (Chorulon, Intervet®)	1000 UI / mL	100 µL
Estradiol	0,01g / 10mL	10 µL

7.1.7. MEIO DE FECUNDAÇÃO *IN VITRO* (MEIO FIV)

Componente	Estoque	Quantidade
Meio FIV-TALP*		10 mL
Piruvato	0,11 g / 10 mL	20 µL
Gentamicina	10 mg / mL	50 µL
Albumina Sérica (BSA)		0,06 g
Solução PHE**		440 µL
Heparina (H 8514)	0,01 g / 10mL	110 µL

***Meio FIV-TALP**

Componente	Quantidade / 100mL H_2O
NaCl	0,666 g
KCl	0,024 g
MgCl2.6 H_2O	0,01 g
NaH2PO4	0,0041 g
NaHCO3	0,21 g
CaCl2.2H2O	0,03 g
Ácido Lático (L 4263, Sigma®)	143 µL
Vermelho Fenol (P 3532, Sigma®)	0,001 g

****Solução PHE**

Componente	Estoque
Hipotaurina	0,0011 g / 10 mL
Penicillamina	0,0030 g / 10 mL
Epinefrina	0,00183 g / 40 mL

7.1.8. MEIO TALP-SÊMEN

Componente	Quantidade / 100mL H_2O
NaCl	0.582 g
KCl	0.023 g
MgCl.6H2O	0.008 g
NaH2PO4	0.0035 g
NaHCO3	0.21 g
CaCl2.2H2O	0.03 g
Ácido Lático	310 µL
Vermelho Fenol	0.001 g
Hepes	0.238 g

7.1.9. MEIO DE CULTIVO *IN VITRO* (MEIO CIV)

Componente	Estoque	Quantidade / 10mL H_2O
CR_2 estoque*		8,8 mL
Soro Fetal Bovino (Gibco®)		1,0 mL
Alanina	0,892g / 10mL	100 µL
Glicina	0,75g / 10mL	100 µL

***CR_2 estoque**

Componente	mM	Quantidade
NaCl	108	
KCl	3	
NaHCO3	25	
Hemicalcio Lactato	0.5	
Piruvato	0.4	
BME		2%
MEM		1%
L Glutamina	1	
Penicilina		100 UI / mL
Vermelho Fenol		0,0002 / 100 mL
Estreptomicina		100 µg / 100 mL

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo