



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
MAÍRA CORONA DA SILVA

TEMPO DE EQUILÍBRIO E SUA INFLUÊNCIA NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO EM DILUIDORES
CONTENDO LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE

ILHÉUS-BAHIA

2011

MAÍRA CORONA DA SILVA

TEMPO DE EQUILÍBRIO E SUA INFLUÊNCIA NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO EM DILUIDORES
CONTENDO LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Produção e Reprodução Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução de Pequenos Ruminantes.

Orientador: Prof. Dra. Paola Pereira das Neves Snoeck

ILHÉUS-BAHIA

2011

Ficha catalográfica

Silva, Maíra Corona

Tempo de equilíbrio e sua influência na criopreservação de sêmen ovino em diluidores contendo lipoproteína de baixa densidade – Ilhéus, 2011.

Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC.

Área de concentração: Produção e Reprodução Animal

Orientadora: Snoeck, Paola Pereira das Neves.

1.Diluidor 2.Carneiro 3.Gema de ovo 4.LBD 5.Santa Inês 6.espermatozóide

MAÍRA CORONA DA SILVA

TEMPO DE EQUILÍBRIO E SUA INFLUÊNCIA NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO EM DILUIDORES
CONTENDO LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a Paola Pereira da Neves Snoeck
Universidade Estadual de Santa Cruz-BA
Orientadora

Prof^a. Dr^a Maria Isabel Vaz de Melo
Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

Prof. Dr^a. Sandra Cristina Becker Silva
Universidade Estadual de Santa Cruz-BA

Dedicatória

*Ao Alessandro, meu esposo, meu marido,
meu companheiro, meu amigo, meu tudo...
Nossa família é minha maior conquista!*

*Aos meus pais Maria Augusta Corona (in memoriam)
e Milton Mendes (in memoriam). Exemplos de vida
que me fortalecem e estimulam a buscar os meus objetivos
e nunca desistir.*

*Ao meu filhote Balu, por ter sido o incentivo
na decisão pela Medicina Veterinária e pelas
alegrias que proporciona na minha vida.*

Agradecimentos

A **Deus** pelo auxílio nas minhas escolhas e por me confortar nas horas difíceis.

Ao meu querido e amado esposo, **Alessandro Hoffman**, pelo carinho, incentivo, compreensão e tolerância com que encarou as minhas ausências.

Aos meus irmãos, **Mirela, Rodrigo e Ricardo**, pelas lições de vida e pela convivência feliz que sempre tivemos, mesmo diante de momentos difíceis.

Aos meus sogros, **Darcy José e Maria Tereza**, por todo apoio e carinho.

À **prof.^a Paola Snoeck**, minha orientadora, pela confiança, ensinamentos, paciência, transparência e amizade. Meu eterno agradecimento.

Ao **prof. Caio Álvares** pelos conselhos, amizade e por ceder os animais para realização deste trabalho.

À Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e à **prof.^a Mariana Machado Neves** pela extração e purificação das lipoproteínas de baixa densidade.

Aos meus queridos amigos da UESC, **Camila Lapa, Larissa Cury, Luis Claudio Moura, Nilo Leça, Rafael Nascimento, Sônia Lopo**, pela ajuda, companhia e pelos bons momentos proporcionados.

Ao **prof. Marc Henry**, pelo acolhimento, conselhos, contribuição profissional e pela oportunidade de realizar parte dos experimentos nas dependências do Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia da EV- UFMG.

Às pós-graduandas, **Betina Cruz e Valéria Moustacas**, pela disponibilidade e cooperação durante as análises realizadas no setor de Reprodução Animal da UFMG.

À **prof.^a Maria Isabel Vaz de Melo** pela orientação e execução da análise estatística.

Aos meus queridos amigos da Clínica Veterinária Pet Point, **Dr. Paulo, Dra. Lilian, Dra. Franciele, Dino, Feliciano, Adriana, Marlene, Sr. Antenor e Sra. Inês**, pelos ensinamentos e por tornarem minha vida mais feliz.

Aos meus amigos de ontem (anônimos), que contribuíram um pouco mais para formação do meu caráter e aos amigos de hoje (registrados em meu coração), pelos momentos que superamos juntos, pelas alegrias, pelos exemplos de superação e pelas vitórias que alcançamos juntos por acreditarmos que unidos somos mais fortes.

Obrigada!

Sumário

| | |
|---|----|
| Ficha catalográfica | 3 |
| Dedicatória..... | 5 |
| Agradecimentos..... | 6 |
| Lista de tabelas | 8 |
| Lista de figuras | 9 |
| Lista de abreviaturas e siglas | 10 |
| Introdução | 11 |
| Hipóteses..... | 12 |
| Objetivos..... | 12 |
| Capítulo 1 - Revisão de literatura..... | 13 |
| 1.1. O espermatozóide..... | 13 |
| 1.1.1. Estrutura | 13 |
| 1.1.2. Organização das membranas espermáticas..... | 14 |
| 1.2. Criopreservação espermática..... | 16 |
| 1.2.1. Meios diluidores e crioprotetores | 17 |
| 1.2.1.1. <i>Glicerol</i> | 17 |
| 1.2.1.2. <i>Gema de ovo e lipoproteínas de baixa densidade</i> | 18 |
| 1.2.1.3. <i>Extração da lipoproteína de baixa densidade</i> | 21 |
| 1.2.2. Congelação, resfriamento e descongelação | 22 |
| 1.4. Métodos de avaliação espermática..... | 24 |
| 1.4.1. Teste hiposmótico..... | 24 |
| 1.4.2. Sondas fluorescentes | 25 |
| 1.4.3. Análise computadorizada | 26 |
| 1.5. Métodos de inseminação artificial dos ovinos | 27 |
| Referências | 28 |
| Capítulo 2 – Experimentos I, II e III | 37 |
| Efeito do tempo de equilíbrio sobre a viabilidade de espermatozóides ovinos criopreservados em meio contendo lipoproteína de baixa densidade | 37 |
| Resumo | 37 |
| 1. Introdução | 38 |
| 2. Material e métodos..... | 40 |
| 2.1. <i>Extração da lipoproteína de baixa densidade (LBD)</i> | 40 |
| 2.2. <i>Diluidores</i> | 41 |
| 2.3 <i>Coleta e avaliação do sêmen fresco</i> | 41 |
| 2.4. <i>Processamento do sêmen e avaliações pós-resfriamento e congelação</i> | 42 |
| 2.4.1 <i>Experimento I</i> | 42 |
| 2.4.2 <i>Experimento II</i> | 43 |
| 2.4.3 <i>Experimento III</i> | 45 |
| 4. Discussão | 54 |
| Agradecimento | 59 |
| Referências | 60 |
| Anexos | 66 |

Lista de tabelas

Capítulo 2: Experimentos I, II e III

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Valores médios de motilidade espermática progressiva do sêmen ovino por diluidor independente do tempo de equilíbrio, submetido a três horas de teste de termo-resistência a 38°C. | 36 |
| Tabela 2. Percentual de espermatozóides ovinos reativos ao teste hiposmótico pós-resfriamento. | 36 |
| Tabela 3. Motilidade progressiva dos espermatozóides ovinos congelados e descongelados em diferentes diluidores e submetidos a três horas de teste de termorresistência a 38°C. | 37 |
| Tabela 4. Médias e desvios-padrão do percentual de espermatozóides ovinos reativos ao teste hiposmótico (HO) e classificação dos espermatozóides por categoria de fluorescência emitida, pela associação das sondas iodeto de propídio (IP) e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA). | 37 |
| Tabela 5. Médias e desvios-padrão para motilidade e parâmetros cinéticos, estimados pelo sistema análise computadorizada, de espermatozóides ovinos congelados e descongelados em meios com diferentes concentrações de lipoproteína de baixa densidade. | 38 |
| Tabela 6. Médias e desvios-padrão para motilidade progressiva do sêmen ovino criopreservado utilizando dois tempos de equilíbrio pós-resfriamento a 5°C e três meios diluidores, durante o teste de termorresistência a 38°C..... | 39 |
| Tabela 7. Médias e desvios-padrão do percentual de espermatozóides ovinos reativos ao teste hiposmótico (HO) e classificação dos espermatozóides por categoria de fluorescência emitida, pela associação das sondas IP e CFDA..... | 40 |
| Tabela 8. Médias e desvios-padrão do percentual de espermatozóides ovinos reativos ao teste hiposmótico (HO) e classificação dos espermatozóides por categoria de fluorescência emitida, utilizando dois tempos de equilíbrio pós- resfriamento a 5°C e três meios diluidores..... | 40 |
| Tabela 9. Médias e desvios-padrão para motilidade e parâmetros cinéticos de espermatozóides ovinos congelados/descongelados em meios com diferentes concentrações de LBD, estimados pelo sistema análise computadorizada..... | 41 |
| Tabela 10. Médias e desvios-padrão para motilidade e parâmetros cinéticos de espermatozóides ovinos criopreservados utilizando dois tempos de equilíbrio pós- resfriamento a 5°C e três meios diluidores..... | 41 |
| Tabela 11. Valores médios dos parâmetros cinéticos associados à hiperativação espermática estimados pelo sistema de análise computadorizada (CASA)..... | 42 |

Lista de figuras

Capítulo 1: Revisão de Literatura

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estrutura do espermatozóide (Myles, 1995)..... | 14 |
| Figura 2. Representação da membrana plasmática (Zafian, 1984) | 16 |
| Figura 3. Mecanismo de proteção espermática da gema de ovo e leite (modificado por Manjunath et al., 2002). | 20 |

Capítulo 2: Experimentos I, II e III

| | |
|---|----|
| Figura 1. Valores médios de motilidade espermática progressiva (%) após o resfriamento utilizando diferentes meios diluidores e tempos de equilíbrio pré-resfriamento. | 35 |
| Figura 2. Espermatozóides corados pela associação das sondas fluorescentes iodeto de propídio e diacetato de carboxifluoresceína. | 38 |
| Figura 3. Motilidade progressiva de espermatozóides ovinos congelados/descongelados em diferentes diluidores e submetidos ao teste de termorresistência, estimada pelo sistema de análise computadorizada (A) e subjetivamente (B)..... | 39 |

Lista de abreviaturas e siglas

| | |
|-------|---|
| ALH | Amplitude lateral da cabeça |
| ANOVA | Análise de variância |
| ATP | Adenosinatrifosfato |
| BCF | Frequência de batimentos flagelares |
| BSP | Proteína do plasma seminal bovino |
| CASA | <i>Computer Assisted Semen Analysis</i> |
| CFDA | Diacetato de carboxifluoresceína |
| ConA | <i>Concanavalia ensiformis</i> |
| g | Gramma |
| h | Horas |
| Hz | Hertz |
| IA | Inseminação artificial |
| IP | Iodeto de Propídio |
| LBD | Lipoproteína de baixa densidade |
| LDL | Low Density Lipoprotein |
| LIN | Linearidade |
| mg | Miligrama |
| min | Minuto |
| mL | Mililitro |
| MP | Motilidade progressiva |
| MT | Motilidade total |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| P | Nível de significância |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| PNA | Aglutinina de <i>Arachis hypogea</i> |
| PSA | Aglutinina de <i>Pisum sativum</i> |
| RSP | Proteína do plasma seminal de carneiro |
| s | Segundos |
| SCA | <i>Sperm Class Analyser</i> |
| sptzs | Espermatozóides |
| STR | Retilinearidade |
| Tris | Tris-hidroximetil aminometano |
| TTR | Teste de termorresistência |
| V | Vigor |
| VAP | Velocidade média do trajeto |
| VCL | Velocidade curvilinear |
| VSL | Velocidade linear progressiva |
| Xg | Graus |
| µL | Microlitro |
| µm | Micrômetro |
| ® | Marca registrada |

Introdução

A ovinocultura é uma atividade econômica em desenvolvimento no Brasil. O aumento de 14,2% do rebanho nacional entre os anos de 1998 e 2008 pode ser explicado pela implantação e expansão da produção de ovinos de corte em regiões não tradicionais, com destaque para o Centro-Oeste e Sudeste do País, cujo crescimento registrado neste período foi de 41,1% e 47,8% respectivamente. Apesar desta ascensão, o fornecimento interno ainda não supre a demanda, demonstrando o grande potencial produtivo da atividade no setor agropecuário (IBGE, 2008).

O emprego de biotécnicas de reprodução assistida, como a inseminação artificial (IA), permite a expansão da atividade de maneira competitiva, pois intensifica o uso de machos de elevado valor genético e evita a transmissão de doenças infecto-contagiosas. Além dessas vantagens, a utilização do sêmen criopreservado possibilita a aquisição e o armazenamento de material genético de diferentes regiões do mundo.

Embora a IA ofereça benefícios à produção, ainda existem limitações quanto ao uso do sêmen ovino congelado, devido à sua baixa fertilidade quando comparado ao sêmen fresco (Salamon e Maxwell, 1995; Salamon e Maxwell, 2000; Anel et al., 2006), além da dificuldade de transposição cervical atribuída à complexa e particular anatomia da cérvix nesta espécie (Halbert et al., 1990; Kershaw et al., 2005; Anel et al., 2006).

Na tentativa de melhorar a fertilidade do sêmen ovino criopreservado, taxas de congelamento/descongelamento de sêmen e composição de meios diluidores são focos de diversas pesquisas. No entanto, ainda existem muitas divergências quanto ao melhor protocolo para esta espécie, apesar da gema de ovo e glicerol continuarem indispensáveis para a boa preservação dos espermatozóides de carneiro (Salamon e Maxwell, 1995; Salamon e Maxwell, 2000).

A proteção conferida pela gema de ovo aos espermatozóides no processo de criopreservação é atribuída à fração lipoproteica de baixa densidade (Watson e Martin, 1975). Nos últimos anos, vários estudos têm se dedicado a entender os mecanismos de ação exercidos por essas lipoproteínas (Manjunath et al., 2002; Bergeron et al., 2004; Bergeron e Manjunath, 2006), bem como sua utilização na composição de meios de congelamento de sêmen em substituição a gema de ovo nas mais variadas espécies (Manjunath et al., 2002; Moussa et al., 2002; Amirat et al., 2004; Juliani et al., 2004; Varela Jr, 2009; Neves, 2008; Silva et al., 2008; Moustacas et al., 2011).

A purificação da LBD permite desenvolver meios diluidores padronizados, livres de contaminação e de substâncias presentes no ovo que inibem a respiração celular, reduzindo a motilidade espermática (Pace e Graham, 1974; Watson e Martin, 1975; Bousseau et al., 1998; Amirat et al., 2005). Desta forma, a substituição a gema de ovo integral pelos componentes responsáveis pela crioproteção pode ser muito adequada e vantajosa.

Hipóteses

- O tempo de equilíbrio é importante no processo de criopreservação do sêmen ovino, podendo influenciar no percentual de células móveis e com membranas espermáticas integras;
- As lipoproteínas de baixa densidade podem ser utilizadas na congelação de sêmen ovino, em substituição à gema de ovo de galinha.

Objetivos

- Analisar a influencia do tempo de equilíbrio pré e pós-resfriamento na manutenção da viabilidade dos espermatozóides ovinos criopreservados;
- Avaliar o efeito da substituição da gema de ovo de galinha por diferentes concentrações de lipoproteína de baixa densidade na composição de meios de congelação de sêmen ovino;
- Aumentar a viabilidade dos espermatozóides ovinos pós-descongelação;
- Padronizar curvas de resfriamento e congelação adequadas à criopreservação de sêmen de carneiro diluído em meio formulado com lipoproteínas de baixa densidade.

Capítulo 1 - Revisão de literatura

1.1. O espermatozóide

1.1.1. Estrutura

Os espermatozoides são produzidos nos testículos por um processo chamado espermatogênese. A estrutura do espermatozóide compreende dois segmentos, cabeça e cauda (Figura 1) (Hafez e Hafez, 2004). A cabeça do espermatozóide é formada principalmente pelo núcleo, que contém a cromatina altamente condensada. Na região anterior da cabeça espermática localiza-se o acrossoma, estrutura de dupla camada de membrana que contém várias enzimas hidrolíticas envolvidas no processo de fecundação (Barth e Oko, 1989; Hafez e Hafez, 2004). O segmento equatorial do acrossoma, juntamente com a porção anterior da região pós-acrossomal, funde-se com a membrana do oócito durante o processo de fecundação (Garner e Hafez, 2004).

O colo conecta a cabeça do espermatozóide com a cauda, a qual é subdividida em peça intermediária, principal e terminal (Garner e Hafez, 2004). A cauda espermática é constituída pelo axonema, formado por um par de microtúbulos centrais e nove pares periféricos, circundados pelas fibras densas externas (bainha fibrosa). Na peça intermediária, essas estruturas estão envolvidas pela bainha mitocondrial, cuja função é realizar a fosforilação oxidativa e produzir o ATP como fonte de energia metabólica (Frey e Mannella, 2000) requerida nos processos celulares, principalmente para o início e manutenção da motilidade (Varner et al., 1991).

A bainha fibrosa, além do seu papel de sustentação estrutural, possivelmente desempenha um papel mais direto na regulação da motilidade do flagelo. Diversas enzimas glicolíticas, incluindo hexoquinases, lactato desidrogenase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, foram identificadas na bainha fibrosa da peça principal de um grande número de espermatozoides de mamíferos. Desta forma, é possível que a glicólise na peça principal, e não necessariamente a fosforilação oxidativa na peça intermediária, seja indispensável para a motilidade flagelar normal nos mamíferos (Turner, 2006).

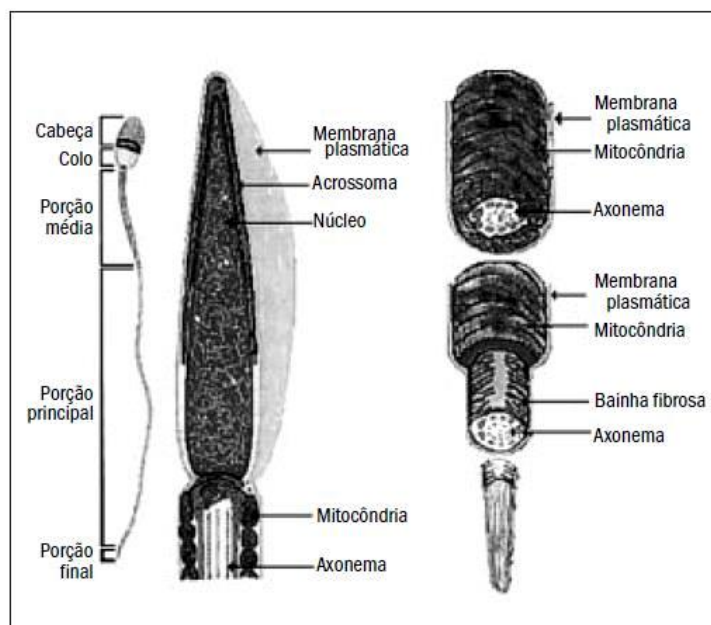


Figura 1 – Estrutura do espermatozóide (Myles, 1995)

1.1.2. Organização das membranas espermáticas

A membrana plasmática envolve todas as estruturas espermáticas. É composta por moléculas lipídicas (glicolipídios, fosfolipídios e colesterol) e protéicas (proteínas intrínsecas e periféricas). Os glico e fosfolipídios são moléculas anfipáticas, ou seja, hidrofóbicas em uma extremidade e hidrofílicas na outra, tendendo a formar uma estrutura lamelar em bicamada (Figura 2) (Singer e Nicolson, 1972).

Os lipídios das membranas formam uma barreira eficiente à passagem de substâncias, estabelecendo os meios intra e extracelulares, enquanto as proteínas integrais e periféricas exercem funções de estrutura celular, estabelecem canais de comunicação entre os meios e atuam como receptores de outras moléculas (Amann e Pickett, 1987).

As moléculas que compõem a membrana plasmática estão em constante movimento. Geralmente todos os componentes estão dispostos aleatoriamente e são livres para movimentarem-se lateralmente. Isso acontece porque a membrana é fluida em temperatura ambiente, denominado estado líquido-cristalino (Parks e Graham, 1992).

A composição lipídica, a natureza dos fosfolipídios e a temperatura definem a fluidez da membrana. Determinadas condições, como o resfriamento, podem

desestabilizar as membranas, uma vez que sua heterogeneidade lipídica faz com que ocorram áreas fluídas e cristalinas ao mesmo tempo, havendo uma tendência para as proteínas se moverem em direção às áreas fluídas, aumentando a permeabilidade naquele local (Parks e Graham, 1992).

O colesterol age como elemento regulador da fluidez das membranas. Ele atua mantendo os fosfolipídios desagrupados, impedindo que ocorra mudança de fase na membrana do estado líquido para o cristalino. Em geral, quanto maior a proporção colesterol:fosfolipídios, mais resistente é a membrana plasmática às variações de temperatura (Amann e Pickett, 1987). Nos espermatozoides ovinos e bovinos essa proporção é de 0,38 e 0,45 respectivamente, valores bastante inferiores aos encontrados em espermatozoides de humanos (0,99) e de coelhos (0,88) que apresentam maior resistência ao choque térmico (Darin-Bennett e White, 1977).

Há uma categoria de fosfolipídios na membrana plasmática que apresentam cadeias de ácidos graxos poliinsaturadas. Estes fosfolipídios são capazes de assumir uma forma cônica, na qual a base é a extremidade hidrofóbica da molécula. Esta disposição possibilita a formação de micela invertida, ou forma hexagonal II, onde as extremidades hidrofóbicas e hidrofílicas são opostas às micelas clássicas (Parks e Graham, 1992).

Normalmente, os fosfolipídios formadores de micelas invertidas localizam-se ao redor das proteínas integrais da membrana, as quais exercem um impedimento físico a essas alterações. No entanto, quando ocorre o resfriamento e a cristalização de determinados segmentos da membrana, as proteínas se movem para regiões fluídas, aglomerando-se nestes locais, permitindo a formação hexagonal II que pode ser transitória ou persistir irreversivelmente (Parks e Graham, 1992).

Estudos realizados com resfriamento de sêmen ovino constataram uma queda na atividade da cálcio-ATPase da membrana plasmática em temperaturas inferiores a 22°C, devido à transição de fase sofrida pelos lipídios situados ao redor dos sítios dessa enzima (Holt e North, 1986). A produção ineficiente de ATP pela célula induz a despolarização da membrana com abertura dos canais de cálcio, promovendo um influxo de cálcio para citoplasma, ativando as fosfolipases citoplasmáticas com conseqüente dano à membrana e aumento da permeabilidade. Desta forma, as células mais resistentes ao resfriamento são aquelas que possuem menor quantidade de lipídios capazes de assumir a forma hexagonal II e aquelas menos dependentes da bomba de sódio/potássio para controle dos canais de cálcio (Amann e Pickett, 1987).

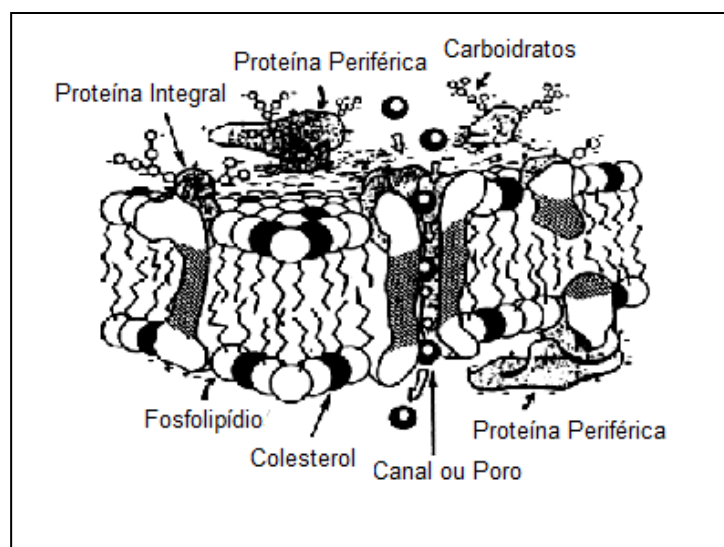


Figura 2 – Representação da membrana plasmática (Zafian, 1984)

1.2. Criopreservação espermática

A criopreservação de sêmen é considerada uma importante ferramenta no melhoramento das espécies domésticas e na preservação de material genético (Watson, 2000), inclusive de animais silvestres ameaçados de extinção. Desde a descoberta do glicerol como agente crioprotetor, o sêmen de uma grande variedade de espécies vem sendo congelado e usado com sucesso em inseminação artificial (Parks e Graham, 1992).

Índices satisfatórios de sobrevivência espermática foram obtidos em diversos protocolos de congelação de sêmen ovino, no entanto, raramente os resultados de fertilidade são semelhantes aos obtidos com sêmen fresco após a inseminação transcervical (Salamon e Maxwell, 2000).

Isso acontece porque o processo de criopreservação promove danos estruturais, bioquímicos e funcionais e, embora uma elevada proporção (40-60%) de espermatozoides ovinos permaneça móvel após a descongelação, apenas 20-30% continuam intactos. Além disso, os espermatozoides que sobreviveram a congelação possuem viabilidade e capacidade de fertilização inferiores ao sêmen fresco (Parks e Graham, 1992; Leibo e Bradley, 1999; Salamon e Maxwell, 2000; Watson, 2000).

A manutenção do potencial fertilizante dos espermatozoides depende, então, da integridade das estruturas espermáticas após a criopreservação, que pode ser obtida pela

interação entre a composição dos meios diluidores e as taxas de resfriamento, congelamento e descongelamento (Amann e Pickett, 1987; Salamon e Maxwell, 2000).

1.2.1. Meios diluidores e crioprotetores

O diluidor mais comumente usado para sêmen ovino é à base de TRIS (Tris - hidroximetil aminometano). Diversas substâncias têm sido adicionadas ao meio base, como: gema de ovo, leite de vaca desnatado, lactose, glicose, rafinose e glicerol. No entanto, as formulações com gema e glicerol em concentrações variadas ainda são as mais utilizadas devido o efeito protetor conferido aos espermatozóides durante a congelamento (Salamon e Maxwell, 2000).

1.2.1.1. Glicerol

O glicerol atua na proteção espermática impedindo a formação de cristais de gelo no meio diluidor, além disso, possui capacidade de penetrar na célula, regulando o balanço osmótico intra e extracelular. As concentrações mais utilizadas de glicerol variam entre 4-8%, a depender da taxa de resfriamento e congelamento utilizadas, composição do meio e formas de adição (Salamon e Maxwell, 2000).

Fiser e Fairfull (1984) analisaram o efeito da variação de glicerol (0-16%) na sobrevivência de espermatozóides ovinos congelados em diferentes curvas de resfriamento (1-100°C/min.) ou por imersão direta das palhetas em nitrogênio líquido e verificaram que os melhores índices de sobrevivência espermática foram obtidos com a utilização de 4-6% de glicerol em curvas de -10 a -100°C/min.

Visser e Salamon (1974) comprovaram que quanto maior a taxa de resfriamento, menor quantidade de glicerol precisa ser adicionada ao meio diluidor e melhores índices de sobrevivência espermática pós-descongelamento são alcançados. A concentração de glicerol também pode ser influenciada pela quantidade de gema de ovo do diluidor. O aumento das concentrações de gema permite a redução da quantidade necessária de glicerol (Watson e Martin, 1974).

O glicerol pode ser adicionado em uma ou duas etapas de diluição do sêmen. A adição do glicerol em uma etapa a 4-5°C tem sido a mais utilizada em trabalhos de criopreservação de sêmen ovino, mas os resultados são semelhantes à adição em 22-32°C (Salamon e Maxwell, 2000). O método mais comumente empregado é a diluição a

30°C em meio formulado com glicerol, seguido de refrigeração a 5°C por um período de 1,5-2 horas (Evans e Maxwell, 1987).

Anel et al. (2003) avaliaram diferentes métodos de adição de glicerol e concluíram que a utilização de 2% a 35°C e 4% a 5°C permitem resultados igualmente satisfatórios.

Independente do procedimento utilizado para adição do glicerol é necessário um período de resfriamento de 1-3 horas, durante o qual ocorre o equilíbrio das concentrações intra e extracelulares dos componentes osmoticamente ativos do diluidor (Salamon e Maxwell, 1995; Salamon e Maxwell, 2000). Este período, definido como tempo de equilíbrio, é determinado pela permanência dos espermatozóides com o glicerol antes da congelação (Salamon e Maxwell, 2000).

Existem muitas divergências com relação ao tempo de equilíbrio ideal para a espécie ovina. Alguns trabalhos indicam que este período depende da diluição e da taxa de resfriamento (Jones, 1965; Jones e Martin, 1965; Salamon, 1968; Patt e Nath, 1969; Salamon e Maxwell, 1995; Salamon e Maxwell, 2000).

Apesar do efeito protetor do glicerol, ele também tem sido relacionado a fenômenos indesejáveis que ocorrem durante o resfriamento, tais como alterações na integridade estrutural e bioquímica dos espermatozóides (Watson e Martin, 1975). Por este motivo, o glicerol deve ser adicionado cerca de 20-30 minutos antes da congelação (Salamon e Maxwell, 2000) a fim de minimizar seus efeitos deletérios.

Vários outros agente foram avaliados quanto ao seu potencial crioprotetor em diluidores de sêmen. Entretanto, nenhum componente demonstrou ser melhor que o glicerol na proteção dos espermatozóides de carneiro (Salamon e Maxwell, 1995).

1.2.1.2. Gema de ovo e lipoproteínas de baixa densidade

A gema de ovo tem sido adicionada aos diluidores para criopreservação de sêmen por proteger os espermatozóides contra o choque térmico. Esta proteção é atribuída à presença de lipoproteínas de baixa densidade (LBDs) (Pace e Graham, 1974; Watson, 1981; Foulkes, 1977), as quais representam 68% dos constituintes da gema de ovo e estão localizadas na fração solúvel denominada plasma (Evans et al., 1968).

Nos últimos anos, têm-se buscado formas de substituir a gema de ovo dos diluidores de sêmen, a fim de produzir meios que não contenham produtos de origem animal para fins comerciais e que sejam química e sanitariamente controlados. Além disso, a purificação da LBD permite eliminar substâncias presentes na gema que inibem

a respiração dos espermatozóides e diminuem a motilidade espermática (Pace e Graham, 1974; Watson e Martin, 1975; Amirat et al., 2005).

Numerosas pesquisas demonstraram o efeito protetor das LBDs na criopreservação de espermatozóides das mais diferentes espécies (Manjunath et al., 2002; Amirat et al., 2004; Juliani et al., 2004; Jiang et al., 2007; Neves, 2008; Varela Jr, 2009; Silva et al., 2008; Hu et al, 2010; Moustacas et al, 2011). No entanto, os mecanismos de proteção exercidos pelas LBDs ainda não foram elucidados.

Foulkes (1977) sugeriu que as lipoproteínas se associam às membranas espermáticas, promovendo a estabilização de seus constituintes durante a criopreservação. Uma segunda hipótese indica que os fosfolipídios presentes nas LBDs formam uma película protetora na superfície dos espermatozóides (Quinn et al. 1980). Além disso, Graham e Foote (1987) propuseram que os fosfolipídios da LBD poderiam substituir alguns fosfolipídios da membrana do espermatozóide perdidos ou danificados durante a criopreservação. Mais recentemente, Manjunath et al. (2002) e Bergeron et al. (2004), sugeriram que as LBDs interagem especificamente com proteínas do plasma seminal bovino (BSPs) por meio de ligações rápidas e estáveis, impedindo que estas proteínas promovam o efluxo de lipídios da membrana, o que desencadearia o processo de capacitação espermática, indesejado durante a criopreservação (Figura 3).

As BSPs são produtos de secreção das vesículas seminais e representam 65% do total de proteínas do plasma seminal bovino (Manjunath e Thérien, 2002). Análogos das BSPs foram isolados do plasma seminal de carneiros (RSPs), e constituem 30% do total de proteínas. Ainda não se sabe a real importância das RSPs no processo de capacitação, mas é provável que as LBD também se associem a essas proteínas (Bergeron et al., 2005).

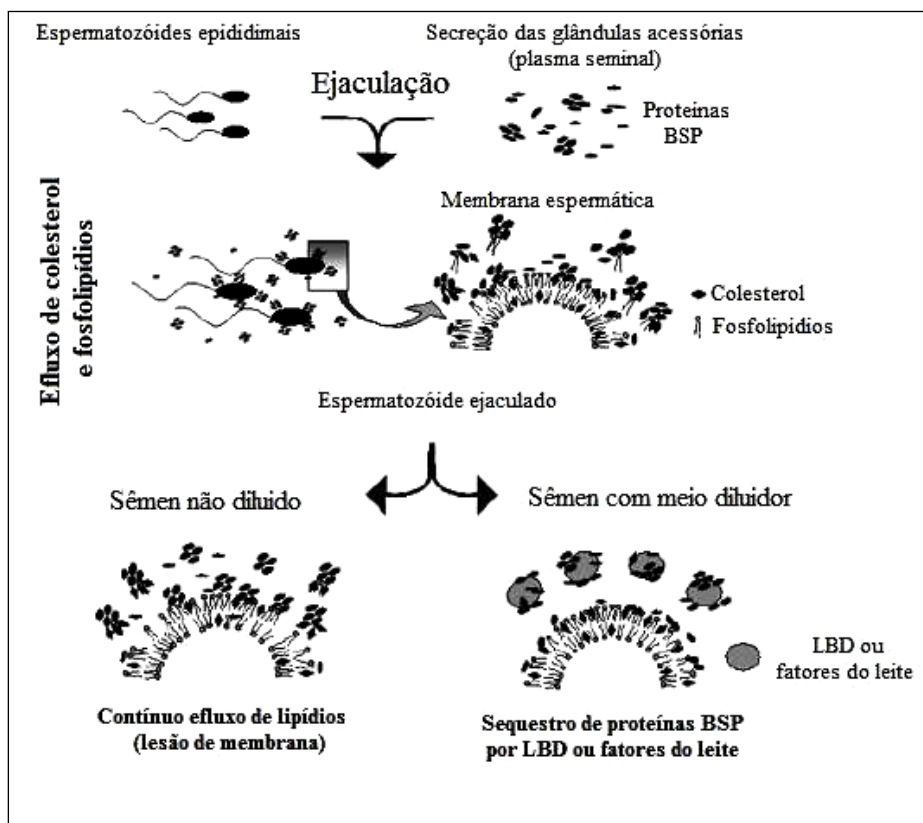


Figura 3 - Mecanismo de proteção espermática da gema de ovo e leite (modificado por Manjunath et al., 2002).

Parks et al. (1981) verificaram a redução das concentrações de colesterol e de fosfolipídios das membranas dos espermatozoides incubados em meio desprovido de gema de ovo. Porém, quando o sêmen foi diluído em meio com gema de ovo, houve adição desses componentes às membranas e redução da associação das BSPs à superfície dos espermatozoides.

Bergeron et al. (2004) demonstraram que uma exposição contínua dos espermatozoides ao plasma seminal provoca a perda gradual do colesterol das membranas espermáticas, tornando-as sensíveis ao processo de criopreservação, uma vez que a resistência das membranas espermáticas ao choque térmico é associada à sua composição bioquímica (Parks e Graham,1992).

A elevada proporção colesterol:fosfolipídios impede a formação de micelas invertidas, uma vez que o colesterol atua regulando a ordem das cadeias lipídicas (Parks e Graham,1992). Evidências indicam que a remoção de colesterol da membrana espermática pelas BSPs é tempo e concentração dependentes e, desta forma, a rápida diluição em meio à base de gema de ovo possibilita a associação dessas proteínas às LBDs, aumentando sua resistência ao frio (Manjunath e Thérien, 2002).

Estudos realizados por Bergeron et al. (2004) revelaram que a proporção de BSPs associadas aos lipídios da membrana espermática é reduzida em aproximadamente 80% após a diluição do sêmen em meio contendo LBD. É possível, então, que este seja o mecanismo responsável pela manutenção da viabilidade espermática após a criopreservação (Bergeron e Manjunath, 2006).

1.2.1.3. Extração da lipoproteína de baixa densidade

A extração das LBDs da gema de ovo realizada por meio de ultracentrifugação por gradientes de concentração não permite o uso do LBD para uso comercial, uma vez que apresenta baixas taxas de recuperação e consome grandes períodos para realização (Pace e Graham, 1974; Bergeron et al, 2004).

Moussa et al. (2002) sugeriram uma técnica rápida e fácil, que permite alcançar 97% de pureza e 67% de rendimento. Para a realização da técnica, utiliza-se ovos frescos de galinhas com dieta padronizada, quebrados manualmente separando-se a gema do albúmen. Cada gema deve ser cuidadosamente rolada em papel filtro para a remoção da chalaça e traços de claras aderidos à membrana vitelina. Esta membrana é então rompida com a ajuda de uma agulha e a gema coletada em um becker resfriado em gelo.

A fração plasmática da gema é separada por adição de solução salina (0,17M NaCl), sendo diluída duas vezes e misturada por 1 hora, segundo técnica descrita por Mcbee e Cotterill (1979). Após homogeneização, a solução deve ser centrifugada por 45 minutos a 10.000Xg, em temperatura de 10°C. O sobrenadante é novamente centrifugado para a completa remoção de grânulos e mantido a 4°C. O plasma é misturado em solução de sulfato de amônio a 40% por 1 hora para precipitação, com pH do plasma fixado a 8.7 e a temperatura controlada a 4°C, em seguida centrifugado a 10.000Xg por 45 minutos, separando o sobrenadante do sedimento.

O sobrenadante passa pelo processo de diálise por 6 horas com água destilada para eliminar o sulfato de amônia. Após a completa eliminação do sulfato de amônia, a solução é novamente centrifugada (10.000Xg por 45 minutos) e coletado o sobrenadante, rico em LBD (Moussa et al., 2002).

Neves (2008) avaliou diferentes concentrações de sulfato de amônio no processo de extração das LBD da gema do ovo, com objetivo de aumentar a eficiência de extração. A gema foi processada segundo Moussa et al. (2002) e o plasma da gema foi obtido após duas centrifugações de 11.000Xg por 45 minutos. Verificou-se nesse estudo

que a adição de 50% de sulfato de amônio foi mais eficaz que as outras concentrações avaliadas, de acordo com perfil eletroforético.

1.2.2. Congelação, resfriamento e descongelação

O resfriamento é uma etapa importante no processo de criopreservação do sêmen de carneiro, assim como a congelação e a descongelação (Salamon e Maxwell, 1995; Salamon e Maxwell, 2000). Os espermatozóides ovinos são vulneráveis ao choque térmico entre 15°C e 5°C, faixa em que um ritmo muito rápido de refrigeração induz danos irreversíveis à motilidade e capacidade fertilizante (Watson, 2000) e entre -10°C e -25°C, quando ocorre a cristalização do gelo (Salamon e Maxwell, 1995). No entanto, os espermatozóides que sobrevivem à congelação não são prejudicados pelo armazenamento em nitrogênio líquido (Salamon e Maxwell, 2000).

Em curvas de resfriamento lentas, a desidratação celular é mais acentuada, reduzindo a formação de gelo intracelular (Watson, 1995). Isto acontece porque a cristalização do meio extracelular promove o aumento na concentração de sais e a saída da água do interior das células, levando o espermatozóide a uma desidratação progressiva (Amann e Pickett, 1987). Desta forma, a curva deve ser lenta para evitar a congelação da água intracelular e rápida o suficiente para evitar o contato da célula desidratada com o meio hiperosmótico (Holt, 2000).

Watson (1995) verificou que o processo de desidratação celular que acompanha a congelação lenta é potencialmente benéfico para a sobrevivência da célula, enquanto taxas de congelação rápidas são responsáveis pela morte celular, já que não há tempo para a passagem da água ao meio extracelular (Mazur, 1980).

Fiser e Fairfull (1986) avaliaram o efeito do resfriamento rápido na sobrevivência dos espermatozóides ovinos e verificaram que no intervalo de 30 a 15°C houve pouca ou nenhuma consequência, enquanto taxas rápidas de resfriamento de 30°C até temperaturas inferiores a 10°C foram relacionadas à redução da motilidade espermática e do número de acrossomas intactos antes da congelação e diminuição no percentual de células móveis após a descongelação.

Kumar et al. (2009) compararam curvas de resfriamento controlada (0,15°C/min de 25°C a 5°C) e não controlada (resfriamento lento até 5°C) e constataram que o protocolo de resfriamento com taxa controlada apresentou melhores resultados para criopreservação de sêmen de carneiro.

Azevedo et al. (2005) confrontaram duas curvas de refrigeração (0,25 e 0,5°C/min até 5°C) e três curvas de congelação (10, 15, 20°C/min até -120°C) e concluíram que é indiferente o uso de qualquer uma das duas curvas de resfriamento para o sêmen ovino. Byrne et al (2000) analisaram a influencia da velocidade da curva de resfriamento (rápido: 5°C/min de +5 a -25°C ou lento: 0,5°C/min de +5 a -25°C), através da zona crítica (-10 a -25°C) sobre a fertilidade *in vitro* e *in vivo* de espermatozóides ovinos e constataram que a curva rápida apresentou resultados superiores de prenhes.

Nos estudos realizados por Kumar et al. (2003) foram comparadas diferentes curvas de congelação para espermatozóides ovino, bovino e suíno. O sêmen resfriado (5°C/min de +5 a -5°C) foi submetido a curvas de congelação de 1, 30 e 50°C/min até atingirem -50°C. Os resultados indicaram que a curva controlada de 30°C/min é melhor que as demais para sêmen de carneiro.

Bag et al. (2002) avaliaram o efeito da temperatura inicial de congelação sobre a integridade acrossomal e sobrevivência de espermatozóides ovino. O sêmen foi resfriado a 5°C em 90min e permaneceu em equilíbrio pós-resfriamento por duas horas. Ao final do equilíbrio, as palhetas foram congeladas (-25°C/min até -25°C, -75°C e -125°C) e então submersas em nitrogênio líquido. Os melhores resultados foram obtidos quando as palhetas foram imersas no líquido de nitrogênio a -125°C.

Os espermatozóides que sobrevivem à congelação são novamente desafiados a atravessarem o intervalo crítico de temperatura (-10°C a -25°C) no processo de descongelação (Salamon e Maxwell, 1995). Quando a congelação é realizada rapidamente há a formação de microcristais intracelulares, não necessariamente deletérios a célula. Porém, a descongelação nesse caso, também deve ser rápida para evitar a formação de cristais maiores potencialmente lesivos. Já os espermatozóides submetidos a curvas de congelação lenta necessitam de descongelação lenta para adequada hidratação celular. Sendo assim, a taxa de descongelação está associada à forma como a congelação foi conduzida (Amann e Pickett, 1987).

O conceito de que uma curva rápida de congelação deve ser seguida de uma curva rápida de descongelação tem sido contestado por Morozov (1959) (citado por Salamon e Maxwell, 1995). Ele sugeriu que isso se aplica apenas para volumes extremamente pequenos, inferiores aos utilizados em palhetas de congelação.

Não há consenso entre os pesquisadores acerca da temperatura ideal de descongelação de sêmen de carneiro, no entanto, a maioria dos trabalhos utiliza

temperaturas entre 38-42°C. Em comparações feitas entre curvas de descongelamento (36-40°C ou 50-70°C) não foram encontradas diferenças sobre a motilidade e integridade acrossomal (Salamon e Maxwell, 1995).

1.4. Métodos de avaliação espermática

O diagnóstico de fertilidade de um reprodutor é tradicionalmente realizado por meio de avaliação descritiva do ejaculado. Motilidade, morfologia e concentração espermática são os parâmetros clássicos mais simples de serem avaliados (Barth e Oko, 1989), porém, evidências indicam que estas análises, isoladamente, são insuficientes para determinar o padrão de fertilidade do sêmen, pois não são capazes de mensurar os complexos eventos físicos e bioquímicos que envolvem o processo de fertilização (Jeyendran et al., 1984).

Além disso, Versteegen et al. (2002) e Celeghini (2005) advertiram que a análise subjetiva do sêmen é imprecisa, mesmo quando executado por investigadores experientes, pois há variação entre as observações devido a natureza subjetiva dos testes, a variabilidade entre técnicos e as diferenças nos padrões para avaliação.

Diante disso, diversas técnicas laboratoriais têm sido desenvolvidas para avaliar os diferentes aspectos da função espermática, objetivando aumentar a precisão dos resultados. Dentre os testes mais utilizados, podemos citar a análise computadorizada dos movimentos espermáticos, a avaliação da integridade funcional da membrana plasmática pelo teste hiposmótico e o uso de sondas fluorescentes para a avaliação das estruturas espermáticas por microscopia de epifluorescência ou sistema de citometria de fluxo (Arruda et al., 2004, citado por Celeghini, 2005). A associação dessas técnicas às avaliações tradicionais permite maior confiabilidade nos resultados, pois possibilita analisar diversos atributos importantes associados com a fertilidade.

1.4.1. Teste hiposmótico

O teste hiposmótico (HO) foi originalmente elaborado para utilização em espermatozoides humanos, com a finalidade de avaliar a integridade funcional da membrana plasmática. Nesta técnica, os espermatozoides são submetidos a um ambiente com osmolaridade inferior à fisiológica, promovendo o transporte de fluidos através das membranas plasmáticas intactas até que o equilíbrio entre os compartimentos seja alcançado. O influxo de água causa alterações que são mais visíveis na região da cauda

dos espermatozoides (cauda dobrada/enrolada) com a utilização de contraste de fase em aumento de 400x (Jeyendran et al., 1984; Moura et al., 2010).

Com base no protocolo proposto por Jeyendran et al. (1984) para o sêmen humano, vários pesquisadores vêm utilizando o teste HO com sêmen de diferentes espécies domésticas, tais como nos bovinos (Correa e Zavos, 1994), suínos (Vazquez et al., 1997), eqüinos (Melo e Henry, 1999), cães (Inamassu et al., 1999) e ovinos (Oberst et al., 2003).

As soluções hiposmóticas são capazes de provocar reação nas células e, ao mesmo tempo, manter a integridade da membrana plasmática. Sacarose, frutose e citrato de sódio são os componentes mais utilizados, sendo que diferentes combinações e concentrações dessas substâncias, causam respostas distintas nas células (Jeyendran et al., 1984).

Moura et al. (2010) utilizaram soluções de sacarose e frutose-citrato de sódio a 100mOsmol/L na avaliação do sêmen ovino resfriado e observaram melhores resultados de reação hiposmótica nas soluções de frutose-citrato de sódio.

Melo e Henry (1999), após observarem que a incubação espermática em soluções isosmóticas não induzia mudanças significativas na morfologia da cauda, concluíram que a própria avaliação do sêmen para a morfologia espermática poderia ser utilizada como grupo controle. Sendo assim, propuseram uma fórmula matemática, na qual a porcentagem de reação hiposmótica é expressa por: $HO (\%) = (\% \text{ de alterações na região da cauda após o HO}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda antes do HO})$. A utilização desta fórmula reduz o erro de leitura e interpretação dos resultados, principalmente em ejaculados com elevada porcentagem de alterações na região da cauda antes do HO.

1.4.2. Sondas fluorescentes

A determinação da integridade estrutural de membranas espermáticas pode ser feita pela associação de corantes fluorescentes (sondas) que possuem diferentes afinidades com as células espermáticas. O diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) é um ester que possui baixo peso molecular, o que possibilita sua passagem através da membrana intacta. Esta substância é hidrolisada por esterases no interior das células, resultando na formação de carboxifluoresceína livre, composto impermeável que emite fluorescência verde nos compartimentos celulares íntegros. O iodeto de propídio (IP) é

um corante que penetra nas células com membrana danificada e se liga aos ácidos nucleicos, produzindo fluorescência vermelha (Harrison e Vickers, 1990).

A associação dessas sondas permite detectar células com membranas espermáticas íntegras e lesadas simultaneamente, possibilitando a classificações em três categorias: 1) Espermatozóides íntegros, emitindo fluorescência verde (CFDA+); 2) Espermatozóides lesados, núcleo emitindo fluorescência vermelha (IP + e CFDA-); 3) Espermatozóides semi-lesados, emitindo fluorescência verde e vermelha, (IP + e CFDA+) (Harrison e Vickers, 1990; Juhász et al., 2000; Silva e Gadella, 2006).

Harrison e Vickers (1990) utilizaram CFDA e IP para avaliar a integridade de membrana em espermatozóides ovinos e suínos. A cada 100 espermatozóides contados, 76,5% foram considerados intactos pela utilização do CFDA isoladamente, 80,3% foram tidos como intactos usando apenas o IP e 78,3% pelo uso dos dois corantes associados, demonstrando a eficiência na utilização dos corantes juntos ou separados.

A integridade acrossomal também pode ser avaliada pela técnica de fluorescência, com a utilização de lecitinas de plantas conjugadas a fluoróforos que se ligam especificamente a cadeias de carboidratos de glicoproteínas presentes no acrossoma. As mais utilizadas são as aglutinina do *Pisum sativum* (PSA), da *Arachis hypogea* (PNA) e da *Concanavalia ensiformis* (ConA). Estas lecitinas não conseguem penetrar e estabelecer ligações com acrossomas intactos, portanto, coram apenas aqueles que possuem membrana acrossomal lesada (Juhász et al., 2000; Silva e Gadella, 2006).

1.4.3. Análise computadorizada

A avaliação da motilidade espermática é uma importante ferramenta na estimativa da viabilidade espermática (Pickett, 1992), no entanto, a imprecisão das avaliações subjetivas pode interferir nos resultados obtidos. Diante disso, diversos sistemas de análise computadorizada do sêmen têm sido desenvolvidos nas últimas décadas com o intuito de minimizar as falhas das análises subjetivas e aprofundar os estudos acerca da cinética espermática (Tardif et al., 1997; Amann e Katz, 2004).

A análise computadorizada de parâmetros espermáticos (CASA) com auxílio do programa *Sperm Class Analyser*® (SCA®) permite avaliar e classificar os espermatozóides individualmente por meio de imagens sucessivas, admitindo ajustes específicos para cada espécie. Os parâmetros avaliados por este sistema são: motilidade total (MT%), motilidade progressiva (MP%), velocidade curvilínea (VCL - $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL - $\mu\text{m/s}$), velocidade média do trajeto (VAP - $\mu\text{m/s}$),

linearidade (LIN - %), retilinearidade (STR - %), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH - μm) e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF - Hz).

Kolibianakis et al. (1992) compararam os valores de concentração e motilidade por sistema computadorizado e análise subjetiva e verificaram alta correlação entre as avaliações. Constataram também que a concentração espermática ótima das amostras para essa avaliação computadorizada é de 50×10^6 espermatozoides/mL. Concluíram que a análise computadorizada, com calibração adequada, pode ser uma alternativa rápida, objetiva e confiável para a avaliação rotineira de amostras de sêmen.

Pouco se sabe sobre a influência dos diferentes parâmetros de motilidade analisados pelo CASA na fertilidade. A velocidade linear progressiva e os padrões de movimentação celular têm sido correlacionados com penetração no muco cervical, penetração em oócitos e fertilização *in vitro* (Januskauskas et al., 1999; Arruda et al., 2007). O aumento na velocidade curvilinear (VCL) é associado à hiperativação, caracterizada como um movimento menos linear, não progressivo e vigoroso dos espermatozoides, relacionado com o processo de capacitação e fertilização (Verstegen et al., 2002). Outros estudos são necessários a fim de investigar a relevância dos parâmetros analisados pelo CASA no potencial de fertilidade da amostra avaliada.

1.5. Métodos de inseminação artificial dos ovinos

Vaginal: é a forma mais simples de inseminação e envolve o depósito do sêmen fresco na porção mais cranial da vagina, sem qualquer tentativa de localizar o colo do útero. As taxas de sucesso são altamente variáveis e este método é inadequado para uso com sêmen congelado (Donovan et al., 2001).

Cervical: é um método barato e relativamente fácil de inseminação. O colo do útero é localizado com auxílio de um espéculo e o sêmen é depositado nos primeiros pulvinos cervicais. Com a utilização do sêmen fresco ou resfriado, o percentual de fertilidade é satisfatório (65 a 75%), mas com sêmen congelado, essa técnica tem apresentado taxas inaceitáveis (10-30%) de prenhez (Donovan et al., 2001).

Intra-uterina (transcervical): este método é de difícil adoção na espécie ovina, devido o pregueamento cervical interno formado por quatro a seis pulvinos desalinhados. É necessário tracionar a cérvix até a abertura vulvar, para permitir a passagem do aplicador pelo lúmen e deposição do sêmen no útero (Evans e Maxwell, 1987). A utilização desta técnica com sêmen fresco ou resfriado, tem apresentado bons resultados. No entanto, com sêmen congelado, as taxas de concepção alcançadas ainda

são insuficientes (Salamon e Maxwell, 1995). A técnica transcervical de IA em ovinos ganhou confiança a partir do desenvolvimento do aplicador expansor transcervical. Essa técnica tem permitido uma melhoria nos resultados de fertilidade com sêmen ovino congelado, com baixo custo e fácil execução, porém deve ser executada em ovelhas que pariram pelo menos uma vez (Siqueira Filho e Alberti, 2011)

Intra-uterina (laparoscopia/laparotomia): esta técnica permite a deposição de sêmen diretamente no corno uterino com auxílio de laparoscópio ou laparotomia. As taxas de concepção com o sêmen congelado estão entre 50-80% (Salamon e Maxwell, 1995), permitindo ampla difusão de genótipos valiosos, já que necessita de uma pequena quantidade de espermatozoides. A inseminação laparoscópica também apresenta desvantagens, como a necessidade de equipamento caro e profissionais altamente treinados, além de ser um método invasivo o que pode tornar-se cada vez menos aceitável visando o bem estar animal.

Referências

AMANN, R.P.; KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology*, v.25, p.317-325, 2004.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science*, v.7, n.3, p.145-174, 1987.

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

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

ANEL, L.; ALVAREZ, M.; MARTINEZPASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ANEL, E.; PAZ, P. Improvement strategies in ovine artificial insemination. *Reproduction in Domestic Animals*, v.41, supl.2, p.30-42, 2006.

ANEL, L.; PAZ, P.; ALVAREZ, M.; CHAMORRO, C.A.; BOIXO, J.C.; MANSO, A.; GONZÁLEZ, M.; KAABI, M.; ANEL, E. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram sêmen. *Theriogenology*, v.60, p.1293-1308, 2003.

ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; PERES, K.R. RAFHAEL, C.F.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E.C.C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen eqüino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, n.1, p.8-16, 2007.

AZEVEDO, H.C.; MAIA, M.S.; BICUDO, S.D.; SOUSA, D.B.; RODELLO, L.; SICHERLE, C.C. Cinética e integridade dos espermatozóides no sêmen ovino submetido a diferentes ritmos de refrigeração e congelação em sistema automatizado. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005. Goiânia – GO. *Anais...* Belo Horizonte - MG: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2005.

BAG, S.; JOSHI, A.; NAQVI, S.M.K.; RAWAT, P.S.; MITTAL, J.P. Effect of freezing temperature, at which straws were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.72, p.175-183, 2002.

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

BERGERON, A.; CRÊTE, M.H.; BRINDLE, Y.; MANJUNATH, P. 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*, v.70, p.708-717, 2004.

BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, v.73, p.1338-1344, 2006.

BERGERON, B.; VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Molecular Reproduction and Development*, v.71, p.461-470, 2005.

BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J.P.; MARQUANT-LE, B.; GUÉRIN, 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*, v.50, p.699-706, 1998.

BRISOLA, L.B.S.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, J.F.C.; MONTAGNER, M.M. Integridade das membranas plasmática, nuclear e mitocondrial de espermatozóides ovinos criopreservados com etileno glicol. *Ciência Rural*, v.29, n.3, p.527-531, 1999.

BYRNE, G.P.; LONERGAN, P.; WADE, M.; DUFFY, P.; DONOVAN, A.; HANRAHAN, J.P.; BOLAND, M.P. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.265–275, 2000.

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 em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA), *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*, p. 31-34, 1998.

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

DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, v.14, p.466-470, 1977.

DAVIS, R.O.; KATZ, D.F. Standardization and Comparability of CASA Instruments. *Journal of Andrology*, v.13, n.1, p.81-86, 1992.

DAVIS, R.O.; KATZ, D.F. Operational standards for CASA instruments. *Journal of Andrology*, v.14, p.385-395, 1993.

DONOVAN, A.; HANRAHAN, J.; LALLY, T.; BOLAND, M.P.; BYRNE, G.P.; DUFFY, P.; LONERGAN, P.; O'NEILL, D.J. AI for sheep using frozen-thawed semen. Teagasc, Irish Agriculture and Food Development Authority. Final report of the project ARMIS 4047, January, 2001. Disponível em: <www.teagasc.ie/research/reports/sheep/4047/eopr-4047.pdf>. Acessado em 16 de março de 2011.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. *Salamon's artificial insemination of sheep and goats*. Sydney: Butterworths, 1987. 194 p.

EVANS, R.J.; BANDEMER, S.L.; DAVIDSON, J.A.; HEINLEIN, K.; VAGHEFI, S.S. Binding of lipid to protein in the low-density lipoprotein from the hen's egg. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.164, p.566-574, 1968.

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

FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W. Effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology*, York, v.23, n 6, p.518-524, 1986.

FOULKES, J.A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.49, p.277-284, 1977.

FREY, T.G.; MANNELLA, C.A. The internal structure of mitochondria. *Trends in Biochemical Science*, v.25, n.7, p.319-324, 2000.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozóide e plasma seminal. In: Hafez, E.S.E. *Reprodução animal*. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004.

GIL, J.; RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M.; LUNDEHEIM, N.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for artificial insemination. *Theriogenology*, v.59, p.1157-1170, 2003.

- GILLAN, L.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. *Reproduction, Fertility and Development*, v.16, p.447-454, 2004.
- GRAHAM, E.F.; SCHMEHL, M.K.L.; DEYO, R.C.M. Cryopreservation and fertility of fish, poultry and mammalian spermatozoa. *In: Proceedings of the 10th NAAB Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction 1984*, Milwaukee, WI. Columbia, MO: National Association of Animal Breeders. p.4-24, 1984.
- GRAHAM, J.K.; FOOTE, R.H. Effect of several lipids fatty acyl chain length and degree of insaturation on the motility of Bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*, v.24, p.42-52, 1987.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. *Reprodução animal*. 7.ed. São Paulo: Manole, 2004. 513p.
- HALBERT, G.W.; DOBSON, H.; WALTON, J.S.; BUCKRELL, B.C. The structure of the cervical canal of the ewe. *Theriogenology*, v.33, p.977-992, 1990.
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.88, p.343-352, 1990.
- HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, v.53, p.47-58, 2000.
- HOLT, W.V.; NORTH, R.D. Thermotropic phase transition in the plasma membrane of ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.78, n.2, p.447-457, 1986.
- HU, J.H.; LI, Q.W.; ZAN, L.S.; JIANG, Z.L.; NA, J.H.; WANG, L.Q.; JIA, Y.H. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing. *Animal Reproduction Science*, v.117, p.11-17, 2010.
- INAMASSU, A.; UECHI, E.; LOPES, M.D. Viabilização do teste hiposmótico em cães e sua relação com outras variáveis espermáticas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.23, n.3, p.302-303, 1999.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) 2008. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/>>. Acesso em 17 dezembro de 2009.
- JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SÖDERQUIST, L.; HRD, M.G.M.; HRD, M.CH.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology*, v.52, n.4, p.641-658, 1999.
- JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J.D. 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*, v.70, p.219-228, 1984.

JIANG, Z.; LI, Q.; LI, W.; HU, J.H.; ZHAO, H.W.; ZHANG, S.S. Effect of low density lipoproteins on DNA integrity of freezing-thawing boar sperm by neutral comet assay. *Animal Reproduction Science*, v.99, p.401-407, 2007.

JONES, R.C. The use of dimethyl sulphoxide, glycerol, and reconstituted skim milk for the preservation of ram spermatozoa II. the influence of diluent composition and processing time during freezing to -79°C with dimethyl sulphoxide or glycerol or both compounds. *Australian Journal of Biological Sciences*, v.18, p.887-900, 1965.

JONES, R.C.; MARTIN, I.C.A. Deep-freezing ram spermatozoa: the effects of milk, yolk-citrate and synthetic diluents containing sugar. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.10, p.413-423, 1965.

JUHÁSZ, J.; NAGY, P.; KULCSÁR, M.; HUSZENICZA, G.Y. Methods for semen and endocrinological evaluation of stallion: a review. *Acta Veterinaria BRNO*, v.69, n.4, p.247-259, 2000.

JULIANI, G.; HENRY, M.; MELO, V.I. Freezing of equine semen in extenders with low density lipoproteins. In: Internacional Congress on Animal Reproduction, 2004, Porto Seguro. *Anais...Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal*, 2004.

KERSHAW, C.M.; KHALID, M.; MCGOWAN, M.R.; INGRAM, K.; LEETHONGDEE, S.; WAX, G.; SCARAMUZZI, R.J. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*, v.64, p.1225-1235, 2005.

KOLIBIANAKIS, E.M.; TARLATZIS, B.C.; BONTIS, J.; PAPADIMAS, J.; SPANOS, E.; MANTALENAKIS, S. Evaluation of Hamilton-thorn automated semen analysis system. *Archives of Andrology*, v.28, p.213-222, 1992.

KUMAR, D.; JOSHI, A.; NAQVI, S.M.K. Effect of post-thaw incubation on semen characteristics of ram spermatozoa cryopreserved under controlled and uncontrolled rate of cooling. *Anima. Reproduction*, v.6, n.4, p.526-534, 2009.

KUMAR, S.; MILLAR, J.D.; WATSON, P.F. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology*, v.46, p. 246-253, 2003.

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

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry*, v.193, p.265-275, 1951.

MAIA, M.S. *Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos ao oxigênio (ROS) no semen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), Trolox-C e catalase*. 2006. 165f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MÉNARD, M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the lowdensity lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biology of Reproduction*, v.67, p.1250-1258, 2002.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology*, v.53, p.109-119, 2002.

MAZUR, P. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. *In: 9TH International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, Madrid, p.99-114, 1980.

McBEE, L.E.; COTTERILL, O.J. Ion exchange chromatography and electrophoresis of egg yolk proteins. *Journal Food Science*, v.44, n.3, p.656-660, 1979.

MELO, M.I.V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.51, p.71-78, 1999.

MORTIMER, S.T.; MAXWELL, W.C. Kinematics definition of ram sperm hyperactivation. *Reproduction Fertility and Development*, v.11, p.25-30, 1999.

MOURA, L.C.O.; SILVA M.C.; SNOECK, P.P.N. Diferentes soluções de teste hiposmótico para sêmen ovino. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.32, n.3, p.146-150, 2010.

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

MOUSTACAS, V.S.; ZAFFALON, F.G.; LAGARES, M.A.; LOAIZA-ECCHEVERRI, A.M.; VARAGO, F.C.; NEVES, M.M.; HENEINE, L.G.; ARRUDA, R.P.; HENRY, M. Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram sêmen. *Theriogenology*, v.75, p.300-307, 2011.

MYLES, D.G. How does the spermatozoon make its way to the egg and how does fertilization take place? *In: Robaire, B.; Pryor, J.L. & Trasler, J.M. (eds.) Handbook of andrology*. São Francisco: American Society of Andrology, 1995.

NEVES, M.M. *Extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de Gallus domesticus e sua aplicação na criopreservação do sêmen canino*. 2008. Tese (Doutorado em Ciência Animal) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

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 da avaliação da integridade da membrana espermática do carneiro. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, n.3, p.375-376, 2003.

O'MEARA, C.M.; HANRAHAN, J.P.; PRATHALINGAM, N.S.; OWEN, J.S.; DONOVAN, A.; FAIR, S.; WARD, F.; WADE, M.; EVANS, A.C.O.; LONERGAN, P. Relationship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams after cervical insemination of ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, v.69, p.513-522, 2008.

- PACE, M.M.; GRAHAM, E.F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *Journal of Animal Science*, v.39, p.1144-1149, 1974.
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K.. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v.38, p.209-222, 1992.
- PARKS, J.E.; MEACHAM, T.N.; SAACKE, R.G. Cholesterol and phospholipids of bovine spermatozoa. I. Selection of a PIPES-Buffered Diluent for Evaluating the effect of egg yolk lipoproteins on sperm cholesterol and phospholipids. *Biology of Reproduction*, v.24, n.2, p.393-398, 1981.
- PATT-JR, J.A.; NATH, J. Effects of diluents, equilibration time, and freezing rates on the storage of ram semen. *Cryobiology*, v.5, p.385-392, 1969.
- PERIS, S.I.; MORRIER, A.; DUFOUR, M.; BAILEY, J. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *Journal of Andrology*, v.25, p.224-233, 2004.
- PICKETT, B.W. Seminal extenders and cooled semen. In: MCKINNON, A.O.; VOSS J.L. *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, p.715-745, 1992.
- PURDY, P.H. The pot-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48 hours at 5 °C prior to cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, v.93, p.114-123, 2006.
- QUINN, P.J.; CHOW, P.Y.; WHITE, I.G. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.60, n.2, p.403-407, 1980.
- SALAMON, S. Deep freezing of ram semen: Recovery of spermatozoa after pelleting and comparison with other methods of freezing. *Australian Journal of Biological Sciences*, v.21, p.351, 1968.
- 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*, v.38, p.1-36, 1995.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.77-111, 2000.
- SILVA, M.C.; SNOECK, P.P.N.; SILVA, S.C.B.; ALVARES, C.T.G.; FUJII, J.B.; NEVES, M.M.; HENRY, M. Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre a viabilidade dos espermatozoides ovinos resfriados. In: 35° Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2008, Gramado. *Anais...* Gramado: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 2008.
- SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, v.65, p.958-978, 2006.
- SINGER, S.J.; NICOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, v.175, p.175-731, 1972.

- SIQUEIRA-FILHO, E.; ALBERTI, K. Manual de inseminação artificial ovinos. Alta/Pfizer, 2011. 26p.
- TARDIF, A.L.; FARREL, P.B.; TROUERN-TREND, V.; FOOTE, R.H. Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. *Journal of Dairy Science*, v.80, p.1606-1612, 1997.
- TURNER, R.M. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction Fertility and Development*, v.18, p.25-38, 2006.
- VARELA-JR, A.S.; CORCINI, C.D.; ULGUIM, R.R.; ALVARENGA, M.V.F.; BIANCHI, I.; CORRÊA, M.N.; LUCIA JR, T.; DESCHAMPS, J.C. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog sêmen. *Animal Reproduction Science*, v.115, p.323-327, 2009.
- VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J; BLANCHARD, T.L.; JOHNSON, L.; PRATT, P.W. Diseases and management of breeding stallions. *American Veterinary Publications*, 1991. 343 p.
- VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; MARTINEZ, P.; GARCIA-ARTIGA, C.; ROCA, J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology*, v.47, p.913-922, 1997.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149-179, 2002.
- VISSER, D.; SALAMON, S. The effect of freezing method on the survival of ram spermatozoa. *South African Journal of Animal Science*, v.4, p.157-163, 1974.
- WATSON, P.F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg yolk lipoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.62, p.483-492, 1981.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assesment of their postthawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, v.7, p.871-891, 1995.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v.60, p.481-492, 2000.
- WATSON, P.F.; MARTIN, I.C.A. Regions of the freezing curve causing changes in structure and viability of ram sperm. *Nature*, v.251, p.315-316, 1974.
- WATSON, P.F.; MARTIN, I.C.A. The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5°C. *Australian Journal of Biological Sciences*, v.28, p.145-152, 1975.
- WINDSOR, D.P. Mitochondrial function and ram sperm fertility. *Reproduction, Fertilty and Development*, v.9, p.279-284, 1997.

ZAFIAN, P. T. *Plasma membrane alterations induced in bovine spermatozoa by cryopreservation*. (M. S. Thesis) Colorado State University. Fort Collins, Colorado, 1984.

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

Capítulo 2 – Experimentos I, II e III

Efeito do tempo de equilíbrio sobre a viabilidade de espermatozóides ovinos criopreservados em meio contendo lipoproteína de baixa densidade

M.C. Silva^a, P.P.N. Snoeck^{a*}, L.C.O. Moura^a, M.I.V. Melo^b, J.V.M Mambri^c,
M.M. Neves^d, M. Henry^e

^a Universidade Estadual de Santa Cruz, 45662-900, Ilhéus, BA, Brasil

^b Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, 32604-115, Betim, MG, Brasil

^c Consultora estatística, Banco de desenvolvimento de Minas Gerais, 31270-410, Belo Horizonte, MG, Brasil

^d Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, MG, Brasil

^e Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil

* Correspondência: Tel.: 55-73- 3680-5406; fax: 55-73- 3680-5112

E-mail: paolasnoeck@uesc.br / paolasnoeck@gmail.com (P.P.N. Snoeck)

Resumo

Objetivou-se avaliar o efeito da lipoproteína de baixa densidade (LBD) em substituição à gema de ovo na composição de diluidores para congelação de sêmen ovino e a influência do equilíbrio pré e pós-resfriamento na manutenção da viabilidade espermática. No experimento I, amostras de sêmen foram diluídas em meios contendo 15% de gema de ovo (D1) ou LBD em proporções variadas (D2-5%, D3-10% e D4-20%). O sêmen diluído foi submetido a diferentes tempos de equilíbrio (0, 30, 60 e 120 min) a temperatura ambiente e resfriado a 5°C/2.5h. Foram realizadas avaliações de motilidade durante o teste de termo-resistência (TTR, 38°/3h) e calculado o percentual de espermatozóides com integridade funcional de membrana plasmática pelo teste hiposmótico (HOST). Não houve interação ($P>0.05$) entre os diluidores e os tempos de equilíbrio pré-resfriamento para as características avaliadas. O D1 foi capaz de preservar a motilidade de forma similar ao D4 ($P>0.05$) e superior aos demais diluidores ($P<0.05$) após o resfriamento. Não houve diferença ($P>0.05$)

nas avaliações de integridade de membrana plasmática. No experimento II, foram utilizadas amostras de sêmen congeladas com os mesmos diluidores do primeiro experimento, sem utilização de tempo de equilíbrio pré-resfriamento. Após a descongelação (38°C/30s), foram avaliadas: longevidade espermática (TTR, 38°C/3h), integridade funcional e estrutural de membranas espermáticas (HOST e sondas fluorescentes) e cinética dos espermatozóides por meio da análise computadorizada (CASA). Os diluidores D3 e D4 apresentaram valores semelhantes ($P>0.05$) ao D1 para os diversos parâmetros avaliados. No experimento III, as amostras diluídas (D1, D3 e D4) foram mantidas em equilíbrio pós-resfriamento (1h e 2h) a 5°C e congeladas posteriormente. Após a descongelação (38°C/30s), os tratamentos foram submetidos aos mesmos testes realizados no experimento II. O equilíbrio de 2h promoveu melhores ($P<0.05$) índices de viabilidade espermática, independente do meio diluidor utilizado. A LBD (10% e 20%) pode substituir a gema de ovo do diluidor estudado, necessitando de 2h de equilíbrio a 5°C antes da congelação.

Palavras-chave: Carneiro, Criopreservação, Gema de ovo, LBD, Santa Inês, Sêmen.

1. Introdução

A criopreservação de sêmen é uma importante ferramenta no melhoramento genético das espécies de interesse pecuário. No entanto, o sêmen ovino criopreservado possui a fertilidade reduzida em comparação ao sêmen fresco. Isso se deve, provavelmente, às alterações de estrutura e função da membrana plasmática que ocorrem durante o processo de resfriamento, congelação e descongelação [1].

Para minimizar os efeitos do processamento do sêmen sobre as membranas espermáticas, a gema de ovo de galinha é frequentemente utilizada na composição de diluidores de congelação de sêmen ovino [2]. Evidências indicam que as lipoproteínas de baixa densidade (LBD) são os componentes da gema de ovo responsáveis pela proteção aos espermatozóides [3], no entanto, os mecanismos de ação das LBDs ainda não foram totalmente esclarecidos.

Folkes [4] sugeriu que a proteção exercida pelas LBDs ocorre por meio da associação dessas moléculas com a membrana celular, garantindo maior estabilização dos seus componentes durante a criopreservação. Outra hipótese é que as LBDs protegem a membrana dos espermatozóides por meio da associação com proteínas do plasma seminal bovino [5], impedindo que estas promovam o efluxo de colesterol da membrana, desencadeando o processo de capacitação [6] indesejado durante a criopreservação. Ainda não se sabe a real importância das proteínas do plasma seminal de carneiro no processo de capacitação, mas é possível que os mecanismos de ação dessas proteínas sejam semelhantes aos encontrados na espécie bovina [7].

Nos últimos anos, têm-se buscado formas de substituir a gema de ovo integral dos diluidores de sêmen pela fração lipoproteica de baixa densidade. Além de permitir a padronização dos meios diluidores e reduzir a possibilidade de transmissão de doenças, vários trabalhos relatam melhora na motilidade, integridade de membranas espermáticas e na habilidade de fertilização após a criopreservação em meios contendo LBDs extraídas da gema de ovo [8-15].

Na literatura não existe concordância em relação ao efeito do tempo de equilíbrio sobre a viabilidade dos espermatozóides ovinos e tampouco sobre a quantidade ideal de LBD a ser adicionada aos meios diluidores para sêmen de carneiro em substituição à gema de ovo. Adicionalmente, quando a composição do

meio diluidor é alterada, é essencial que se avalie o efeito dos novos constituintes sobre algumas etapas do processo de criopreservação, como velocidade da curva de resfriamento e o tempo de equilíbrio, uma vez que estes podem afetar a integridade da membrana e a capacidade fertilizante dos espermatozóides de carneiro [2].

Desta forma, objetivou-se avaliar a capacidade protetora das LBDs, em substituição à gema de ovo integral, sobre a viabilidade de espermatozóides ovinos após resfriamento e congelamento, utilizando diferentes tempos de equilíbrio pré e pós-resfriamento.

2. Material e métodos

2.1. Extração da lipoproteína de baixa densidade (LBD)

A extração da LBD foi realizada segundo o protocolo descrito por Moussa [8], modificado por Neves [11]. Foram utilizados ovos frescos de galinha, separando a gema do albúmen. Para a obtenção do plasma, a gema foi diluída em solução salina (NaCl) 0.17M na proporção 1:2 e homogeneizada por uma hora em agitador magnético, sob refrigeração a 4°C. A solução foi centrifugada a 11.000Xg por 45 min a 4°C. O sobrenadante foi novamente centrifugado seguindo a mesma metodologia para a completa remoção de grânulos. O plasma teve seu pH corrigido (8.7) com hidróxido de sódio (NaOH) 0.1M, sendo então adicionada solução de sulfato de amônio a 50% sob agitação constante a 4°C. A mistura foi mantida em agitação e refrigeração a 4°C por uma 1h, sendo posteriormente centrifugada a 11.000Xg por 45 min. O sobrenadante passou pelo processo de diálise por ≈20h com água bidestilada para eliminar o sulfato de amônio. Após a completa eliminação do sulfato de amônio, a solução foi novamente

centrifugada a 11.000Xg por 45 min e o sobrenadante, rico em LBD foi coletado e utilizado no preparo dos diluidores.

2.2. Diluidores

O diluidor controle utilizado foi o meio básico Tris-cítrico (3.63g Tris, 1.99g ácido cítrico, 0.5g glicose, 100mg estreptomicina, 100.000UI penicilina, 100mL água deionizada, destilada e autoclavada, contendo 15% de gema de ovo e 5% de glicerol). Os meios testados tiveram a gema de ovo total substituída por lipoproteína de baixa densidade, levando-se em consideração a quantidade protéica presente na gema de ovo total e nas lipoproteínas, obtidas pelo método de Lowry [16].

Os 15mL de gema de ovo, utilizados no diluidor controle, apresentaram 385.4mg de proteínas totais. A partir desse valor, calculou-se a quantidade protéica presente em 5%, 10% e 20% desse volume de gema, que deveriam ser adicionados aos demais tratamentos, em substituição à gema de ovo. O valor encontrado para a quantidade de proteínas presentes na LBD foi 8.75mg/mL. Desta forma, para cada tratamento, o volume de LBD adicionado foi de 2.2mL (D2), 4.4mL (D3) e 8.75mL (D4).

2.3 Coleta e avaliação do sêmen fresco

O esgotamento das reservas extragonadais e as coletas de sêmen foram realizados por meio de vagina artificial, com auxílio de fêmea ovina em estro induzido com 1mL de cipionato de estradiol (ECP® im). As amostras foram imediatamente avaliadas quanto à concentração, motilidade, vigor, morfologia e integridade funcional

de membrana plasmática. Os ejaculados com concentração superior a 1.8×10^9 espermatozóides/ejaculado, $\geq 75\%$ de motilidade, ≥ 3.0 de vigor, $\geq 70\%$ de espermatozóides morfológicamente normais foram utilizados nesse estudo.

2.4. Processamento do sêmen e avaliações pós-resfriamento e congelção

2.4.1 Experimento I

Foram utilizados nove carneiros da raça Santa Inês, sendo um ejaculado por animal. Após a avaliação, o sêmen foi dividido em quatro partes iguais e diluído com o meio controle (D1-15% de gema de ovo) e com os meios formulados com LBD (D2-5%, D3-10%, D4-20%), de forma a obter 600×10^6 sptz/mL.

O sêmen foi envasado em palhetas de 0.25mL e submetido a diferentes tempos de equilíbrio pré-resfriamento (0min, 30min, 60min e 120min) sob temperatura ambiente ($\approx 25^\circ\text{C}$). Ao final do equilíbrio, as palhetas foram resfriadas em geladeira ($-0.13^\circ\text{C}/\text{min}$) até alcançarem 5°C em 2.5h.

Após alcançarem 5°C as amostras foram submetidas ao teste de termo-resistência (TTR) lento a 38°C , sendo realizadas avaliações subjetivas de motilidade e vigor a cada hora, por um período de três horas [17], cujos valores apresentados expressam a média da avaliação de três técnicos experientes.

Para análise da integridade funcional de membrana plasmática, utilizou-se o teste hiposmótico (HOST). Alíquotas de $25\mu\text{L}$ de cada tratamento foram diluídas em $200\mu\text{L}$ de solução de frutose-citrato (100 mOsmol/L), incubadas em banho-maria a 38°C por 30 min e fixadas com $300\mu\text{L}$ de formol de salino tamponado [18]. O número

de espermatozoides reativos ao HOST foi calculado descontando-se os percentuais de espermatozoides que possuíam alterações na região da cauda antes do teste [19].

O experimento foi desenvolvido em blocos casualizados, considerando-se o carneiro (nove carneiros e um ejaculado/animal) e testando os meios diluidores em diferentes tempos de equilíbrio pré-resfriamento. As variáveis estudadas não apresentaram distribuição normal e foram analisadas por meio dos testes de Kruskal Wallis e comparadas pelo teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

2.4.2 Experimento II

Seis reprodutores da raça Santa Inês foram usados como doadores de sêmen, sendo utilizados três ejaculados por carneiro. Os ejaculados foram processados de maneira semelhante ao primeiro experimento, diluídos com os mesmos diluidores (D1-15% de gema de ovo, D2-5% de LBD, D3-10% LBD, D4-20% LBD) e congelados sem tempo de equilíbrio pré-resfriamento, utilizando-se equipamento TK4000® a uma taxa de resfriamento de $-0.25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 5°C , seguida da congelação a $-15^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Ao chegarem a -140°C , as palhetas foram transferidas para o nitrogênio líquido (-196°C) e armazenadas.

Após a descongelação (38° por 30s), os tratamentos foram submetidos ao TTR e ao HOST, conforme descrito no Experimento I. Foram também avaliados os parâmetros cinéticos dos espermatozoides por meio da análise computadorizada com auxílio do programa *Sperm Class Analyser*® (v.4, *Microptics S.L*, Barcelona, Espanha) após a diluição da amostra em solução fisiológica para 50×10^6 de spz/mL.

Os padrões utilizados para ajuste do equipamento tiveram como base as recomendações do programa *Sperm Class Analyser*® para análise de sêmen da espécie

ovina: particle area: 9 a 70 μm ; slow VCL: 10 $\mu\text{m/s}$; medium VCL: 45 $\mu\text{m/s}$; rapid VCL: 75 $\mu\text{m/s}$; progressivity: >80% of STR; circular: <50%LIN, conectivity: 12; VAP points: 5; warning to: 3 fields, 500 sperms, 20% concentration; imagens per second: 25.

Em cada amostra foram avaliados no mínimo três campos escolhidos aleatoriamente e os parâmetros medidos foram: motilidade total (MT-%), motilidade progressiva (MP-%), velocidade curvilinear (VCL- $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL- $\mu\text{m/s}$), velocidade média do trajeto (VAP- $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN-%), retilinearidade (STR -%), deslocamento lateral de cabeça (ALH- μm) e frequência de batimento de cauda (BCF-Hz).

A integridade estrutural das membranas espermáticas foi avaliada pelo protocolo proposto por Harrison e Vickers [20], com modificações citadas por Zúccari [21], utilizando os fluorocromos diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e o iodeto de propídio (IP).

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, considerando cada animal como um bloco (seis carneiros e três ejaculados/animal). Os resultados foram submetidos à ANOVA, sendo posteriormente as médias obtidas (motilidade e cinética espermáticas (CASA), integridade estrutural e funcional de membranas espermáticas) comparadas pelo teste de Duncan ao nível de probabilidade de 5%. Utilizou-se os testes de homocedasticidade de Levene e de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. As variáveis que não apresentaram distribuição normal (motilidade e vigor no TTR), mesmo após transformações, foram analisadas por meio do teste de Kruskal Wallis e comparadas pelo teste de Mann-Whitney, com correção de Bonferroni ($p < 0,008$).

2.4.3 Experimento III

Para se avaliar o tempo de equilíbrio pós-resfriamento sobre a viabilidade espermática pós-descongelação, utilizou-se três carneiros Santa Inês como doadores de sêmen, sendo utilizados cinco ejaculados por animal. Após a análise do sêmen fresco, os ejaculados foram fracionados e diluídos nos meios controle (D1-15% de gema de ovo) e formulados com LBD (D3-10 % e D4-20%), de forma a obter 400×10^6 sptz/mL.

O resfriamento a 5°C foi realizado com equipamento TK4000® a uma taxa de $-0.25^{\circ}\text{C}/\text{min}$. As palhetas foram mantidas em equilíbrio a 5°C por 1h e 2h e então congeladas no vapor, a 4cm do nitrogênio líquido, com curva média de $-15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até atingirem -140°C . Ao final da curva de congelação, as palhetas foram transferidas para o nitrogênio líquido (-196°C) e armazenadas em botijão criogênico. As amostras descongeladas (38° por 30s) foram submetidas aos mesmos testes realizados no Experimento II. Para a análise computadorizada, foram previamente diluídas em meio base Tris-cítrico para concentração final de 50×10^6 de sptz/mL.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, considerando cada animal como um bloco (três carneiros e cinco ejaculados/animal), sendo os meios diluidores (D1, D3 e D4) testados em diferentes tempos de equilíbrio pós-resfriamento (1h e 2h). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias (motilidade, VSL e LIN) comparadas pelo teste de Duncan a 5%. As variáveis que não apresentaram distribuição normal (vigor, VCL, VAP, STR, ALH e BCF) foram analisadas por meio do teste de Kruskal Wallis e comparadas pelo teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni.

Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética da Universidade Estadual de Santa Cruz (processo n° 010/07).

3. Resultados

3.1 Experimento I

A motilidade espermática progressiva (MP) imediatamente após o resfriamento foi inferior ($P < 0.05$) ao sêmen fresco e diluído, independente do meio e tempo de equilíbrio utilizados. Após o resfriamento, os espermatozóides diluídos no meio controle apresentaram melhores ($P < 0.05$) índices de MP que aqueles diluídos em meios contendo 5 e 10% de LBD e foram semelhante ($P > 0.05$) as amostras diluídas em meio com 20% de LBD. Não foram observadas diferenças ($P > 0.05$) entre os diluidores com LBD em todos os tempos de equilíbrio testados. O tempo de equilíbrio pré-resfriamento não interferiu ($P > 0.05$) nos resultados de motilidade espermática pós-resfriamento (Figura 1).

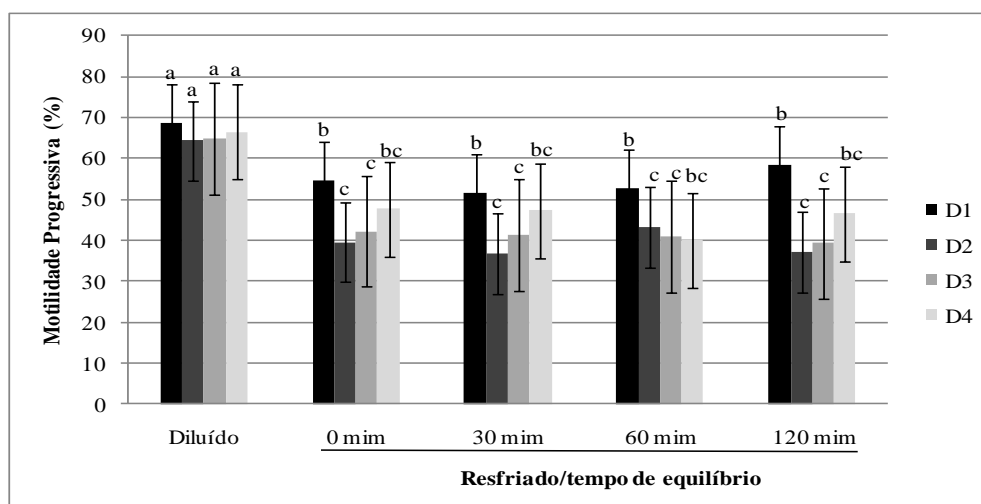


Figura 1. Motilidade progressiva de espermatozóides ovino diluídos em diferentes meios e resfriados com diversos tempos de equilíbrio pré-resfriamento.

D1: gema total; D2: 5% LBD; D3: 10% LBD; D4: 20% LBD.
Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0.05$).

As médias de MP dos espermatozoides resfriados e posteriormente submetidos ao TTR a 38°C estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Motilidade progressiva de espermatozoides ovino resfriados em meio contendo gema total ou diferentes concentrações de LBD, submetidos a três horas de teste de termo-resistência a 38°C (média da combinação dos 4 tempos de equilíbrio pré-resfriamento).

| Tratamento / tempo | Motilidade Progressiva (%) | | | |
|--------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | 0h | 1 h | 2 h | 3h |
| D1 gema total | 54.3±15.3 ^A | 53.1±14.4 ^A | 48.8±15.7 ^A | 44.8±17.7 ^A |
| D2 5% LBD | 39.2±15.1 ^{aB} | 31.7±15.0 ^{aB} | 29.1±14.5 ^{bB} | 29.3±12.8 ^{bB} |
| D310% LBD | 40.9±16.4 ^{aB} | 34.6±14.0 ^{aB} | 32.6±14.0 ^{aB} | 30.6±15.3 ^{bB} |
| D4 20 % LBD | 45.3±17.4 ^{aA} | 38.9±15.7 ^{aB} | 35.3±18.5 ^{aB} | 32.2±16.8 ^{bB} |

a,b: Letras diferentes na mesma linha indicam valores diferentes (P<0.05)

A,B: Letras diferentes na mesma coluna indicam valores diferentes (P<0.05).

O diluidor controle foi semelhante (P>0.05) a LBD a 20% no início do TTR (tempo zero) e superior (P<0.05) aos demais tratamentos em todos os tempos analisados. O diluidor formulado com gema de ovo de galinha integral também foi o único que preservou a motilidade durante as três horas de TTR, não sendo observada queda significativa (P>0.05) ao longo do teste. Não foi observada diferença (P>0.05) no percentual de células reativas ao teste hiposmótico entre os meios diluidores e tempos de equilíbrio testados (Tabela 2). Já o percentual de células espermáticas recém coletadas e reativas ao teste hiposmótico (72.2%±17.7) foi superior (P<0.05) a todos os tratamentos pós-resfriamento.

Tabela 2. Percentual de espermatozoides ovino reativos ao teste hiposmótico (HOST) após o resfriamento a 5 °C, preservados em meio contendo gema total ou diferentes concentrações de LBD e submetidos a diferentes tempos de equilíbrio a 25°C pré-resfriamento.

| Diluidor | Tempo de equilíbrio pré-resfriamento | | | |
|---------------|--------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| | 0 min | 30 min | 60 min | 120 min |
| D1 gema total | 57.2±18.1 | 59.3±25.3 | 66.3±17.8 | 57.8±21.7 |
| D2 5% LBD | 51.6±25.0 | 45.4±21.2 | 62.4±19.8 | 55.4±19.9 |
| D310% LBD | 58.4±19.7 | 51.7±19.8 | 63.4±20.9 | 57.7±23.3 |
| D4 20 % LBD | 62.3±18.6 | 52.0±17.8 | 56.6±21.3 | 52.6±20.4 |

Não houve diferença entre os tratamentos (P>0.05).

3.2 Experimento II

No experimento II, a média de motilidade espermática progressiva para o sêmen fresco foi de 79.2% ± 5.5, superior (P<0.05) a todos os tratamentos pós-descongelção. Os diluidores formulados com LBD apresentaram resultados semelhantes entre si nas avaliações de MP pós-descongelção (P>0.05), exceto o meio contendo 5% de LBD que foi inferior após a segunda hora de TTR. A MP dos espermatozóides diluídos no meio controle foi superior a dos espermatozóides diluídos no meio contendo 5% LBD em todas as análises e àqueles diluídos em 10% LBD no TTR, após duas e três horas de incubação no banho-maria. Para cada diluidor, a motilidade espermática pós-descongelção manteve-se constante nos diferentes tempos de avaliação (P>0.05) ao longo do teste (Tabela 3).

Tabela 3. Motilidade progressiva de espermatozóides ovino congelados/descongelados em meio contendo gema total ou diferentes concentrações de LBD e submetidos ao teste de termo-resistência a 38°C.

| Tratamentos/tem | Motilidade progressiva (%) | | | |
|-----------------|----------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | 0h | 1h | 2h | 3h |
| D1 gema total | 28.3±12.2 ^a | 29.7±13.6 ^a | 28.0±10.5 ^a | 27.0±11.1 ^a |
| D2 5% LBD | 19.9±8.7 ^b | 17.2±8.9 ^b | 14.0±9.2 ^c | 11.9±8.7 ^c |
| D3 10% LBD | 21.7±9.9 ^{ab} | 21.3±8.6 ^{ab} | 17.5±8.4 ^{bc} | 16.2±8.6 ^{bc} |
| D4 20 % LBD | 25.5±8.9 ^{ab} | 24.3±8.2 ^{ab} | 23.2±9.8 ^{ab} | 21.0±9.9 ^{ab} |

Letras diferentes na mesma coluna indicam valores diferentes (P<0.05).

A integridade funcional e estrutural de membranas espermáticas foi avaliada pelo teste hiposmótico e pela associação dos fluorocromos, iodeto de propídio (IP) e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), respectivamente. O meio formulado com 5% LBD foi inferior (P<0.05) aos demais diluidores nas avaliações de integridade funcional e estrutural das membranas espermáticas após a descongelção. Além disso, também apresentou maior (P<0.05) percentual de células com membranas espermáticas lesadas sendo semelhante apenas ao diluidor com 10% LBD. Não houve diferença (P>0.05) na categoria de espermatozóides semi-lesados entre os tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4. Percentual de espermatozoides ovino reativos ao teste hiposmótico (HOST) e integridade de membranas de espermatozoides congelados/descongelados em meio contendo gema total ou diferentes concentrações de LBD.

| Diluidores | Categorias (%) | | | |
|---------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|--------------|
| | HOST | Íntegros | Lesados | Semi-lesados |
| D1 gema total | 28.4 ± 2.5 ^{ac} | 27.5±14.7 ^a | 65.6±12.7 ^a | 6.8±4.5 |
| D2 5%LBD | 28.4 ± 2.5 ^{ac} | 12.8±9.4 ^b | 80.8±10.9 ^{bc} | 6.4±3.7 |
| D3 10%LBD | 28.7±3.0 ^a | 21.2±10.5 ^a | 73.2±10.1 ^{ac} | 5.6±3.2 |
| D4 20%LBD | 27.1±2.6 ^c | 24.1±12.7 ^a | 71.7±13.5 ^a | 4.2±2.2 |

Íntegros: membranas plasmática e acrossomal íntegras; Lesados: membranas plasmática e acrossomal lesadas; Semi-lesados: membranas plasmática lesada e acrossomal íntegra (fluorocromos iodeto de propídio e diacetato de carboxifluoresceína).

Letras diferentes na mesma coluna indicam valores diferentes (P<0.05).

Na Tabela 5 estão apresentados os dados de motilidade e cinética de espermatozoides avaliados por sistema computadorizado imediatamente após a descongelação.

Tabela 5. Motilidade e parâmetros cinéticos de espermatozoides ovino congelados/descongelados em meios com gema total ou diferentes concentrações de LBD, estimados pelo sistema análise computadorizada.

| Parâmetros | Diluidores | | | |
|------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | D1 - gema total | D2 - 5%LBD | D3 - 10%LBD | D4 - 20%LBD |
| MT (%) | 23.4 ± 16.6 ^a | 7.8 ± 7.8 ^b | 6.0 ± 3.5 ^b | 11.4 ± 7.3 ^c |
| MP (%) | 18.9 ± 15.8 ^a | 4.5 ± 4.7 ^b | 4.1 ± 2.7 ^b | 8.4 ± 6.5 ^c |
| VAP (µm/s) | 79.0 ± 24.3 ^a | 60.7 ± 19.5 ^b | 61.1 ± 20.8 ^b | 70.4 ± 20.5 ^{ab} |
| VSL (µm/s) | 66.5 ± 25.4 ^a | 48.2 ± 19.7 ^b | 48.3 ± 22.2 ^b | 58.7 ± 21.6 ^{ab} |
| VCL (µm/s) | 98.6 ± 17.8 | 86.8 ± 17.2 | 90.0 ± 19.6 | 94.7 ± 19.9 |
| ALH (m/s) | 2.5 ± 0.9 | 2.7 ± 0.9 | 2.7 ± 0.7 | 2.8 ± 0.9 |
| BCF(Hz) | 8.1 ± 1.9 | 8.3 ± 1.7 | 8.2 ± 1.2 | 8.2 ± 1.6 |
| LIN (%) | 65.5 ± 14.7 ^a | 54.0 ± 15.4 ^b | 52.5 ± 16.0 ^b | 61.5 ± 16.5 ^{ab} |
| STR (%) | 82.5 ± 9.0 | 77.3 ± 8.8 | 76.9 ± 10.3 | 81.6 ± 9.3 |

MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; VAP: velocidade média do trajeto; VSL: velocidade linear progressiva; VCL: velocidade curvilínea; ALH: amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF: frequência de batimento de cauda; LIN: linearidade; STR: índice retilíneo do movimento espermático.

Letras diferentes na mesma linha indicam valores diferentes (P<0.05).

O diluidor controle apresentou valores significativamente maiores (P<0.05) para velocidade média do trajeto (VAP), velocidade linear progressiva (VSL) e linearidade (LIN) que os tratamentos com 5% e 10% de LBD e foi semelhante (P>0.05) ao diluidor com 20% de LBD. Os demais parâmetros cinéticos não diferiram entre os tratamentos. Nas avaliações de motilidade pela análise computadorizada, o diluidor controle apresentou resultados superiores (P<0.05) aos demais.

3.3 Experimento III

No experimento III as médias de motilidade espermática pós-descongelamento mantiveram-se estáveis durante todo período de avaliação a 38° C (Figura 2). No entanto, em comparações feitas entre tempos de equilíbrio, independente do diluidor utilizado, o protocolo de resfriamento com 2h de equilíbrio a 5°C prévio a congelamento apresentou médias significativamente maiores (Tabela 6).

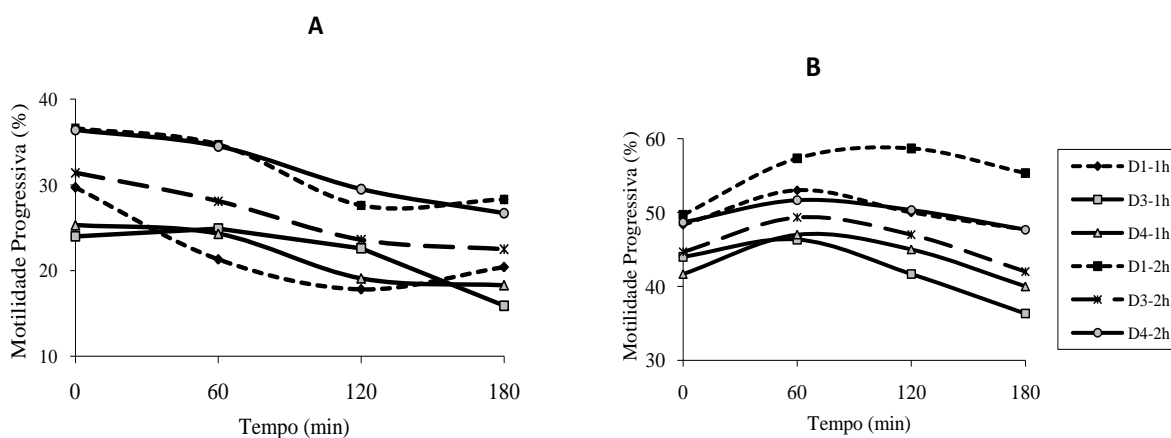


Figura 2. Motilidade progressiva de espermatozoides ovino descongelados submetidos a 1 ou 2 horas de equilíbrio a 5°C antes do congelamento, diluídos em meio contendo gema total ou diferentes concentrações de LBD e submetidos ao teste de termo-resistência. ma de Análise computadorizada (A) e subjetiva (B) da motilidade.

D1: gema de ovo; D3: 10% LBD; D4: 20% LBD.

1h, 2h: tempo de equilíbrio a 5°C.

Não houve diferença entre os tratamentos ($P>0.05$).

Tabela 6. Motilidade progressiva de espermatozoides ovino descongelados submetidos a 1 ou 2 horas de equilíbrio a 5°C antes do congelamento, diluídos em meio contendo gema total ou diferentes concentrações de LBD e submetidos ao teste de termo-resistência a 38°C

| Parâmetros | Motilidade progressiva (%) | | | |
|-------------------|----------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | 0h | 1h | 2h | 3h |
| Equilíbrio | | | | |
| 1h | 26.3±11.0 ^a | 23.5±14.6 ^a | 19.8±15.8 ^a | 18.2±14.0 ^a |
| 2h | 34.9±15.9 ^b | 32.6±18.0 ^b | 27.0±15.5 ^b | 25.9±13.2 ^b |
| Diluidor | | | | |
| D1 gema total | 33.2±13.7 | 28.0±15.6 | 22.7±13.3 | 24.3±13.3 |
| D3 10%LBD | 27.6±14.6 | 26.4±18.0 | 23.1±18.3 | 19.1±13.3 |
| D4 20%LBD | 30.9±14.4 | 29.4±17.5 | 24.3±15.3 | 22.5±15.4 |

1h, 2h: tempo de equilíbrio a 5°C.

Letras diferentes para cada parâmetro na mesma coluna indicam valores diferentes (P<0.05).

O percentual de células reativas ao teste hiposmótico foi de $78.7 \pm 6.3\%$ para o sêmen fresco. Após a criopreservação, houve uma redução média de 26.6% deste percentual, não sendo observada diferença significativa (P>0.05) entre os tratamentos. A integridade estrutural das membranas espermáticas, avaliada pelas sondas fluorescentes, foi preservada de forma semelhante pelos diluidores testados (P>0.05) (Tabela 7).

Tabela 7. Percentual de espermatozoides ovino reativos ao teste hiposmótico (HOST) e integridade de membranas de espermatozoides descongelados submetidos a 1 ou 2 horas de equilíbrio a 5°C antes do congelamento, em meio contendo gema total ou diferentes concentrações de LBD.

| Parâmetros | Categorias (%) | | | |
|----------------------|----------------|-----------|-----------|--------------|
| | HOST | Íntegros | Lesados | Semi-lesados |
| Equilíbrio 1h | | | | |
| D1 gema total | 54.4±7.8 | 25.7±15.6 | 48.4±16.1 | 25.8±19.6 |
| D3 10%LBD | 49.1±11.2 | 23.7±9.4 | 67.6±11.9 | 8.7±6.4 |
| D4 20%LBD | 48.7±11.3 | 26.5±14.3 | 59.6±16.8 | 14.0±9.5 |
| Equilíbrio 2h | | | | |
| D1 gema total | 58.4±10.1 | 25.7±12.2 | 49.6±16.3 | 24.7±12.2 |
| D3 10%LBD | 49.7±11.5 | 25.7±9.2 | 57.0±15.6 | 17.4±9.0 |
| D4 20%LBD | 52.3±9.8 | 21.0±10.1 | 59.2±17.3 | 19.9±10.1 |

1h, 2h: tempo de equilíbrio a 5°C.

Íntegros: membranas plasmática e acrossomal íntegras; Lesados: membranas plasmática e acrossomal lesadas; Semi-lesados: membranas plasmática lesada e acrossomal íntegra. (fluorocromos iodeto de propídio e diacetato de carboxifluoresceína). Não houve diferença entre os tratamentos (P>0.05).

A integridade funcional de membrana plasmática foi influenciada pelo diluidor, mas não pelo tempo de equilíbrio, sendo que os espermatozoides criopreservados em meio formulado com gema de ovo integral apresentaram maior percentual de células reativas ao HOST. Após a descongelação, o tempo de equilíbrio e os meios diluidores

não interferiram no percentual de células estruturalmente íntegras avaliadas pelas sondas fluorescentes (Tabela 8).

Tabela 8. Percentual de espermatozoides ovino reativos ao teste hiposmótico (HOST) e classificação por categoria de fluorescência emitida, pela associação das sondas iodeto de propídio (IP) e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA).

| Parâmetros | Categorias (%) | | | |
|-------------------|------------------------|-----------|------------------------|------------------------|
| | HOST | Íntegros | Lesados | Semi-lesados |
| Equilíbrio | | | | |
| 1h | 50.8±10.4 | 25.4±13.3 | 58.1±16.8 | 16.5±14.8 ^a |
| 2h | 53.5±10.9 | 24.2±10.6 | 55.1±16.6 | 20.7±10.8 ^b |
| Diluidor | | | | |
| D1 gema total | 56.5±9.1 ^a | 25.7±13.7 | 49.0±15.9 ^a | 25.2±15.9 ^a |
| D3 10%LBD | 49.4±11.2 ^b | 24.8±9.2 | 61.9±14.8 ^b | 13.4±8.9 ^b |
| D4 20%LBD | 50.5±10.5 ^b | 23.8±2.6 | 59.4±16.8 ^b | 16.8±10.1 ^b |

1h, 2h: tempo de equilíbrio a 5°C.

Íntegros: membranas plasmática e acrossomal íntegras; Lesados: membranas plasmática e acrossomal lesadas; Semi-lesados: membranas plasmática lesada e acrossomal íntegra.

Letras diferentes para cada parâmetro na mesma coluna indicam valores diferentes (P<0.05).

Na Tabela 9 estão apresentados os dados de motilidade e cinética de espermatozoides avaliados por sistema computadorizado imediatamente após a descongelação.

Tabela 9. Motilidade e parâmetros cinéticos de espermatozoides ovino descongelados submetidos a 1 ou 2 horas de equilíbrio a 5°C antes do congelamento, em meios com gema total ou diferentes concentrações de LBD.

| Parâmetros | Tratamentos | | | | | |
|------------|------------------|---------------|---------------|------------------|---------------|---------------|
| | Equilíbrio 1h | | | Equilíbrio 2h | | |
| | D1 gema total | D3 10% LBD | D4 20% LBD | D1 gema total | D3 10% LBD | D4 20% LBD |
| MT (%) | 61.1±23.4 | 55.9±17.8 | 61.2±17.2 | 74.6±15.7 | 70.3±18.0 | 69.5±18.0 |
| MP (%) | 29.7±12.1 | 24.0±11.3 | 25.3±9.4 | 36.6±14.8 | 31.4±17.1 | 36.4±16.3 |
| VAP (µm/s) | 38.2±9.3 | 35.5±10.5 | 32.3±8.6 | 38.7±10.6 | 37.1±13.4 | 41.7±11.8 |
| VSL (µm/s) | 30.5±8.0 | 27.4±8.2 | 24.8±6.7 | 31.2±10.2 | 30.0±11.9 | 33.2±11.4 |
| VCL (µm/s) | 56.7±12.7 | 54.9±15.9 | 52.6±13.8 | 56.4±13.8 | 54.9±18.2 | 62.6±14.0 |
| ALH (m/s) | 2.6±0.2 | 2.9±0.3 | 3.0±0.5 | 2.6±0.4 | 2.7±0.5 | 3.0±0.6 |
| BCF(Hz) | 12.4±1.8 | 13.0±1.1 | 12.1±0.9 | 12.1±1.2 | 11.9±1.8 | 12.3±1.5 |
| LIN (%) | 53.5±7.4 | 50.2±6.3 | 47.6±7.7 | 54.8±11.0 | 54.3±10.3 | 52.6±12.7 |
| STR (%) | 79.56.3 | 77.4±5.4 | 76.9±5.5 | 79.6±7.7 | 80.1±5.9 | 78.5±7.8 |

1h, 2h: tempo de equilíbrio a 5°C.

MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; VAP: velocidade média do trajeto; VSL: velocidade linear progressiva; VCL: velocidade curvilínea; ALH: amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF: frequência de batimento de cauda; LIN: linearidade; STR: índice retilíneo do movimento espermático.

Não houve diferença entre os tratamentos (P>0.05).

Não houve diferença entre os tratamentos (tempo de equilíbrio versus diluidor) para todas as análises realizadas pelo CASA, no entanto, o tempo de equilíbrio e o

diluidor, quando avaliados separadamente, demonstraram ter influência sobre alguns parâmetros estudados (Tabela 10). O percentual de células móveis (MT e MP) e as velocidades média do trajeto (VAP) e linear progressiva (VSL) foram significativamente maiores ($P<0.05$) quando os espermatozoides foram submetidos à 2h de equilíbrio a 5°C. O diluidor teve influência apenas na amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), com a LBD 20% apresentando valores superiores ($P<0.05$) ao diluidor controle e semelhantes ($P>0.05$) a 10% de LBD.

Tabela 10. Motilidade e parâmetros cinéticos de espermatozoides ovino descongelados, submetidos a 1 ou 2 horas de equilíbrio a 5°C antes do congelamento, diluídos em meio contendo gema total ou diferentes concentrações de LBD.

| | Parâmetros | | | | |
|-------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|
| | MT (%) | MP (%) | VAP ($\mu\text{m/s}$) | VSL ($\mu\text{m/s}$) | ALH (m/s) |
| Equilíbrio | | | | | |
| 1h | 59.4±19.3 ^a | 26.3±11.0 ^a | 27.5±7.8 ^a | 27.5±7.8 ^a | 2.8±0.4 |
| 2h | 71.4±17.0 ^b | 34.9±15.9 ^b | 31.5±11.0 ^b | 31.5±1.0 ^b | 2.8±0.5 |
| Diluidor | | | | | |
| D1 gema total | 67.8±20.8 | 33.2±13.7 | 38.4±9.8 | 30.9±9.0 | 2.6±0.3 ^a |
| D3 10%LBD | 62.8±19.0 | 27.6±14.6 | 36.2±11.8 | 28.7±10.1 | 2.8±0.4 ^{ab} |
| D4 20%LBD | 65.3±17.8 | 30.9±14.4 | 37.0±11.2 | 29.0±10.2 | 3.0±0.5 ^b |

1h, 2h: tempo de equilíbrio pós-resfriamento a 5°C.

MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; VAP: velocidade média do trajeto; VSL: velocidade linear progressiva; ALH: amplitude de deslocamento lateral da cabeça.

Letras diferentes na mesma coluna indicam valores diferentes ($P<0.05$).

Na Tabela 11 estão dispostos os valores dos principais parâmetros associados à hiperativação espermática pós-descongelamento e ao final do TTR, segundo Mortimer e Maxwell [22].

Tabela 11. Parâmetros cinéticos, associados à hiperativação espermática, do sêmen ovino descongelado, submetidos a 1 ou 2 horas de equilíbrio a 5°C antes do congelamento, avaliados imediatamente após a descongelamento e ao final de 3h de teste de termo-resistência.

| Equilíbrio (5°C) | TTR (38°C) | Parâmetros | | | |
|---------------------|---------------|--------------------------|-------------------------|-----------|--------------------------|
| | | VSL ($\mu\text{m/s}$) | VCL ($\mu\text{m/s}$) | ALH (m/s) | LIN (%) |
| 1h | 0h | 27.5 ± 7.8 ^b | 54.7 ± 13.9 | 2.8 ± 0.4 | 50.4 ± 7.4 ^a |
| | 3h | 17.7 ± 8.7 ^c | 52.9 ± 21.5 | 2.8 ± 0.9 | 33.7 ± 9.1 ^b |
| 2h | 0h | 31.5 ± 11.0 ^a | 58.2 ± 15.4 | 2.8 ± 0.5 | 53.9 ± 11.2 ^a |
| | 3h | 19.5 ± 7.6 ^c | 60.1 ± 18.9 | 3.0 ± 0.9 | 32.0 ± 5.8 ^b |

VSL: velocidade linear progressiva; VCL: velocidade curvilínea; ALH: amplitude de deslocamento lateral da cabeça; LIN: linearidade.

Letras diferentes na mesma coluna indicam valores diferentes ($P<0.05$).

Em comparações feitas entre tempos de equilíbrios, o equilíbrio de duas horas proporcionou maior ($P<0.05$) velocidade linear progressiva pós-descongelamento. Em três

horas de TTR, houve uma redução ($P < 0.05$) na velocidade linear, não sendo verificadas diferenças ($P > 0.05$) entre os tempos de equilíbrio. A linearidade ao final do TTR foi inferior ($P < 0.05$) a apresentada pós-descongelação para os dois tempos de equilíbrios testados. Não houve influência ($P > 0.05$) do diluidor nos parâmetros avaliados (motilidade e vigor) ao longo do TTR.

4. Discussão

4.1 Experimento I

O Experimento I avaliou as diferentes concentrações de LBD e tempos de equilíbrio pré-resfriamento em temperatura ambiente, no intuito de verificar se as LBDs preservariam de forma mais eficiente os espermatozoides, após permanecerem em contato com o diluidor por um período maior antes do resfriamento.

Após a curva de resfriamento, houve redução na motilidade e no percentual de células reativas ao teste hiposmótico, independente do tratamento utilizado, quando comparado ao sêmen fresco e diluído. Estes achados demonstram que a permanência do sêmen diluído em equilíbrio a $\approx 25^\circ\text{C}$ por um período de 0 a 120min não proporciona melhoria na qualidade espermática pós-resfriamento, mas também não exerce influencia negativa pela longa exposição das células espermáticas ao glicerol.

A adição de glicerol em uma única etapa é o método amplamente utilizado para diluição de sêmen de carneiro para criopreservação [23], no entanto, devido ao seu efeito tóxico, é recomendado que o glicerol não permaneça mais do que 20 a 30 min em contato com as células espermáticas antes da congelação [24]. Neste experimento, o equilíbrio a $\approx 25^\circ\text{C}$ por até 2h, seguido de 2.5h de curva de resfriamento, não demonstrou ser prejudicial aos espermatozoides ovinos quando

utilizados meios com glicerol contendo lipoproteínas de baixa densidade ou gema de ovo integral.

Os diluidores formulados com 20% de LBD apresentaram resultados semelhantes aos meios com gema de ovo nas avaliações de motilidade progressiva imediatamente após o resfriamento. Os tratamentos também foram igualmente eficazes na manutenção da integridade funcional da membrana plasmática. Esses resultados confirmam a importância da fração lipoprotéica de baixa densidade da gema de ovo na proteção de espermatozóides à redução de temperatura [4-6, 8-15, 25-28].

O diluidor formulado com gema de ovo foi significativamente superior aos diluidores com LBD após a primeira hora de TTR, e o D2 (5% LBD) não foi capaz de preservar a motilidade progressiva em níveis aceitáveis ao final do teste de termo-resistência. As amostras descongeladas são consideradas aceitáveis quando apresentam pelo menos 30% de espermatozóides progressivos após 3h de TTR [17]. O sêmen diluído e resfriado com LBD 5% não atingiu esse percentual de motilidade progressiva, mesmo não tendo passado pelo processo de congelação.

Apesar de não terem sido observados benefícios adicionais à viabilidade espermática pela permanência dos espermatozóides em tempo de equilíbrio pré-resfriamento, este estudo demonstrou que o sêmen diluído pode permanecer de 0 a 120 minutos em temperatura ambiente ($\approx 25^{\circ}\text{C}$), possibilitando maior flexibilidade ao protocolo de resfriamento e congelação.

4.2 Experimento II

O Experimento II testou os mesmos diluidores após a congelação, sem tempo de equilíbrio pré-resfriamento, uma vez que esta etapa não promoveu melhorias nas características espermáticas pós-resfriamento.

A utilização de 5% de LBD proporcionou resultados inferiores nas avaliações de motilidade, após a descongelação e ao longo do TTR, e integridade funcional e estrutural de membranas espermáticas, enquanto as concentrações de 10% e 20% apresentaram potencial semelhante à gema para estes parâmetros. É possível, então, que a LBD na concentração de 5% seja insuficiente para garantir a proteção aos espermatozóides ovinos durante o processo de resfriamento e congelação.

Os resultados obtidos nas avaliações de motilidade e integridade de membranas pós-descongelação foram inferiores aos relatados na literatura para sêmen de ovino [29-35] em todos os tratamentos. Neste caso, é possível que a ausência de equilíbrio pós-resfriamento possa ter influenciado negativamente os resultados.

O mesmo pôde ser observado nas avaliações de cinética espermática. Os resultados obtidos pela análise computadorizada (CASA) encontram-se abaixo dos relatados para a espécie. Segundo Davis e Katz [36, 37], concentrações inferiores a 20×10^6 spz/ml ou superiores a 50×10^6 spz/ml fornecem resultados imprecisos durante a avaliação da cinética espermática pelo CASA. Para avaliação pelo CASA, no presente experimento foi usado solução fisiológica (NaCl) para diluir o semen após a descongelação, a fim de ajustar a concentração espermática para 50×10^6 spz/ml. Comparando os resultados obtidos pelo CASA e os avaliados de forma subjetiva pode-se afirmar que a solução fisiológica utilizada prejudicou a motilidade espermática já que na avaliação subjetiva valores de motilidade acima de 19,9% foram encontrados em todas as avaliações feitas.

O programa *Sperm Class Analyser*® classifica as células como progressivamente móveis quando apresentam $VCL > 45 \mu\text{m/s}$ (velocidade curvilínea) e $STR > 80\%$ (índice retilíneo do movimento espermático). Estes parâmetros mais severos também podem ter influenciado negativamente nos resultados de motilidade progressiva avaliados por análise computadorizada, quando comparados a avaliação subjetiva.

O diluidor controle apresentou melhores resultados para os valores de linearidade, velocidade média do trajeto e velocidade linear progressiva que os diluidores à base de LBD nas concentrações 5% e 10%. A velocidade é uma característica importante nas avaliações de viabilidade espermática, pois tem sido considerada um indicador indireto da função mitocondrial dos espermatozoides [38]. Durante a criopreservação, as mitocôndrias sofrem danos [39, 40] resultando na diminuição da atividade respiratória dos espermatozoides pós-descongelamento [41]. Desta forma, na ausência do equilíbrio pré e pós-resfriamento, o diluidor formulado com gema de ovo tende a ser melhor que a LBD em concentrações abaixo de 20%.

4.3 Experimento III

O Experimento III testou o tempo de equilíbrio a 5°C com os meios contendo 10% e 20% de LBD em substituição à gema de ovo. Resultados conflitantes sobre o período ideal de equilíbrio têm sido atribuídos a interações entre o tempo de equilíbrio e a concentração de glicerol, a taxa de diluição e a taxa de resfriamento.

Purdy [44] avaliou o efeito de diferentes tempos de equilíbrio pós-resfriamento e pré-congelamento (0, 24 e 48h a 5°C) sobre as características do sêmen ovino criopreservado e não constatou influência do equilíbrio sobre a motilidade, integridade da membrana plasmática, percentual de células com acrossoma intacto e capacidade de

ligação à membrana perivitelínica. Já no presente experimento, ao serem comparados períodos de 1h e 2h a 5°C, o equilíbrio de 2h demonstrou ser o protocolo mais apropriado para a congelação de sêmen de carneiro em meios formulados com glicerol e gema de ovo ou lipoproteínas de baixa densidade nas proporções de 10% e 20%.

Patt e Nath [43] verificaram que, em meio contendo glicerol e gema de ovo, um equilíbrio de 1h apresentou melhores resultados que 6h de equilíbrio. Resultados semelhantes aos do presente experimento foram relatados por Salamon [42] que comparou períodos de equilíbrio de 0 e 2.5h antes da congelação dos espermatozóides ovinos em pellet e verificou que a permanência dos espermatozóides por maior tempo em equilíbrio com diluidor a 5°C é mais vantajoso do que a ausência de equilíbrio.

Os resultados de motilidade foram semelhantes em todos os tratamentos ao longo do TTR, para avaliações subjetivas e computadorizadas. No entanto, o percentual de células progressivamente móveis foi inferior quando estimado pelo CASA mesmo diluindo as amostras em base Tris-cítrico (3.63g Tris, 1.99g ácido cítrico, 0.5g glicose, 100mg estreptomicina, 100.000UI penicilina, 100mL água deionizada, destilada e autoclavada, contendo 15% de gema de ovo e 5% de glicerol) em substituição a solução fisiológica, fato que pode ser atribuído aos severos parâmetros para classificação de espermatozóides progressivamente móveis atribuídos pelo sistema de análise computadorizada.

De acordo com a avaliação da cinética espermática, as amostras não apresentaram espermatozóides hiperativados após a descongelação e ao final do TTR. Segundo Mortimer e Maxwell [22], os padrões de hiperativação dos espermatozóides de carneiro são: velocidade curvilínea (VCL) $\geq 250 \mu\text{m/s}$, velocidade linear progressiva (VSL) $\leq 100 \mu\text{m/s}$, linearidade (LIN) $\leq 30\%$ e amplitude de deslocamento lateral da

cabeça (ALH) $\geq 9,0 \mu\text{m}$. Resultados semelhantes foram encontrados por Moustacas et al. [15].

A hiperativação é caracterizada pelas mudanças no padrão do batimento flagelar, fato que facilitaria a penetração dos espermatozoides através dos diversos envoltórios dos oócitos [45]. Desta forma, a ausência de espermatozoides hiperativados pós-descongelamento é desejável, visto que reduz o desgaste metabólico.

Com base nos resultados deste estudo, pode-se concluir que as lipoproteínas de baixa densidade possuem propriedades crioprotetoras para os espermatozoides de carneiro e que as proporções de 10 e 20% em meio à base de Tris-cítrico são capazes de preservar a viabilidade espermática de forma semelhante à gema de ovo. O tempo de equilíbrio pré-resfriamento não promoveu melhorias nas características espermáticas pós-resfriamento, mas também não causou efeitos deletérios sobre a qualidade espermática pós-resfriamento, tornando o protocolo de congelamento mais flexível, permitindo que o sêmen diluído possa ser transportado em temperatura ambiente por até 2h. O tempo de equilíbrio de duas horas após o resfriamento do sêmen diluído foi uma importante etapa no processo de criopreservação de sêmen ovino, tanto com gema como quando do uso de lipoproteínas de baixa densidade, uma vez que sua ausência interfere negativamente na qualidade dos espermatozoides congelados.

Agradecimento

À FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia) pelo apoio financeiro e ao setor de Reprodução Animal da Escola de Veterinária da UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais) e à CAPES pelo suporte técnico.

Referências

- [1] Parks JE, Graham JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 1992;38:209-22.
- [2] Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen: I Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci* 1995;37:185-249.
- [3] Watson PF, Martin ICA. The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5°C. *Aust J Biol Sci* 1975;28:145-52.
- [4] Foulkes, J. A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1977;49:277-84.
- [5] Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Ménard M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol Reprod* 2002;67:1250-8.
- [6] Bergeron A, Crête Marie-Heiene, Brindle Y, Manjunath P. 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. *Biol Reprod* 2004;70:708 -17.
- [7] Bergeron B, Villemure M, Lazure C, Manjunath P. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 2005;71:461-70.
- [8] 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* 2002;57:1695-706.
- [9] Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gérard O, Courtens JL, Anton M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 2004;61:895-907.

- [10] Juliani G, Henry M, Melo VI. Freezing of equine semen in extenders with low density lipoproteins. In: Internacional Congress on Animal Reproduction, 2004, Porto Seguro. Anais...Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004.
- [11] Neves MM. Extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de *Gallus domesticus* e sua aplicação na criopreservação do sêmen canino. [Low density lipoproteins extraction from *Gallus domesticus* egg yolk and its application in canine sperm cryopreservation] PhD thesis. Universidade Federal de Minas Gerais, MG, 2008.
http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/1843/SSLA-7UEHL3/1/mariana_machado_neves.pdf
- [12] Silva MC, Snoeck PPN, Silva SCB, Álvares CTG, Fujii JB, Neves MM, Henry M. Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre a viabilidade dos espermatozoides ovinos resfriados. [Effect of low density lipoprotein on the viability of ram cooling spermatozoa]. In: 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2008, Gramado. Anais... Gramado: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 2008.
<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R1251-1.pdf>
- [13] Varela Junior AS, Corcini CD, Ulguim RR, Alvarenga MV, Bianchi I, Corrêa MN, Lucia T Jr, Deschamps JC. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. *Anim Reprod Sci* 2009;115:323-7.
- [14] Hu JH, Li QW, Zan LS, Jiang ZL, An JH, Wang LQ, Jiaet YH. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing. *Anim Reprod Sci* 2010;117:11-7.
- [15] Moustacas VS, Zaffalon FG, Lagares MA, Loiza-Eccheverri AM, Varago FC, Neves MM, Heneine LGD, Arruda RP, Henry, M. Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were na acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram sêmen. *Theriogenology* 2011;75:300-7.

- [16] Lowry OH, Rosebrogh NJ, Farr AL. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
- [17] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. [Manual for andrological examination and evaluation of animal semen]. CBRA,1998.
- [18] Oberst ER, Jobim MIM, Mattos RC, Kroth E, Lara G, Smiderie W, Bronzatto M. Teste hiposmótico e sua relação com outros métodos da avaliação da integridade da membrana espermática do carneiro. [Hypoosmotic test and its relationship to other methods of assessing the integrity of the ram sperm membrane]. *Rev Bras Reprod Anim* 2003;7:375-6.
- [19] Melo MIV, Henry M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino [Hypoosmotic test for the evaluation of equine semen]. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 1999; 51:71-8.
- [20] Harrison RAP, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1990;88:343-52.
- [21] Zúccari CESN. Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina. [Effect of cryopreservation on the structural integrity of equine sperm cell] PhD thesis. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 1998.
- [22] Mortimer ST, Maxwell WMC. Kinematics definition of ram sperm hyperactivation. *Reprod Fertil Develop* 1999;11:25–30.
- [23] Evans G, Maxwell WMC. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Sydney: Butterworths, 1987.
- [24] Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 2000;62:77-111.

- [25] Pace MM, Graham EF. Components of egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J Anim Sci* 1974;39:1144-9.
- [26] Watson PF. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg yolk lipoprotein. *J Reprod Fertil* 1981;62:483-92.
- [27] Graham JK, Foote RH. Effect of several lipids fatty acyl chain length and degree of insaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology* 1987;24:42-52.
- [28] Bergeron A, Manjunath P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev* 2006;73:1338-44.
- [29] Brisola LBS, Neves JP, Gonçalves PBD, Oliveira JFC, Montagner MM. Integridade das membranas plasmática, nuclear e mitocondrial de espermatozóides ovinos criopreservados com etileno glicol. [Plasma membrane integrity, nuclear and mitochondrial of ram sperm cryopreserved with ethylene glycol] *Ciência Rural* 1999;29:527-31.
- [30] Bag S, Joshi A, Naqvi SMK, Rawat PS, Mittal JP. Effect of freezing temperature, at which straws were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2002;72:175-83.
- [31] Gil J, Rodriguez-Irazoqui M, Lundeheim N, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for artificial insemination. *Theriogenology* 2003;59:1157-70.
- [32] Anel L, Alvarez M, Martinez-Pastor F, Garcia-Macias V, Anel E, De Paz P. Improvement strategies in ovine artificial insemination. *Reprod Domest Anim* 2006;41:30-42.
- [33] Maia MS. Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos ao oxigênio (ROS) no semen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio

(OEP), Trolox-C e catalase. [Sperm viability and reactive oxygen species (ROS) generation in ram semen cryopreserved in extenders supplemented with sodium lauryl sulfate (OEP), Trolox-C and catalase] PhD Thesis. Universidade Estadual Paulista, SP, 2006.

<http://www.emparn.rn.gov.br/contentproducao/aplicacao/emparn/arquivos/publicacoes/Marciane/Tese%20Marciane%20da%20Silva%20Maia.pdf>

[34] O'Meara CM, Hanrahan JP, Prathalingam NS, Owen JS, Donovan A, Fair F, Ward F, Wade M, Evans ACO, Lonergan P. Relationship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams after cervical insemination of ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 2008;69:513-22.

[35] Kumar D, Joshi A, Naqvi SMK. Effect of post-thaw incubation on semen characteristics of ram spermatozoa cryopreserved under controlled and uncontrolled rate of cooling. *Anim Reprod* 2009;6:526-34.

[36] Davis RO, Katz DF. Standardization and Comparability of CASA Instruments. *J Androl* 1992;13:81-6.

[37] Davis RO, Katz DF. Operational standards for CASA instruments. *J Androl* 1993;14:385-95.

[38] Graham EF, Schmehl MKL, Deyo RCM. Cryopreservation and fertility of fish, poultry and mammalian spermatozoa. In: *Proceedings of the 10th NAAB Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction 1984*, Milwaukee, WI. Columbia, MO: National Association of Animal Breeders. p.4-24, 1984.

[39] Gillan L, Maxwell WMC, Evans G. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. *Reprod Fertil Develop* 2004;16:447-54.

- [40] Peris SI, Morrier A, Dufour M, Bailey JL. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *J Androl* 2004;25:224-33.
- [41] Windsor DP. Mitochondrial function and ram sperm fertility. *Reprod Fertil Develop* 1997;9:279-84.
- [42] Salamon S. Deep freezing of ram semen: Recovery of spermatozoa after pelleting and comparison with other methods of freezing. *Aust J Biol Sci* 1968;21:351-60.
- [43] Patt-Jr JA, Nath J. Effects of diluents, equilibration time, and freezing rates on the storage of ram semen. *Cryobiology* 1969;5:385-92.
- [44] Purdy PH. The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48h at 5 °C prior to cryopreservation. *Anim Reprod Sci* 2006;93:114-23.
- [45] Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 2002;57:149-79.

Anexos

Anexo 1. Solução utilizada para realização do teste hiposmótico.

| Solução hiposmótica (100 mOsm/L) | |
|---|---------|
| Frutose | 9g |
| Citrato de Sódio | 4,9 |
| Água destilada | 1000 mL |

Fonte: OBERST et al. (2003).

Anexo 2. Composição do meio diluidor base.

| Diluyente controle: Tris-glicose-gema | |
|--|-----------|
| Tris (N-Tris[hidroximetil]aminometano) | 3,63g |
| Ácido cítrico monoidratado | 1,99g |
| Glicose | 0,5g |
| Glicerol | 5% |
| Penicilina | 100.000UI |
| Estreptomina | 100mg |
| Gema | 15% |
| Água destilada q.s.p. | 100mL |

Fonte: Salamon e Maxwell (2000).

Anexo 3. Composição das soluções estoque e de trabalho empregadas na técnica de fluorescência para avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal dos espermatozoides.

| Soluções | Constituintes | Quantidades |
|---|----------------------|---|
| I. Solução estoque de CFDA | CFDA | 2,3mg |
| | DMSO | 5mL |
| II. Solução estoque de IP | IP | 2mg |
| | 0,9% NaCl | 4mL |
| III. Solução estoque de formalina 40% | Formol 40% | Diluição 1:80 |
| | 0,9% NaCl | 100 µL formol a 40%:7,9 mL Solução Fisiológica |
| IV. Solução Estoque de citrato de sódio | Citrato de sódio | 3 g |
| | 0,9% NaCl | 100ml |
| V. Solução Trabalho | CFDA | 20 µL |
| | IP | 10 µL |
| | Formol | 10 µL |
| | Citrato de sódio | 960 µL |
| Amostras para avaliação | CFDA | 20 µL |
| | Sêmen | 10 µL |
| | Solução Trabalho | 40 µL |

Fonte: Zúccari (1998). CFDA = diacetato de carboxifluoresceína / IP = iodeto de propídio / DMSO = dimetil sulfóxido / NaCl = cloreto de sódio.