

Mariana Machado Neves

**EXTRAÇÃO DAS LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE
DA GEMA DO OVO DE *Gallus domesticus* E SUA
APLICAÇÃO NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN CANINO**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor
em Ciência Animal.

Curso: Ciência Animal

Área: Reprodução

Orientador: Prof. Marc Henry

Co-orientador: Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine.

Belo Horizonte

Escola de Veterinária – UFMG

2008

N518e Neves, Mariana Machado.

Extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de *Gallus domesticus* e sua aplicação na criopreservação do sêmen canino / Mariana Machado Neves. – 2008.

116 p. : il.

Orientador: Marc Henry

Co-orientador: Luiz Guilherme Dias Heneine

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

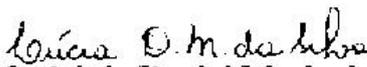
1. Cão – Reprodução – Teses. 2. Sêmen congelado – Teses. 3. Criopreservação – Teses.
4. Lipoproteínas – Teses. I. Henry, Marc Roger Jean Marie. II. Heneine, Luiz Guilherme Dias.
III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.708 926

Tese defendida e aprovada em 14 de março de 2008, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Marc Roger Jean Marie Henry
(Orientador)


Prof. Lúcia Daniel Machado da Silva


Prof. Maria Denise Lopes


Prof. Marcelo Matos Santoro


Prof. Vicente Ribeiro do Vale Filho

“Na vida, às vezes, somos chamados a enfrentar situações em que temos certeza de que nossa força não garantirá a vitória. Mesmo assim, seguimos em frente, confiando na outra força que nos protege e orienta. Aprendemos que nem sempre Deus escolhe os mais capacitados, mas Ele sempre capacita os escolhidos”.

(Chris Linnares)

Dedico esta vitória a Deus,
à minha mãe Alba, por existir e
à capacidade do ser humano em aprender, crescer e semear...

AGRADECIMENTOS

À UFMG, pela oportunidade de realização do Doutorado e por ter me acolhido nestes anos.

À FAPEMIG, pelo auxílio financeiro.

Ao Prof. Dr. Marc Henry, pela orientação, apoio, amizade e transparência. Por ter me ensinado a importância do foco, da execução de pesquisas inteligentes e, além de tudo, do senso crítico.

Ao Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine, por ter me acolhido em seu laboratório na Fundação Ezequiel Dias – FUNED, participado como co-orientador deste trabalho e ter me apresentado a um mundo novo, trazendo os conhecimentos na área da pesquisa molecular.

Ao Prof. Dr. Alan Maia Borges, por ter participado do Comitê de Orientação.

A todos os membros da banca de avaliação, pela disponibilidade, paciência, apoio e grande contribuição na etapa final deste processo.

À Prof. Marlúcia da Rocha e Silva, por ter me dado condições para desenvolver as atividades de doutorado juntamente com as atividades de professora no UnilesteMG, além de me mostrar que trabalhar com ética e profissionalismo sempre vale a pena, sempre!

Ao Daniel e Alécia, do canil Zuo's, por terem aberto as portas do canil e disponibilizado seus reprodutores para o desenvolvimento das pesquisas.

Ao Sr. Motta, da Tetakon, pelo empréstimo da máquina de congelamento computadorizada.

A todos os funcionários, professores e colegas da Escola de Veterinária, pela convivência e apoio me todos estes anos.

Aos meus irmãos do coração, orientados do Prof. Marc Henry, e associados, Geraldo Juliani, Jair, Márcio, Adriana, Alessandra, Fabiana, André, Valéria, Ester, pelos momentos de descontração, de trabalho árduo e pela ajuda e apoio constantes. Em especial ao Carlos Augusto

Clemente, que me acompanhou nas atividades experimentais, desempenhando-as com responsabilidade e alegria.

Aos meus irmãos da FUNED, Viviane, Antônio Zumpano, Paulo, Theonis, Telma, Elaine, Isabela, Patrícia e Guilherme, por terem me acolhido com carinho, pelos ensinamentos e pela ajuda nas atividades experimentais.

À minha família UnilesteMG, meus queridos amigos biólogos, pelo companheirismo, pela amizade verdadeira e pela presença constante.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	16
ABSTRACT	17
INTRODUÇÃO	18

Capítulo 1

REVISÃO DE LITERATURA	19
1.1 - Criopreservação do sêmen	19
1.1.1 - Constituintes da membrana plasmática do espermatozóide	19
1.1.2 - Efeitos do choque térmico sobre a membrana espermática	20
1.2 – Atualidades sobre o congelamento do sêmen canino: fatores que influenciam sua fertilidade	21
1.2.1 – Métodos de avaliação espermática <i>in vitro</i>	22
1.2.1.1 - Motilidade espermática	22
1.2.1.2 - Morfologia espermática, integridade de membrana e as técnicas de fluorescência	22
1.2.1.3 - Teste hiposmótico	23
1.2.1.4 - Teste de termorresistência (TTR)	23
1.2.1.5 - Interação entre gametas <i>in vitro</i>	23
1.2.2 – Pontos críticos no congelamento do sêmen canino	24
1.2.2.1 – Método de centrifugação	24
1.2.2.2 – Protocolo de resfriamento e congelamento	24
1.2.2.3 – Temperatura de descongelamento	25
1.2.2.4 – Componentes do meio diluidor para congelamento	26
1.3 - A gema do ovo e as lipoproteínas de baixa densidade	27
1.3.1 - Constituintes da gema do ovo	27
1.3.2 - Aplicações da gema do ovo e das lipoproteínas de baixa densidade	29
1.3.3 - Estudo dos mecanismos de ação da gema do ovo e das lipoproteínas de baixa densidade na preservação espermática	30
1.3.4 - Processos de extração e purificação das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo	33

Capítulo 2 – Experimento I:

Avaliação do uso de diferentes concentrações de sulfato de amônio na técnica de extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de galinha	35
Resumo	35
Abstract	35
2.1 – Introdução	36
2.2 – Material e métodos	36
2.2.1 – Matéria prima e obtenção da gema de ovo de galinha	36
2.2.2 – Obtenção do plasma da gema	36
2.2.3 – Extração das lipoproteínas de baixa densidade	37
2.2.4 – Análises químicas	37
<i>Determinação do teor de matéria seca</i>	37
<i>Determinação do teor de lípidos</i>	38

<i>Dosagem de proteínas</i>	38
<i>Purificação da lipoproteína de baixa densidade em cromatografia de filtração em gel</i>	38
<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</i>	38
2.2.5 - Análise estatística	39
2.3 – Resultados	41
2.4 – Discussão	43
2.5 – Conclusão	46

Capítulo 3 – Experimento II:

Padronização de uma técnica de congelamento de sêmen canino	47
Resumo	47
Abstract	47
3.1 – Introdução	48
3.2 – Material e métodos	49
3.2.1 – Animais e coleta do sêmen	49
3.2.2 – Meios diluidores	49
3.2.3 – Avaliações espermáticas	49
3.2.4 – Experimentos	50
<i>Experimento I: Avaliação do meio de centrifugação</i>	50
<i>Experimento II: Avaliação do meio de congelamento e da temperatura de descongelamento</i>	51
3.2.5 – Análise estatística	51
3.3 – Resultados	52
<i>Experimento I: Avaliação do meio de centrifugação</i>	52
<i>Experimento II: Teste do meio de congelamento</i>	55
3.4 – Discussão	58
3.5 – Conclusões	62

Capítulo 4 - Experimento III:

Avaliação <i>in vitro</i> de células espermáticas caninas congeladas em diluidores com diferentes concentrações de lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de galinha, nas formas natural e liofilizada	63
Resumo	63
Abstract	63
4.1 – Introdução	64
4.2 – Material e métodos	65
4.2.1 – Extração, forma de utilização e avaliação química das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de galinha.....	65
<i>Extração das lipoproteínas de baixa densidade</i>	65
<i>Liofilização das lipoproteínas de baixa densidade</i>	65
<i>Análises químicas</i>	65
4.2.2 – Congelamento do sêmen canino	66
<i>Animais</i>	66
<i>Meios diluidores de centrifugação e congelamento</i>	66
<i>Avaliação seminal e espermática</i>	66
<i>Processamento do sêmen para congelamento</i>	67

<i>Descongelamento do sêmen e avaliação espermática</i>	67
4.2.3 – Análise estatística	67
4.3 – Resultados	70
4.4 – Discussão	73
4.5 – Conclusões	79

Capítulo 5 – Experimento IV:

Avaliação da eficácia da associação de diferentes crioprotetores às lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo sobre a viabilidade de espermatozóides caninos congelados	80
Resumo	80
Abstract	80
5.1 – Introdução	81
5.2 – Material e métodos	82
5.2.1 – Extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo	82
5.2.2 – Congelamento do sêmen canino	82
<i>Animais</i>	82
<i>Avaliação macroscópica e microscópica do sêmen</i>	82
<i>Meios diluidores para centrifugação e congelamento</i>	82
<i>Processamento do sêmen para congelamento</i>	83
<i>Descongelamento e avaliação espermática</i>	83
5.2.3 – Análise estatística	83
5.3 – Resultados	84
5.4 – Discussão	86
5.5 – Conclusões.....	89

Capítulo 6

CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
-----------------------------------	-----------

Capítulo 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
---	-----------

Capítulo 8

ANEXOS	104
<i>Experimento I – Anexos 1 a 6</i>	104
<i>Experimento II – Anexos 7 e 8</i>	110
<i>Experimento III – Anexos 9 e 10</i>	112
<i>Experimento IV – Anexos 11 e 12</i>	115

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2: Experimento I

- Tabela 2.1 – Teor de matéria seca (%), lípidos (%) e proteína (mg/mL) da gema de ovo e das lipoproteínas de baixa densidade (LBD) extraídas da gema do ovo por precipitação com sulfato de amônio, nas concentrações de 10, 20, 40, 45 e 50% (N= média de três extrações/tratamento)..... 41

Capítulo 3 – Experimento II

- Tabela 3.1 – Motilidade espermática total (MT), progressiva (MP) e vigor (V) dos espermatozoides caninos logo após a centrifugação (Tempo 0) (N=15 ejaculados/tratamento) ($p>0,05$)..... 52
- Tabela 3.2 – Porcentagem de espermatozoides caninos reativos ao teste hiposmótico (HO) nos tempos 0 (T0) e 30 (T30) minutos após a centrifugação, diluídos em meios Tris-cítrico e Glicose-EDTA (N= 15 ejaculados/tratamento)..... 54
- Tabela 3.3 – Motilidade total (MT, %), progressiva (MP, %) e vigor (V, 0-5) logo após o descongelamento (T0) dos espermatozoides caninos, considerando-se os meios de congelamento (N = 30 amostras/tratamento) e as duas temperaturas de descongelamento testadas (N = 45 amostras/tratamento)..... 55
- Tabela 3.4 – Porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais (Normais), reativos ao teste hiposmótico (HO) e com as membranas espermáticas íntegras (Íntegros) no descongelamento de sêmen canino, considerando os meios de congelamento (N = 30 amostras/tratamento) e as temperaturas de descongelamento testadas (N = 45 amostras/tratamento)..... 57

Capítulo 4 - Experimento III

- Tabela 4.1 – Teor de matéria seca, dosagem de proteínas e de lípidos da gema de ovo total de galinha e das lipoproteínas de baixa densidade (LBD) 70
- Tabela 4.2 – Motilidade total (MT), progressiva (MP) e vigor (V) dos espermatozoides caninos no sêmen fresco e congelado, quando diluído em meio Tris-cítrico contendo 20% de gema de ovo (T1) e diferentes concentrações de lipoproteínas de baixa densidade (T2 a T7), logo após o descongelamento (tempo 0) (N = média de quatro cães/ tratamento)..... 71
- Tabela 4.3 – Porcentagem de espermatozoides com anormalidades de acrossoma (Acrossoma), morfológicamente normais (Normais) e reativos ao teste hiposmótico (HO) obtida do sêmen canino fresco e congelado em Tris-cítrico contendo 20% de gema do ovo (T1, controle) e diferentes concentrações de lipoproteínas de baixa densidade (T2 a T7) (N = média de quatro cães/tratamento)..... 73

Tabela 4.4 –	Porcentagem de espermatozóides lesados, semi lesados e íntegros, obtida no teste de integridade estrutural de membrana plasmática e acrossomal, utilizando CFDA/IP, do sêmen canino congelado em meio Tris-cítrico com 20% de gema de ovo (T1, controle) e diferentes concentrações de lipoproteínas de baixa densidade (T2 a T7) (N = média de quatro cães/tratamento).....	73
--------------	--	----

Capítulo 5 – Experimento IV

Tabela 5.1 –	Volume total (mL) do <i>pool</i> de sêmen, referente ao ejaculado de dois cães, e motilidade total (MT), progressiva (MP) e vigor (V) dos espermatozóides no sêmen fresco.....	84
Tabela 5.2 –	Média de espermatozóides com motilidade total (MT), progressiva (MP) e vigor (V) nos <i>pools</i> de sêmen canino diluídos em meio Tris-gema com 5% de glicerol (controle) e Tris-1,25% de lipoproteínas de baixa densidade com diferentes crioprotetores (N = média quatro <i>pools</i> / tratamento) (p>0,05).....	84
Tabela 5.3 –	Motilidade total (MT), progressiva (MP) e vigor (V) de espermatozóides caninos congelados em meio Tris-cítrico contendo gema de ovo a 20% com 5% de glicerol (controle) e 1,25% (v/v) de lipoproteínas de baixa densidade, em substituição a gema, com diferentes crioprotetores, obtida após descongelamento (p>0,05) (N = média quatro <i>pools</i> / tratamento).....	84
Tabela 5.4 –	Espermatozóides caninos morfolologicamente normais (Normais) e reativos ao teste hiposmótico (HO) obtidos após o descongelamento, em meio Tris-gema com 5% de glicerol (controle) e 1,25% (v/v) de lipoproteínas de baixa densidade, em substituição a gema, com diferentes crioprotetores (N = média quatro <i>pools</i> / tratamento).....	86
Tabela 5.5 –	Porcentagem média de espermatozóides caninos lesados, semi-lesados e íntegros após o descongelamento, avaliados pelo teste de fluorescência com CFDA e IP, em meio Tris-gema com 5% de glicerol (controle) e 1,25% (v/v) de lipoproteínas de baixa densidade, em substituição a gema, com diferentes crioprotetores (N = média quatro <i>pools</i> / tratamento).....	86

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2: Experimento I

Figura 2.1 –	Método de extração das lipoproteínas de baixa densidade (LBD), mostrando em A) a porção do grânulo da gema (<i>pellet</i> , *) obtida após primeira centrifugação da gema; B) a forma de adição da solução saturada de sulfato de amônio, na concentração de 40%; C) o plasma da gema acondicionado em membrana durante o processo de diálise; e D) a obtenção da fração da LBD (seta), após a última centrifugação.....	40
--------------	---	----

Figura 2.2 –	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), mostrando os pesos moleculares (KDa) do padrão (P) e das lipoproteínas de baixa densidade extraídas em diferentes concentrações de sulfato de amônio (10, 20, 40, 45 e 50%). Géis de concentração e separação de 4% e 12,5%, respectivamente, corados em Azul de Coomassie.....	42
Figura 2.3 –	A) Picos cromatográficos obtidos da aplicação das lipoproteínas de baixa densidade (LBD) na coluna de filtração em gel Sephacryl S100 HR, eluídas em Tris 50mM; B) Eletroforese SDS-PAGE dos picos obtidos a partir da corrida cromatográfica, observando-se o padrão (P), LBD total (T), pico 1 (1' e 1), pico 2 (2) e pico 3 (3). Géis de concentração e separação 4% e 12,5%, respectivamente, corados pela prata. (1' – início do pico 1, indicado no gráfico).....	43

Capítulo 3 – Experimento II

Figura 3.1–	Motilidade progressiva (MP, %) dos espermatozóides caninos diluídos em meios Glicose-EDTA (GE) e Tris-cítrico (TC), centrifugados (c/c) ou não (s/c), logo após a centrifugação (T0) e aos 30, 60, 90 e 120 minutos após a incubação a 37°C (p>0,05). (C1: GE s/c; C2: TC s/c; C3: GE c/c; C4: TC c/c).....	53
Figura 3.2 –	Taxa de queda da motilidade progressiva de espermatozóides caninos diluídos nos meios Glicose-EDTA (GE) e Tris-cítrico (TC), centrifugados (c/c) ou não (s/c), entre os tempos T0 a T90 de incubação a 37°C (p>0,05). (C1: GE s/c; C2: TC s/c; C3: GE c/c; C4: TC c/c).....	53
Figura 3.3 –	Média de espermatozóides caninos morfologicamente normais (EN) nos meios Glicose-EDTA (GE) e Tris-cítrico (TC), centrifugados (c/c) ou não (s/c), nos tempos 0 (T0) e 30 minutos (T30) após a incubação a 37°C (p<0,05). (C1: GE s/c; C2: TC s/c; C3: GE c/c; C4: TC c/c).....	54
Figura 3.4–	Motilidade total (MT) e progressiva (MP) dos espermatozóides caninos congelados nos meios Tris-cítrico-gema (G1), Lactose-gema (G2) e INRA 82 (G3), nos tempos avaliados após o descongelamento (p<0,05), independente da temperatura de descongelamento usada (p>0,05). (A: 37°C/30seg.; B:52°C/10seg seguido de 37°C/30seg.).....	56
Figura 3.5 –	Taxa de queda da motilidade progressiva (MP) dos espermatozóides caninos do tempo 0 (T0) até 90 minutos (T90) após o descongelamento, considerando os meios de congelamento (G1: Tris-cítrico-gema; G2: Lactose-gema; G3: INRA82) e as temperaturas de descongelamento testadas (A: 37°C/30seg.; B: 52°C/10seg. seguida de 37°C/30seg.) (p>0,05).....	57

Capítulo 4 – Experimento III

Figura 4.1 –	A) sêmen de cão Labrador envasado em palhetas de 0,5mL, diluído em meio Tris-cítrico-gema (Esquerda) e meio Tris-cítrico com 9,64mg de lipoproteínas de baixa densidade na forma natural (Direita); B) máquina de congelamento modelo TK3000 (Tetakon – Brasil); C) palhetas resfriadas iniciando processo de congelamento, numa curva de -20°C/min.....	69
--------------	--	----

Figura 4.2 – Médias de motilidade progressiva (MP) e vigor (V) apresentadas por espermatozóides caninos recém coletados (SF) e diluídos, após a centrifugação, em meios a base de gema (T1) e de lipoproteínas de baixa densidade, natural (N) e liofilizadas (L), em diferentes concentrações (T2: 9,64mg N; T3: 19,28mg N; T4: 24,1mg N; T5: 9,64mg L; T6: 19,28mg L; T7: 24,1mg L) ($p>0,05$).....	70
Figura 4.3 – Média da queda da motilidade total (A) e progressiva (B) de espermatozóides caninos descongelados e incubados a 37°C do tempo 0 até T90, diluídos em meio Tris-cítrico contendo 20% de gema de ovo (T1) e lipoproteínas de baixa densidade, natural (N) e liofilizadas (L), em diferentes concentrações (T2: 9,64mg N; T3: 19,28mg N; T4: 24,1mg N; T5: 9,64mg L; T6: 19,28mg L; T7: 24,1mg L) ($p>0,05$).....	72

Capítulo 5 – Experimento IV

Figura 5.1 – Média de espermatozóides caninos com motilidade progressiva (MP) no sêmen fresco (1), sêmen diluído (2) e no sêmen descongelado nos tempos 0 (3) e 30 (4), utilizando meios contendo 20% de gema e 5% de glicerol (GEMA) e 1,25% (v/v) de lipoproteínas de baixa densidade, em substituição a gema de ovo total, com glicerol (GLI), dimetil formamida (DMF) e etileno glicol (ETL) a 5% (N = média quatro <i>pools</i> / tratamento) ($p>0,05$).....	85
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de variância
AS: *Ammonium sulfate*
ATP:
BSA: Albumina sérica bovina
BSP's: Proteínas do plasma seminal bovino
BSP-30: Proteínas do plasma seminal bovino 30
BSP-A1: Proteínas do plasma seminal bovino A1
BSP-A2: Proteínas do plasma seminal bovino A2
BSP-A3: Proteínas do plasma seminal bovino A3
CASA: *Computerized Assisted Sperm Analysis*
CFDA: Diacetato de carboxifluoresceína
Da: Dálton
DM: *Dry matter*
DNA: Ácido desoxirribonucléico
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
FITC: Isoticianato
FPLC: *Fast performance liquid chromatography*
g: gramas
HO: Hiposmótico
INRA 82: *Institut National de La Recherche Agronomique* (Instituto Nacional de Pesquisas Agronômicas da França)
IP: Iodeto de propídio
JC -1:
KDa: Kilodáltons
L: Liofilizada
LC: *Lipid content*
LBD: Lipoproteínas de baixa densidade
LDF-I: Fração de baixa densidade I
LDF-II: Fração de baixa densidade II
LDF-G1: Fração de baixa densidade granular 1
LDF-G2: Fração de baixa densidade granular 2
LDL: *Low-density lipoprotein*
M: Morfologia
M: Molar
mM: milimolar
mA: Miliampere
mg: miligramas
mL; mililitro
MITO: *Mito tracker Green FM*
MP: Motilidade progressiva
MT: Motilidade total
N: Natural
NaOH: hidróxido de sódio
nm: nanômetro
p/v: peso/volume

Pa: Água perdida na secagem
Paf: Peso da amostra fresca
Pas: Peso da amostra após a secagem
PBS: Tampão fosfato salina
PNA: *Peannut agglutinin*
PSA: *Pisum sativum agglutinin*
RNA: Ácido ribonucléico
ROS: Espécies oxigênio reativas
SA: Sulfato de amônio
SDS:
SDS-PAGE: Gel de poliacrilamida
SYBR-14:
TTR: Teste de termorresistência
V: Vigor
VLDL-II: *very low density lipoprotein-II*
X: Percentual de água perdida
xg: Gaus
ZP: Zona pelúcida
 α : alfa
 β : beta
 γ : gama
 μ g: micrograma
 μ l: microlitros

RESUMO

De todos os constituintes da gema do ovo, atribui-se às lipoproteínas de baixa densidade (LBD) o maior efeito crioprotetor durante o processo de congelamento dos espermatozoides. O objetivo deste trabalho foi testar se a LBD pode substituir a gema do ovo total no congelamento de espermatozoides caninos. Para isso, foram realizados quatro experimentos. No Experimento I foram testadas diferentes concentrações de sulfato de amônio utilizadas na extração da LBD da gema do ovo de galinha, segundo a técnica descrita por Moussa et al. (2002). No Experimento II foram testados meios diluidores, de centrifugação e de congelamento, e temperaturas de descongelamento para o uso em sistema computadorizado de congelamento de espermatozoides. No Experimento III testou-se a substituição da gema de ovo total do meio de congelamento pela LBD, nas formas natural e liofilizada, em diferentes concentrações. O último experimento avaliou a eficácia da associação da LBD aos crioprotetores glicerol, etileno glicol e dimetil formamida para o congelamento de espermatozoides canino. Pode-se concluir que a LBD extraída com 50% de sulfato de amônio, e adicionada ao meio Tris-cítrico, pode substituir a gema do ovo total na forma natural e nas concentrações de 9,64, 19,28 e 24,1mg, tanto em associação com o glicerol quanto com o etileno glicol.

Palavras-chave: Gema do ovo, lipoproteínas de baixa densidade, sêmen congelado, cão.

ABSTRACT

Among the components of the egg yolk, the low-density lipoproteins (LDL) are considered to have the best cryoprotectant effect when freezing sperm cells. The objective of the present study was to evaluate if LDL can substitute the hen's egg yolk on cryopreservation of canine spermatozoa. The study was divided in four experiments. The Experiment I was designed to test different concentrations of ammonium sulfate to extract LDL from hen's egg yolk, according to the technique of Moussa et al. (2002). The purposes of Experiment II were to elect extenders for centrifugation and freezing which adjusted best to a particular computerized cooling rate. Additionally several thawing temperatures were tested. The substitution of hen's egg yolk by different concentrations of LDL, in natural and lyophilized forms, was the aim of Experiment III. The last experiment was designed to test which association - glycerol, dimethylformamide or ethylene glycol with LDL would show better cryoprotectant effect on sperm cells. The conclusions were: 50% of ammonium sulfate concentration extracted best LDL; the substitution of hen's egg yolk in Tris-citric extender, by either 9.64, 19.28 or 24.1 mg of LDL in natural form showed to be effective to cryopreserve canine sperm cells; and the association of LDL with glycerol or ethylene glycol showed best results.

Key-words: Egg yolk, low-density lipoprotein, frozen semen, canine.

INTRODUÇÃO

Desde a década de 40, quando da descoberta do efeito benéfico da gema de ovo sobre a criopreservação de espermatozóides bovinos, o uso deste componente em meios de preservação espermática tem sido amplamente realizado nas espécies domésticas. A interação entre o meio diluidor e a célula é um fator crucial, pois pode afetar a integridade da membrana e a habilidade fecundante dos espermatozóides. A adição da gema do ovo aos meios diluidores tem mostrado aumento dessa habilidade e capacidade em proteger os espermatozóides contra os danos causados pelo resfriamento e congelamento.

Atualmente as pesquisas têm se dedicado a entender o mecanismo de proteção exercido pela gema de ovo, bem como descobrir qual é o componente responsável por esse processo, mas ainda pouco se sabe sobre o assunto. Dentre esses componentes, as lipoproteínas de baixa densidade, primeiramente isoladas por Mayer & Lasley em 1945, têm sido apontadas como as responsáveis pelo efeito crioprotetor da gema de ovo (Watson, 1981a).

Porém, a criopreservação bem sucedida depende da interação de diversos fatores, como da qualidade do sêmen utilizado, da adição de diluidores e dos protetores de resfriamento empregados, do tempo de equilíbrio e das taxas de congelamento e descongelamento (Holt, 2000a). Ainda não foi possível padronizar a técnica de congelamento do sêmen canino, devido aos problemas de variação individual e entre raças. Por isso, vários protocolos têm sido formulados, variando quanto ao meio diluidor, aos agentes crioprotetores e ao método de congelamento, seja por vapor de nitrogênio, seja utilizando máquina de congelamento (Eilts, 2005).

A criação de cães de raça tem se tornado uma atividade econômica cada vez mais rentável no Brasil, sendo este processo impulsionado pelo advento das técnicas de

resfriamento e congelamento de sêmen. Apesar de apresentar baixa taxa de fertilidade na inseminação artificial, quando comparado com sêmen fresco e resfriado, o sêmen congelado tem um papel importante na disseminação de genes superiores e na preservação destes por longos períodos. Além disso, o aprimoramento dessa técnica no cão serve como base para seu emprego em carnívoros silvestres, como método importante de preservação do material genético de animais ameaçados de extinção.

Com base nestas questões, o presente trabalho tem como objetivo testar a hipótese de que as lipoproteínas de baixa densidade podem substituir a gema de ovo total adicionada aos meios de congelamento do sêmen canino. Para isso, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Extrair as lipoproteínas de baixa densidade segundo a técnica descrita por Moussa et al. (2002), avaliando características qualitativas e quantitativas, como perfil eletroforético em SDS-PAGE, teor de matéria seca, lípidos e de proteínas;
- Identificar o meio de centrifugação mais eficiente na preservação dos espermatozóides caninos durante o processo de centrifugação;
- Identificar o meio diluidor mais eficiente no congelamento do sêmen em máquina computadorizada, capaz de realizar uma curva de $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de resfriamento e $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de congelamento, bem como a melhor temperatura de descongelamento;
- Testar diferentes concentrações protéicas de lipoproteínas de baixa densidade em meios de congelamento, em substituição à gema de ovo total, em duas formas de apresentação, natural e liofilizada;
- Avaliar a eficácia de diferentes crioprotetores, como etileno glicol e dimetil formamida, em meios contendo as lipoproteínas de baixa densidade.

Capítulo 1 – REVISÃO DE LITERATURA

1.1 - Criopreservação do sêmen

A criopreservação do sêmen é uma técnica de importância reconhecida, devido a sua grande contribuição ao desenvolvimento das práticas de reprodução assistida utilizadas mundialmente. Esta técnica já está bem padronizada e aplicada em rebanhos bovinos, ocupando um papel primário na disseminação de genes superiores. Nas demais espécies, apesar da falta de padronização, vários protocolos têm sido desenvolvidos a fim de se obter resultados semelhantes aos dessa espécie. Além disso, a criopreservação do sêmen é considerada uma técnica importante para a preservação e manutenção de material genético de espécies silvestres e selvagens, principalmente daquelas ameaçadas de extinção, além de ser empregada na preservação de espermatozoides humanos em programas de infertilidade (Farstad, 2000; Watson, 2000; Chakrabarty et al., 2007).

A técnica de criopreservação tem por objetivo reduzir a temperatura normal em que o espermatozoide se encontra, geralmente à temperatura fisiológica de 37-39°C, até temperaturas próximas de 0°C, inicialmente, para depois reduzir a temperatura até -196°C (Parks, 1997).

A criopreservação causa danos à membrana espermática em diferentes graus, podendo levar à perda irreversível da motilidade e redução drástica na capacidade fecundante dos espermatozoides. Este fato é comprovado pelas baixas taxas de concepção obtidas após inseminação com sêmen congelado de cão (Linde-Forsberg et al., 1999; Silva et al., 2003; De los Reyes, 2004).

No entanto, o congelamento de sêmen apresenta muitas vantagens, como a de possibilitar um melhor aproveitamento dos ejaculados de um mesmo reprodutor, facilitar a propagação deste material genético, preservar a sanidade do reprodutor, diminuir

custos e estresse com transporte dos animais e permitir a inseminação de fêmeas sem a presença do macho (Silva et al., 2002).

O protocolo de criopreservação envolve uma série de etapas, como diluição do sêmen com meios crioprotetores, resfriamento, congelamento e descongelamento, sendo que cada uma delas pode influenciar a estrutura e as funções espermáticas. Como estas etapas possuem interação entre si, a modificação em pelo menos uma delas pode modificar todo o resultado do protocolo utilizado, causando efeitos variáveis (Peña Martínez, 2000).

1.1.1 - Constituintes da membrana plasmática do espermatozoide

A membrana plasmática do espermatozoide é heterogênea e assimétrica, composta por cinco domínios principais: acrossomal, equatorial, basal, da peça intermediária e da peça principal e terminal. Essa diferença entre estes domínios influencia a função fisiológica de cada um, sendo passíveis de alterações antes e depois da ejaculação, como integração de lípidos, alteração no grau de saturação dos ácidos graxos e perda na concentração de colesterol (Parks e Graham, 1992; Aurich, 2005).

A estrutura da membrana plasmática do espermatozoide segue o modelo do mosaico fluido, composta por uma bicamada lipídica associada a proteínas integrais e periféricas, que formam uma barreira de permeabilidade seletiva (Amann e Graham, 1993).

Na superfície das proteínas encontram-se aderidas moléculas de lípidos e carboidratos, formando um verdadeiro glicocálice, com a função primordial de realizar a interação espermatozoide-ovócito. A porção lipídica é representada por glicolípides e fosfolípides, como fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletalona e esfingomiéline. Esses fosfolípides são formados por uma porção polar, denominada cabeça, e duas caudas apolares, sendo consideradas moléculas anfipáticas. Enquanto a cabeça é composta pelo glicerol, as caudas são formadas por cadeias de ácidos graxos,

que podem ser saturadas e insaturadas (Parks e Graham, 1992; Santos Júnior e Carvalho, 2001).

Dada a ausência de ligações químicas entre os diferentes componentes das biomembranas, estes possuem relativa liberdade e são livres para se mover no plano da bicamada. A fluidez é a capacidade de movimentação desses componentes, sendo importante para diminuir a rigidez das membranas e permitir a difusão de seus constituintes, o que influencia a atividade enzimática e o transporte de solutos. A fluidez pode ser afetada pela presença de insaturações, moléculas interpostas, como o colesterol, e pela temperatura (Amann e Pickett, 1987; Parks, 1997).

Com relação às cadeias de ácidos graxos, sabe-se que as insaturadas apresentam menor temperatura de transição, o que confere maior fluidez quando em baixas temperaturas. Já o colesterol atua estabilizando a membrana durante o resfriamento, reduzindo seu ponto de fusão e, conseqüentemente, retardando a passagem dos lípidos do estado líquido-cristalino para o estado de gel, caracterizado pela baixa movimentação dos constituintes da membrana, tornando-a rígida (Watson, 1981a; Amann e Pickett, 1987).

1.1.2 - Efeitos do choque térmico sobre a membrana espermática

A exposição do espermatozóide ao estresse físico e químico pode reduzir a habilidade fecundante para menos de 50%. Os efeitos negativos do resfriamento, congelamento e descongelamento são principalmente causados pela ocorrência da fase de transição dos lípidos da membrana espermática, pela formação de cristais de gelo intracelulares e pelas modificações na pressão osmótica, com subseqüente reorganização das estruturas moleculares que influenciam na integridade estrutural e funcional da membrana (De Leeuw et al., 1993; Chakrabarty et al., 2007).

A composição lipídica pode afetar a sobrevivência dos espermatozóides, sendo que

diferenças na composição dos ácidos graxos e nas concentrações de colesterol têm sido associadas à tolerância ao choque térmico. A alta razão ácidos graxos poliinsaturado/saturado, de 2,5 ou mais, e baixas concentrações de colesterol na membrana são características presentes nas espécies mais susceptíveis ao congelamento, como bovinos e ovinos. Já a razão ácidos graxos poliinsaturado/saturado próxima a 1,0 e com altas concentrações de colesterol explicam a resistência espermática ao congelamento em humanos e caninos. Estas diferenças, porém, também são observadas entre indivíduos de diferentes raças, bem como dentro da mesma raça (Watson, 1981a; Peña, 1997; Waterhouse et al., 2006).

Durante o resfriamento, os lípidos da membrana passam pela fase de transição, caracterizada pela reorganização das cadeias hidrocarbonadas, modificando o estado líquido-cristalino da membrana para o de gel. Neste processo, ocorre um aumento excessivo da peroxidação lipídica, que contribui para aumentar os danos celulares, resultando na perda da motilidade e da capacidade fertilizante do sêmen, bem como no aumento da permeabilidade celular (Parks, 1997; Aurich, 2005).

O aumento da permeabilidade celular é outro fato decorrente da criopreservação. Devido ao rearranjo anormal das proteínas integrais, estas passam a permitir o transporte rápido de substâncias e a perda de numerosos componentes de membrana e intracelulares, como ATP, ácidos nucleicos, fosfolípidos, enzimas, potássio e magnésio, e diminui a capacidade de regular a concentração de cálcio intracelular. O choque também prejudica a glicólise anaeróbica e o metabolismo aeróbico, limitando a capacidade do espermatozóide de gerar ATP, necessário para motilidade e outras funções celulares (Watson, 1995; Parks, 1997).

As proteínas que estão associadas à classe de lípidos se agregam e param de exercer sua função, por haver interrupção das interações entre essas moléculas. Durante o descongelamento, a categoria de lípidos de um

microdomínio, sem preferência pela organização em bicamada, pode não voltar a se associar à proteína, mas se agregar na fase hexagonal-II (Parks e Graham, 1992; Amann e Graham, 1993; Zúccari, 1998).

1.2 – Atualidades sobre o congelamento do sêmen canino: fatores que influenciam sua fertilidade

Apesar da primeira inseminação artificial ter sido realizada em cães, por Lazaro Spallanzani em 1788, esta não foi a espécie de escolha para o seu aprimoramento. Nos últimos 20 anos, os criadores de cães têm experimentado um inesperado interesse pela inseminação artificial e pelas técnicas de preservação de sêmen. O interesse pelo congelamento aumentou principalmente por dois motivos: o início do comércio internacional e o estabelecimento de bancos genéticos de reprodutores de alto valor zootécnico (De los Reyes, 2004; Peña et al., 2006).

Causas multifatoriais influenciam o sucesso do congelamento, como os efeitos do processo sobre os espermatozoides, o efeito indireto da fêmea, o protocolo de inseminação estabelecido, além das dificuldades existentes no próprio método de congelamento, que são altamente influenciáveis pela variação existente entre cães de diferentes raças e entre indivíduos (Cardoso et al., 2005; Graham e Moce, 2005).

O conhecimento das particularidades relacionadas à fisiologia reprodutiva do cão é importante para minimizar os efeitos do ejaculado sobre o congelamento. Características inerentes a ele, como a presença da próstata como única glândula sexual acessória e a liberação do ejaculado em frações, influenciam no protocolo de coleta e a qualidade do sêmen congelado, ao considerar que o plasma seminal atua negativamente sobre o espermatozoide durante o congelamento (England e Allen, 1992; Rota et al., 1995).

A próstata é responsável pela produção do plasma seminal, que fornece um ambiente

propício para a sobrevivência e a motilidade dos espermatozoides durante a ejaculação. A liberação do seu líquido ocorre em duas etapas, que correspondem à primeira e terceira frações do ejaculado (Di Santis, 2003).

A primeira fração ou pré-espermática, apresenta aspecto aquoso, pH entre 6,2 a 6,5 e volume entre 0,5 a 2,0mL, enquanto que a terceira fração apresenta pH entre 6,5 a 7,0 e um volume médio de $6,48 \pm 4,32$ mL. Já a segunda fração, rica em espermatozoides, apresenta aspecto de cremoso a aquoso, coloração de branco opalescente ao marfim, pH entre 6,3 e 6,6 e volume entre 0,3 a 3,5mL (Johnston et al., 2001; Cunha, 2002).

A função fisiológica das frações pré e pós-espermáticas permanecem desconhecidas, mas apresentam efeitos na limpeza do canal uretral dos machos e de força mecânica na passagem dos espermatozoides pela cérvix, respectivamente (Cassani et al., 2005).

O método de coleta do sêmen canino empregado mundialmente é a manipulação digital, que pode ser realizado na presença ou não de fêmea em estro. O sêmen é facilmente coletado, principalmente em animais condicionados à coleta ou com experiência prévia de acasalamento. É importante que o local de coleta seja tranquilo, livre de distrações ou situações que causem ansiedade ao animal e com piso antiderrapante, sendo imprescindível evitar situações que gerem medo ou dor ao reprodutor, pois podem dificultar a coleta ou até traumatizar o animal (Silva et al., 2002; Kutzler, 2005).

Aconselha-se coletar o sêmen uma vez a cada 48 horas, não sendo interessante realizá-la em períodos inferiores a este ou realizar coletas diárias, devido a redução da concentração espermática depois de cinco a sete dias (England e Lofstedt, 2000). Preconiza-se eliminar as frações prostáticas do sêmen que será congelado, sendo que alguns autores recomendam realizar esta separação no momento da coleta, através da obtenção apenas da segunda fração, ou coleta-se as frações juntas, sendo separadas posteriormente por meio de centrifugação (Peña, 1997; Oliveira, 2003; Okano et al., 2004).

1.2.1 – Métodos de avaliação espermática *in vitro*

A decisão para qual finalidade servirá o sêmen, seja para inseminação artificial ou para criopreservação, irá depender, entre outros fatores, de certos parâmetros indicativos da qualidade do sêmen (Peña Martínez, 2004).

A avaliação padrão do sêmen fresco é, primariamente, baseada em parâmetros físicos. Contudo, há evidências de que tais parâmetros, isoladamente, não são suficientes para determinar um padrão de fertilidade de um ejaculado. Além disso, os indicadores de integridade física, rotineiramente utilizados na avaliação do sêmen, não são capazes de mensurar os complexos eventos físicos e bioquímicos que envolvem o processo de fertilização (Jeyendran et al., 1984; Cardoso et al., 2005).

Para isso, têm sido desenvolvidas técnicas, baseadas ou não nos métodos até então existentes, que tornem as análises espermáticas mais acuradas quanto a determinação da capacidade fertilizante do sêmen, direta ou indiretamente. Dentre as análises, são realizadas a avaliação da motilidade e morfologia espermáticas, integridade da membrana plasmática e acrossomal, atividade mitocondrial e funcionalidade da membrana espermática, teste de termorresistência e testes de interação entre gametas *in vitro*.

1.2.1.1 - Motilidade espermática

Apesar da motilidade ser somente um dos principais atributos de um espermatozóide fértil, este parâmetro continua sendo o primeiro e amplamente utilizado como indicador da função espermática. A motilidade é a manifestação da competência estrutural e funcional do espermatozóide, estando positivamente correlacionada com a integridade de membrana e morfologia normal (Peña Martínez, 2004).

Definida como a porcentagem de espermatozóides totais ou progressivamente móveis, esta pode ser analisada

subjetivamente, em microscópio de contraste de fase, ou através de análise computadorizada, que detecta informações precisas sobre a proporção de células móveis e a qualidade de seus movimentos. O sistema CASA (*Computerized Assisted Sperm Analysis*) tem sido amplamente utilizado na análise do sêmen fresco (Rigau et al., 2001), diluído (Schäfer-Somi e Aurich, 2007), resfriado (Ponglowhapan et al., 2004), congelado (Silva et al., 2006) e capacitado (Peña et al., 2003).

Martins-Bessa et al. (2006) compararam os métodos subjetivos e computadorizados para avaliação da motilidade espermática e encontraram alta correlação positiva entre os dois métodos. Isso mostra que, apesar do aumento da informação obtida por técnicas sofisticadas, testes rápidos e simples podem avaliar com segurança a viabilidade do sêmen, desde que seja feito por pessoas com experiência.

1.2.1.2 - Morfologia espermática, integridade de membrana e as técnicas de fluorescência

A morfologia espermática é a técnica que identifica a porcentagem de espermatozóides morfológicamente normais, sendo desejável valores acima de 80% em um ejaculado normal. A avaliação pode ser feita através de esfregaços úmidos, analisados em microscopia de contraste de fase após a fixação do material em solução salina tamponada, ou utilizando corantes, como Wright, Rosa de Bengala, Giemsa e eosina-negrosina. A classificação dos espermatozóides neste parâmetro pode variar de acordo com os autores (CBRA, 1998; Johnston et al., 2001; Cardoso et al., 2005).

A limitação da avaliação morfológica pela microscopia óptica permitiu o desenvolvimento de técnicas mais acuradas para a determinação da integridade das membranas plasmática e acrossomal do espermatozóide. A integridade de membrana tem sido considerada sinônimo de viabilidade espermática, já que para fecundar o ovócito o

espermatozóide tem que apresentar a membrana plasmática intacta e competente (Rijsselaere et al., 2005).

Durante a última década, métodos de avaliação espermática em cães com corantes fluorescentes têm sido utilizados para acessar funções espermáticas específicas. As sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) em combinação com o iodeto de propídio (IP) têm sido utilizadas, baseado na permeabilidade do CFDA à membrana plasmática e na impermeabilidade do IP. O CFDA, um éster não fluorescente e apolar, é hidrolisado por esterases não específicas no interior da célula, resultando na formação de 6-carboxifluoresceína, composto impermeável à membrana plasmática que emite fluorescência verde nos compartimentos celulares onde há integridade de membrana. Já o IP, corante de forte afinidade por ácidos nucleicos, apenas cora células com membrana plasmática lesada, dando à mesma coloração vermelho fluorescente (Harrison e Vickers, 1990).

Posteriormente vieram outras sondas fluorescentes, como o SYBR-14 em combinação com o IP, sendo o primeiro permeável à membrana plasmática, marcando o DNA da célula independente dela estar lesada ou não, sendo esta última identificada quando corada somente pelo SYBR-14 (Graham e Mocé, 2005). A vantagem em se utilizar essas duas combinações de fluorescências é poder avaliá-las na citometria de fluxo, que analisa grande número de células em um curto tempo (Rijsselaere et al., 2005).

A técnica de fluorescência também permite analisar várias características funcionais, como a integridade de membrana juntamente com a integridade acrossomal, ao combinar fluorocromos com sondas de isotiocianato (FITC) conjugada com lecitinas, como *Pisum Sativum Agglutinin* (PSA) e *Peannut Agglutinin* (PNA), que se ligam ao conteúdo acrossomal (Cross e Meizel, 1989). Outra associação de fluorocromos ocorre com a técnica do Mito Tracker Green FM (MITO), que avalia a integridade de membrana utilizando IP, danos acrossomais com o FITC-

PSA, e a atividade das membranas mitocondriais, determinada pelo MITO (Celeghini et al., 2004). A avaliação mitocondrial também pode ser acessada separadamente, utilizando Rodamina 123 e o JC-1, que permite a identificação de mitocôndrias afuncionais e funcionais, além de identificar o grau de funcionalidade (Gravance et al., 2000; Graham e Mocé, 2005).

1.2.1.3 - Teste hiposmótico

A avaliação da integridade funcional da membrana plasmática pode ser utilizada como indicador da capacidade de fertilização dos espermatozoides. Este teste se baseia no comportamento do espermatozóide quando submetido a um meio hiposmótico. Para equilibrar o meio intra e extracelular, ocorre influxo de água através da membrana provocando edema, principalmente na região da cauda, resultando no seu enrolamento. Essa alteração é facilmente visualizada em microscópio de contraste de fase (Jeyendran et al., 1984; Kumi-Diaka, 1993; Tartaglione e Ritta, 2004).

1.2.1.4 - Teste de termorresistência (TTR)

A avaliação da longevidade espermática *in vitro* pode ser feita pelo TTR. Apesar do sêmen canino apresentar baixa termorresistência pós-descongelamento quando comparado a outras espécies, Ström et al. (1997) observaram que o espermatozóide canino, mesmo com baixa termorresistência, não tem necessariamente um baixo potencial fecundante. Devido aos resultados divergentes a respeito de uma possível correlação entre TTR e a fertilidade canina, ainda não é possível sugerir a aplicação deste teste como um parâmetro confiável na avaliação do sêmen canino (Cardoso et al., 2005).

1.2.1.5 - Interação entre gametas *in vitro*

A ligação do espermatozóide à zona pelúcida (ZP) é um passo crucial para a fertilização. Teste *in vitro* para investigar a

habilidade ligante dos espermatozoides à ZP homóloga pode ser útil na predição da capacidade fecundante, podendo discriminar reprodutores férteis de subférteis. Esta habilidade pode ser medida usando ovócitos homólogos intactos ou bisseccionados (hemizona). Este teste consome menos tempo do que a fertilização *in vitro*, visto que não há a necessidade de maturar o ovócito e somente a ligação e a penetração são avaliadas, e não o desenvolvimento embrionário (Peña Martínez, 2004; Silva et al., 2006). A ligação do espermatozoide na ZP e a penetração no ooplasma mostraram-se intimamente associadas à motilidade espermática, mas não se correlacionaram com a morfologia acrossomal (Hay et al., 1997; Cardoso et al., 2005).

1.2.2 – Pontos críticos no congelamento do sêmen canino

Um protocolo adequado de criopreservação de células espermáticas deve ser eficiente ao ponto de manter o potencial fertilizante das células que inclui, ao final de todo o processo, a manutenção da viabilidade para atingir o local da fertilização, a capacidade para concluir a capacitação e a reação acrossômica, que possibilitam a fecundação de um ovócito (Watson, 1995).

Para obter altos índices de viabilidade e fertilidade no sêmen congelado, é preciso estabelecer bem o protocolo de congelamento a ser seguido, conhecendo seus possíveis pontos críticos com o intuito de melhorar cada etapa de processamento, sempre embasado na literatura. Dentre estas, consideram-se as etapas de centrifugação, resfriamento e congelamento, descongelamento e os componentes do meio diluidor a ser utilizado.

1.2.2.1 – Método de centrifugação

A centrifugação é o processo proposto na literatura para a padronização do volume e da concentração espermática dos ejaculados de cães. Este procedimento permite obter uma fração altamente concentrada em

espermatozoides, além de eliminar o líquido prostático, que não contribui na preservação da viabilidade espermática durante o processo de congelamento (Amann e Pickett, 1987; Rota et al., 1995).

Vários autores têm utilizado a centrifugação nos protocolos de congelamento (Peña et al., 1998; Hermansson e Linde-Forsberg, 2002), apesar de terem sido detectados danos aos espermatozoides como redução da motilidade, lesão de membrana plasmática e alteração do *status* acrossomal, todos com potencial de reduzir a capacidade fecundante (Rijsselaere et al., 2002).

Para minimizar os efeitos da centrifugação, recomenda-se o uso de pré-diluidores, velocidade e tempo adequados, capazes de garantir boa proteção à célula espermática durante este processo. Diferentes velocidades e tempos são utilizados, variando de 300xg por cinco minutos (Santos et al., 2001) a 800xg por 15 minutos (Cunha e Lopes, 1999), sendo ideal um curto período de tempo com velocidade moderada, que permita a formação de sedimento sem causar lesões sérias aos espermatozoides (Rijsselaere et al., 2002). Cunha (2002), estudando o efeito da centrifugação sobre a qualidade do sêmen canino, observou que não houve alterações no movimento espermático e na integridade das membranas após centrifugação a 800xg por cinco minutos. Rijsselaere et al. (2002) recomendam a centrifugação a 720xg por cinco minutos, removendo, assim, o líquido prostático sem causar danos aos espermatozoides e com reduzida perda de células no sobrenadante.

1.2.2.2 – Protocolo de resfriamento e congelamento

Para que o espermatozoide consiga adquirir resistência ao choque térmico, protocolos de congelamento têm sido desenvolvidos com o intuito de permitir melhor interação dos espermatozoides com os componentes do meio diluidor, variando de acordo com o tipo de meio, o crioprotetor utilizado e sua concentração (England, 1993;

Watson, 1995; Bueno et al., 2001b; Thirumala et al., 2003).

Para o sêmen canino diluído, sugere-se um período de uma a duas horas para a queda da temperatura de 37°C a 4°C, seguida de um período de equilíbrio de uma ou duas horas (Silva e Verstegen, 1995; Oliveira, 2003). Olar et al. (1989) observaram que a taxa de congelamento moderada (5°C/min, de 5°C a -15°C e -20°C/min, de -15°C a -100°C) foi superior à rápida (-75°C/min) e à lenta (-2°C/min de 5°C a -15°C e -10°C/min, de -15°C a -100°C). Bouchard et al. (1990) verificaram que taxas de resfriamento menores que -0,3°C/min causam danos ao espermatozóide canino, enquanto que Hay et al. (1997) sugeriram uma taxa ótima de congelamento de -30°C/min.

Essas curvas de congelamento sempre foram realizadas expondo o sêmen ao vapor de nitrogênio, em caixa de isopor, e depois o imergindo no nitrogênio líquido e o estocando em botijão de nitrogênio. Porém, a altura das palhetas e o tempo de exposição ao vapor de nitrogênio variam entre protocolos, sendo que o tempo ótimo de congelamento ainda não foi estabelecido (Rota et al. 1997; Nöthling e Shuttleworth, 2005; Hori et al., 2006).

Atualmente, outros métodos de congelamento e armazenamento têm sido testados (Eilts, 2005). O uso de máquinas de congelamento tem obtido resultados melhores que aqueles congelados em caixas de isopor (Oliveira, 2003; Schäfer-Somi et al., 2006). Recentemente, foi descoberto que espermatozoides caninos podem ser congelados depois de 2-3 dias de estocagem a 4°C, sem diminuição significativa da qualidade espermática, quando comparado com o sêmen congelado imediatamente depois da coleta (Hermasson e Linde-Forsberg, 2002). Álamo et al. (2005), comparando o congelamento e estocagem do sêmen canino em nitrogênio líquido e em freezer de ultra-baixa temperatura (-152°C) por quatro meses, obtiveram bons resultados com esta nova técnica.

1.2.2.3 – Temperatura de descongelamento

Freqüentemente, esquece-se de que o descongelamento influencia a taxa de sobrevivência, pois as células sofrem novamente modificações no seu volume e formações de cristais de gelo maiores, causando a ruptura celular. Isto vai depender da velocidade de congelamento, que está relacionada com a taxa de descongelamento. Células congeladas rapidamente podem conter pequenos cristais de gelo que, se o descongelamento for realizado também rapidamente, geralmente não implica em morte celular. Porém, se o descongelamento for muito lento, pode ocorrer a reorganização dos cristais de gelo, aumentando seu tamanho e lesionando as células. Por isso, estipulou-se que a velocidade de congelamento e descongelamento deve ser a mesma (Holt, 2000a; Eilts, 2005; Peña et al., 2006).

Pesquisadores adotam várias temperaturas de descongelamento em seus protocolos de congelamento do sêmen canino. O descongelamento rápido, 70 a 75°C por seis a oito segundos ou 55°C por 30 segundos, foi citado por Rota et al. (1998) e Hermansson e Linde-Forsberg (2002). Peña Martínez (2000) considera que a temperatura de 70°C por oito segundos melhorou os resultados de fertilidade para o sêmen canino. Em seu experimento, a autora sugere que o descongelamento a 37°C por 15 segundos pode expor as membranas espermáticas a variações de temperatura que induzem à reorganização de lípidos ou a movimentação de proteínas, quando comparado com 70°C por oito segundos. Já o descongelamento lento, de 37°C por 15 a 60 segundos, foi utilizado por Penã e Linde-Forsberg (2000a), Yildiz et al. (2000), Bueno et al. (2001a) e Oliveira (2003). Temperaturas superiores a 80°C não incrementam a motilidade de espermatozoides caninos após o descongelamento, quando comparada à temperatura de 70°C (Nöthling et al., 2007).

1.2.2.4 – Componentes do meio diluidor para congelamento

Os meios diluidores utilizados na criopreservação de células devem conter nutrientes para o metabolismo espermático, servir como tampão para ajuste das alterações do pH, promover pressão osmótica e concentração de eletrólitos dentro dos padrões fisiológicos, além de prevenir o crescimento bacteriano (Concannon e Battista, 1989).

Vários diluidores têm sido utilizados no congelamento do sêmen canino, contendo, geralmente, glicose ou frutose. Estes funcionam como reserva energética e substituem eletrólitos, mantendo o equilíbrio osmótico do diluidor (Peña et al., 1999; Yildiz et al., 2000; Bueno et al., 2001a; Stornelli et al., 2002). Rigau et al. (2001) citam que espermatozoides caninos incubados em meio contendo frutose apresentam um padrão de motilidade mais rápido e linear quando comparados àqueles incubados em meio com glicose. Porém, estudos têm mostrado que dissacarídeos, como a lactose, apresentam maior eficácia na preservação da integridade estrutural e funcional da membrana criopreservada, quando comparados com monossacarídeos (Chirinéa et al., 2003). Oliveira et al. (2003), comparando diluidores a base de Tris-gema e Lactose-gema com 5% de etileno glicol, verificaram ação superior do meio contendo lactose na criopreservação de espermatozoides caninos.

O meio básico INRA 82, modificado por Palmer (1984) tem sido utilizado em eqüinos, obtendo-se resultados satisfatórios na preservação de células espermáticas resfriadas e congeladas (Vidament et al., 2001; Rota et al., 2004). Em cães, Oliveira et al. (2005) encontraram bons resultados utilizando o INRA 82 no congelamento do sêmen canino em máquina de congelamento programada.

Um agente crioprotetor deve possuir baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e baixa toxicidade, sendo essencial para a sobrevivência das células espermáticas durante o processo de congelamento. Efeitos indesejáveis dependem

da concentração utilizada e do período de exposição da célula ao mesmo, podendo causar perda da viabilidade espermática de mais de 50% ao descongelamento (Oliveira, 2003).

No início, os crioprotetores permeantes aumentam a hipertonicidade do meio extracelular, causando o efluxo de água e um encolhimento das células espermáticas. Porém, a célula logo volta ao seu tamanho normal, devido a passagem dos crioprotetores para o interior da célula, equilibrando osmoticamente o ambiente. Em temperaturas abaixo do ponto de congelamento, ocorre nova saída de água com formação de cristais de gelo extracelular, causando aumento da concentração de solutos no local. A água intracelular se torna super resfriada e um novo ambiente osmótico é estabelecido, resultando em nova perda de água pelo espermatozoide. Dependendo da velocidade de congelamento, cristais de gelo podem ser formados dentro da célula, causando lesões de membrana (Gilmore et al., 1998; Watson, 2000; Eilts, 2005).

Crioprotetores permeantes atuam por meio de suas propriedades coligativas, diminuindo o ponto crioscópico intracelular. Dentre eles, o glicerol está presente na maioria dos protocolos de congelamento de sêmen canino, em concentrações que variam entre 2 a 8% (Peña et al., 1998; Rota et al., 1998). Este álcool polihídrico é altamente permeável, porém apresenta efeito deletério sobre a fertilidade do sêmen, o que estimula o estudo de crioprotetores alternativos (Watson, 1995; Medeiros et al., 2002; Rota et al., 2006).

O etileno glicol é um diálcool orgânico, líquido à temperatura ambiente, não volátil e incolor. É completamente miscível em água e é classificado como crioprotetor permeante, com peso molecular inferior ao do glicerol. Ele tem se mostrado uma ótima alternativa no tratamento de embriões de mamíferos e em espermatozoides caninos. Devido ao seu alto coeficiente de solubilidade, os danos causados pela desidratação e rehidratação durante o processo de congelamento e descongelamento são amenizados (Vannucchi et al., 1999; Baudot e Odagescu, 2004).

Os componentes do grupo amida, tais como formamida, acetamida e lactamida, também têm sido testados em diferentes espécies, obtendo-se bons resultados. Hanada e Nagase (1980), estudando o efeito das amidas no congelamento do sêmen de coelhos, verificaram motilidade pós-descongelamento maior em amostras que continham acetamida ou lactamida. Snoeck (2003) obteve bons resultados ao congelar sêmen equino utilizando acetamida associada a trealose e metilcelulose, similares aos encontrados para glicerol ou etileno glicol. Medeiros et al. (2002), ao testar o efeito das amidas na criopreservação do sêmen equino, verificaram que a adição do grupo *metil* às moléculas de acetamida e formamida melhorou o efeito crioprotetor das mesmas. Squires et al. (2004) verificaram que a metil formamida e a dimetil formamida protegeram melhor espermatozoides equinos congelados, quando comparados com acetamida ou formamida. Oliveira et al. (2003) verificaram que dimetil formamida a 5% protegeu satisfatoriamente as células espermáticas caninas submetidas ao congelamento. No entanto, o uso deste crioprotetor para a célula espermática canina ainda é muito restrito, necessitando-se de maiores estudos para estabelecer o real potencial crioprotetor desta base molecular.

A gema do ovo de galinha tem sido utilizada no congelamento de sêmen dos mamíferos por ser capaz de proteger as células espermáticas do choque térmico. Para o congelamento do sêmen canino, vários autores relataram que a concentração de 20% de gema no meio apresentou melhores resultados pós-descongelamento, quando comparado a 10% (Rota et al., 1997; Silva et al., 2000). Ecot et al. (2000) relataram que a concentração ideal da gema de ovo dependeria do crioprotetor permeante utilizado e das concentrações do mesmo.

1.3 - A gema do ovo e as lipoproteínas de baixa densidade

O ovo da ave é um dos representantes mais significativos dos ovos panlécitos,

aqueles que possuem grande quantidade de vitelo. Há uma segregação bem demarcada entre citoplasma e vitelo, que aparece como uma massa compacta no interior do ovo. O vitelo branco acumulado durante o crescimento ovocitário nutre o germe durante o seu desenvolvimento dentro do ovo. Antes da ovulação, há deposição do vitelo branco, composto principalmente por água e proteínas, como também do vitelo amarelo, rico em carotenóides e gorduras, que se alterna em círculos claros e escuros, de acordo com a luminosidade do dia. O ovo recém-depositado já possui casca, membranas da casca, albúmen (clara) e vitelo (gema) (Garcia e Fernández, 2001).

Como os tecidos animais, os ovos são formados pelas porções líquida, representada pela água, e sólida, composta de proteínas, gorduras, carboidratos e minerais (Romanoff e Romanoff, 1963). Esta composição é o resultado de um complexo processo biológico que envolve a síntese, transporte e deposição de substâncias e está intimamente relacionado com a produção da gema, já que esta não é totalmente formada no ovário. A composição varia de acordo com o passar do tempo de sua produção. Na fase inicial de produção, a gema nova contém principalmente gorduras neutras e pouco dos componentes da gema de ovo verdadeira. A fase intermediária caracteriza-se pela grande quantidade de proteínas e baixa quantidade de gorduras, enquanto a fase final, que caracteriza a gema do ovo verdadeira, apresenta alto conteúdo lipídico, que é depositado tardiamente, durante seu crescimento ativo (Kuksis, 1992; Burley et al., 1993).

1.3.1 – Constituintes da gema do ovo

A água da gema do ovo é oriunda do plasma sanguíneo, que entra no interior dele através de canais específicos ou durante a internalização de outros constituintes. As proteínas solúveis ou embebidas em lipoproteínas são derivadas das proteínas séricas maternas sintetizadas no fígado,

internalizadas pelos ovócitos em desenvolvimento, por via endocítica mediada por receptores, e parcialmente processadas. Já os lípides são oriundos da dieta, vindos diretamente dos alimentos ou indiretamente do metabolismo hepático de carboidratos e outros metabólitos. Seu transporte do sangue para a gema é promovido a partir das lipoproteínas sanguíneas. Os triglicérides e os fosfolípides constituem a principal fonte de energia e estrutura lipídica para o desenvolvimento embrionário (Burley et al., 1993; Jolivet et al., 2006).

O componente protéico da gema do ovo é composto principalmente por 68% de lipoproteínas de baixa densidade, 16% de lipoproteínas de alta densidade, 10% de livetinas e 4% de fosvitinas, localizadas em duas frações facilmente separáveis, os grânulos e o plasma (Jolivet et al., 2006; Sirvente et al., 2007). Desses componentes, o plasma corresponde a 78% da matéria seca da gema, enquanto que os grânulos representam 22%. Considerando-se os componentes químicos, a matéria seca da gema contém 33% de proteínas, 63% de lípides, divididos em triglicérides (43%), colesterol (2,6%) e fosfolípides (18%), sendo estes compostos por 16% de fosfatidilcolina e 2% de fosfatidiletalona (Anton e Gandemer, 1997).

Os grânulos são estruturas microscópicas, irregulares e insolúveis na gema. São constituídos de 70% de lipovitelininas, que correspondem às lipoproteínas de alta densidade, 16% de fosvitinas e 12% de lipoproteínas de baixa densidade. Eles representam 19-25% da matéria seca, 42-48% do conteúdo protéico e 15% dos fosfolípides da gema. A vitelogenina, uma lipoproteína sintetizada no fígado materno por estímulo estrogênico, sofre um processo enzimático durante sua passagem do plasma sanguíneo para o interior da gema, originando as lipovitelininas e as fosvitinas. A molécula de lipovitelinina é parecida com outras proteínas solúveis de formato globular, sendo uma mistura de dois componentes, α e β -lipovitelininas, que se diferem por seu teor de

fósforo (Aluko e Mine, 1998; Anton e Gandemer, 1999; Le Denmat et al., 2000).

Já as fosvitinas são fosfoglicoproteínas com 10% de fósforo em sua constituição e 5-6% de resíduos glicídicos. Também apresentam dois componentes, α e β , que se diferenciam pelo teor de fósforo em sua composição. Estes precipitados se juntam para formar os grânulos, sendo incorporadas pequenas quantidades de lipoproteínas de baixa densidade durante este processo. Os grânulos podem ser dissociados quando expostos a soluções hipersalinas, com alta força iônica ou alto pH (Itoh et al., 1983; Causeret et al., 1991; Burley et al., 1993; Dyer-Hurdon e Nnanna, 1993).

O plasma da gema contém proteínas solúveis, sendo separado dos grânulos através da centrifugação. Este é composto por 85% de lipoproteínas de baixa densidade e 15% de livetinas. As livetinas são proteínas que não estão intimamente associadas aos lípides, sendo de três tipos principais: α , β e γ -livetinas. Sua estrutura química é semelhante às proteínas do plasma sanguíneo, como albumina, α -2-glicoproteínas, transferrinas e γ -globulinas. Diferente de outras proteínas da gema, as livetinas não são produzidas por indução hormonal, sendo as α e β -livetinas produzidas no fígado e a γ -livetina na medula óssea. Existem receptores específicos no oolema que controlam a entrada dessas proteínas na gema (Kuksis, 1992; Burley et al., 1993; Nilsson et al., 2006).

Com relação às lipoproteínas, vários estudos mostram que a lipoproteína de muito baixa densidade é a principal fonte de colesterol e de outros lípides para os ovócitos. Sua produção no fígado aumenta consideravelmente durante a maturidade sexual da ave, devido a secreção de estrógeno. A lipoproteína de muito baixa densidade contém mais de 80% de massa lipídica, composta principalmente por espécies apolares, como ésteres de colesterol e triacilglicérides. As apoproteínas presentes estão representadas pelas apoproteínas-B e VLDL-II. A apoproteína-B, semelhante a apoproteína B-100 presente no plasma

sanguíneo humano, também se encontra na molécula da lipoproteína de baixa densidade, sendo a VLDL-II a responsável por garantir a especificidade dos receptores das lipoproteínas de muita baixa densidade (Evans e Burley, 1987; Jolivet et al., 2006).

Enquanto as lipoproteínas de alta densidade possuem 80% de proteínas na sua constituição contra 20% de lípidos, as lipoproteínas de baixa densidade são compostas por cerca de 11-17% de proteínas e 89% de lípidos, sendo estes divididos em triacilglicerol (69%), fosfolípidos (27%), colesterol e ésteres de colesterol (4%) (Anton e Gandemer, 1997; Sousa et al., 2007).

As lipoproteínas de baixa densidade apresentam-se como uma microemulsão biológica com importantes partículas envolvidas no transporte e no metabolismo de colesterol. São formadas por uma estrutura esférica de 17-60nm de diâmetro, apresentando um centro composto de triglicérides e ésteres de colesterol, rodeado por fosfolípidos e apoproteínas, sendo estas de pelo menos seis tipos diferentes. Cerca de 20% do peso total da partícula é atribuída a apoproteína B-100, que é responsável pelo reconhecimento das lipoproteínas de baixa densidade por receptores específicos e pelo controle do seu metabolismo (Reisinger e Atkinson, 1990). Como seus grupos hidrofílicos estão orientados para a superfície e os hidrofóbicos estão voltados para o interior, a lipoproteína de baixa densidade se mostra muito solúvel em água, apresentando densidade de 0,982g/mL (Evans et al., 1968; Martinet et al., 2003).

Anton et al. (2003) citaram que essas lipoproteínas, nas suas propriedades físicas e estruturais, possuem alta solubilidade e boa estabilidade, não demonstrando alterar sua estrutura em temperaturas extremas (-80 a 75°C).

Evans et al. (1968) verificaram que as proteínas presentes nas lipoproteínas de baixa densidade, com alto e baixo peso molecular, são as mesmas, variando apenas o conteúdo de triglicérides e fosfolípidos. O tamanho dessas lipoproteínas aumenta devido ao aumento de

lípidos no interior da molécula e pelo aumento de fosfolípidos entre as proteínas. A microscopia eletrônica suporta esta teoria, mostrando que há a existência de uma estrutura mosaica em sua superfície, onde lípidos e proteínas ocupam áreas distintas e não interagem fortemente juntas, sendo os fosfolípidos responsáveis pela estabilidade lipídica da molécula (Moussa et al., 2002; Martinet et al., 2003).

1.3.2 - Aplicações da gema do ovo e das lipoproteínas de baixa densidade

A gema do ovo possui proteínas de alto valor biológico, ácidos graxos essenciais, fosfolípidos e glicerol que apresentam aplicações industriais e biomédicas importantes, além de servirem como base para vários estudos físico-químicos. Ela é amplamente utilizada na indústria de alimentos por causa do sabor, da cor e da sensação que promove aos alimentos, além de suas propriedades funcionais, como emulsificação, coagulação e gelatinização, responsáveis pela estrutura e estabilidade de produtos como maioneses, cremes e molhos para saladas. Neste caso, as lipoproteínas de baixa densidade são consideradas os melhores estabilizadores de emulsão, quando comparadas com os grânulos e a livetina (Sirvente et al., 2007).

Na reprodução animal, a descoberta dos efeitos benéficos da gema de ovo sobre a fertilidade do sêmen diluído, em 1939 por Phillips, liderou o seu uso nos meios diluidores de bovinos. Em 1942, Lasley, Easley e Bogart observaram a capacidade da gema em proteger os espermatozoides contra o choque térmico. A descoberta de que o sêmen bovino poderia ser congelado com o glicerol, por Polge, Smith e Parkes em 1949, direcionou as pesquisas para o estudo das qualidades protetoras da gema de ovo (Pace e Grahman, 1974).

Desde então, a gema é largamente utilizada e aceita como um ingrediente essencial em diluidores empregados no congelamento do sêmen bovino, sendo

adotada nos protocolos de congelamento de outras espécies domésticas, como canina (Silva et al., 2000), eqüina (Vidament et al., 2001) e caprina (Dorado et al., 2007). O mecanismo pelo qual a gema protege os espermatozoides, no entanto, não foi elucidado. Vários estudos têm demonstrado que as lipoproteínas de baixa densidade são as responsáveis pela resistência contra o choque térmico, por promover aumento na motilidade espermática e na integridade da membrana plasmática e acrossomal dos espermatozoides (Manjunath et al., 2002; Bergeron e Manjunath, 2006; Jiang et al., 2007a).

1.3.3 - Estudo dos mecanismos de ação da gema do ovo e das lipoproteínas de baixa densidade na preservação espermática

O esclarecimento do papel de lípidos e proteínas presentes na lipoproteína de baixa densidade sobre a proteção da membrana espermática pode, indiretamente, evidenciar a natureza das mudanças de membrana que ocorrem durante o resfriamento e o congelamento (Watson, 1981a).

Para isso, fosfolípidos, fosfatidilcolina, frações lipoprotéicas e lipoproteínas específicas passaram a ser estudadas, a fim de se entender os mecanismos de crioproteção da gema. Em 1974, Pace e Graham tentaram purificar e estabelecer a fração da gema responsável pela proteção dos espermatozoides bovinos congelados. A partir de várias centrifugações e diálises, os pesquisadores conseguiram separar a gema em três frações, a granular, a fração solúvel crua e a fração de baixa densidade crua. Os resultados obtidos mostraram que o meio tampão sem gema usado no congelamento do sêmen, na presença ou não do glicerol, não foi capaz de manter a motilidade espermática, ao contrário de meios tamponados acrescidos de gema, na ausência do glicerol. Nenhum componente protetor foi encontrado nas frações solúvel crua e granular principalmente, diferente do observado na fração de baixa

densidade crua, que protegeu tão bem quanto a gema de ovo total (Pace e Graham, 1974).

A partir daí, várias hipóteses foram formuladas tentando esclarecer o possível mecanismo de ação das lipoproteínas de baixa densidade. A primeira delas é que essas lipoproteínas se associariam à membrana espermática, promovendo estabilização de seus constituintes durante a criopreservação (Bergeron e Manjunath, 2006).

Foulkes (1977), estudando a interação de componentes da gema com espermatozoides bovinos congelados, propôs que estes se ligariam firmemente às membranas espermáticas bovinas, exercendo papel protetor ao estabilizar a membrana durante o resfriamento ou ao conseguir manter a pressão coloidal do meio externo. Esta teoria foi reforçada por MacDonald e Foulkes (1981), ao investigar a interação das lipoproteínas de baixa densidade com espermatozoides bovinos e proteínas seminais, por meio de teste de fluorescência.

Porém, resultados de outros estudos causaram controvérsias em relação a essa hipótese, sugerindo que os fosfolípidos presentes nas lipoproteínas de baixa densidade protegeriam os espermatozoides pela formação de um filme protetor na superfície celular (Quinn et al., 1980) ou substituiriam fosfolípidos perdidos ou danificados da membrana espermática durante o congelamento (Foulkes et al., 1980; Graham e Foote, 1987).

Estudando o papel das lipoproteínas de baixa densidade sobre espermatozoides ovinos resfriados a 5°C, Watson (1981b) verificou que ocorre forte ligação entre a membrana espermática e as lipoproteínas, a partir de seus componentes protéicos. Cookson et al. (1984) afirmaram que essas ligações, em bovinos, são muito fortes, resistindo a mais de dez processos de lavagens, e que a remoção do conteúdo lipídico das lipoproteínas implicaria na redução de sua capacidade ligante com as membranas espermáticas.

Posteriormente, Parks et al. (1981), ao estudar os efeitos das lipoproteínas de baixa densidade sobre a concentração de colesterol e

fosfolípidos em espermatozoides bovinos congelados, verificaram que essas células congeladas em meios diluidores sem gema perdem moléculas de colesterol e fosfolípidos, em resposta ao choque térmico. Neste processo, a gema e as lipoproteínas de baixa densidade protegeriam os espermatozoides ao doar lipídeos para a membrana plasmática, contribuindo para a não alteração da razão colesterol/ fosfolípidos (Parks et al., 1981). A ligação de lipossomos de fosfatidilcolina foi verificada na membrana espermática de suínos, ao contrário do observado para fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol (Evans e Setchell, 1978).

Cookson et al. (1984), ao pesquisar a interação das lipoproteínas da gema com espermatozoides bovinos utilizando picos cromatográficos da fração lipoprotéica e imunohistoquímica, verificaram que há contenção de certas lipoproteínas firmemente ligadas à membrana espermática, existindo limite na ligação. Dos três picos cromatográficos obtidos, o terceiro se mostrou mais eficiente na ligação com o espermatozoide, assim como o verificado por Foulkes (1977) e Foulkes e Stewart (1977).

A ligação entre a fração lipoprotéica de baixa densidade com a membrana espermática, via ligação protéica, foi observada por Vishwanath et al. (1992). Estes autores afirmaram que a proteção contra o choque térmico está altamente relacionada à concentração de lipídeos na molécula, tornando-se fator determinante. Mas como a ligação ocorre primariamente via proteínas, estas com carga positiva apresentam grande capacidade de ligação com as proteínas de carga negativa da membrana espermática dos bovinos.

De Leeuw et al. (1993), avaliando o efeito de vários crioprotetores sobre a membrana de espermatozoides bovinos congelados, especularam várias hipóteses sobre o mecanismo de crioproteção por adição de lipídeos exógenos. Dentre elas, que os lipídeos poderiam se associar à superfície da membrana plasmática ou poderiam modificar a composição da membrana. Ao se associar à

membrana, os lipídeos exógenos mudam o momento da fase de transição, diminuindo a sensibilidade da membrana ao resfriamento.

Porém, Ricker et al. (2006), avaliando a fase de transição em espermatozoides eqüinos na ausência e presença de crioprotetores à base de lipídeos, verificaram que não há incorporação dessas substâncias na membrana espermática, devido ao comportamento independente destes com os lipídeos de membrana, durante a fase de transição. Eles sugerem que as fortes ligações dos lipídeos exógenos ocorrem apenas na superfície da membrana, o que promoveria uma barreira física aos danos do congelamento e descongelamento, prevenindo a fase de separação da membrana por influência do empacotamento.

A terceira hipótese seria de que as lipoproteínas parecem competir com peptídeos catiônicos do plasma seminal pela ligação com a membrana plasmática do espermatozoide, protegendo-o (Vishwanath et al., 1992). Estudos de Shannon e Curson (1983) e Shannon et al. (1987), citados por Vishwanath et al. (1992), observaram que peptídeos catiônicos do plasma seminal atuam fortemente sobre as proteínas da membrana espermática, desestabilizando-a, e sugeriram que substâncias catiônicas da gema do ovo e do leite desnatado poderiam proteger a membrana espermática bovina dessa ligação indesejada.

Este fato também foi verificado por um grupo de pesquisadores que observaram alta afinidade das lipoproteínas de baixa densidade às proteínas do plasma seminal bovino (BSP's), impedindo que estas se liguem ao espermatozoide, desencadeando os processos de capacitação e hipermotilidade espermática. Isso é importante porque o plasma seminal, que facilita o transporte do espermatozoide no trato genital feminino, também contém fatores que influenciam a motilidade e fertilidade, sendo deletérios ao sêmen estocado, por reduzir a viabilidade espermática (Killian et al., 1993; Thérien et al., 1998; Bergeron et al., 2004).

A principal fração protéica do plasma seminal bovino é representada pela família de proteínas designadas como proteína do plasma seminal (BSP)-A1, BSP-A2, BSP-A3 e BSP-30. Essas proteínas se ligam às fosfatidilcolinas da membrana plasmática no momento da ejaculação, potencializando o fenômeno de capacitação, o que desfavorece o congelamento. As BSPs induzem mudanças no fluxo de substâncias na membrana plasmática, estimulando a saída do colesterol e fosfolípidos, que é dependente do tempo e da concentração (Thérien et al., 1998; Manjunath e Thérien, 2002).

Manjunath et al. (2002), incubando uma quantidade constante de lipoproteínas de baixa densidade extraídas da gema do ovo com concentrações crescentes de proteínas seminais bovinas, verificaram que a capacidade de formação de ligações é dependente da concentração de proteínas, sendo que quanto maior a concentração de proteínas seminais, menor a ocorrência de ligações. O complexo BSPs-lipoproteínas de baixa densidade caracteriza-se pela rapidez, estabilidade, especificidade e ser dose-dependente. Essa interação pode ser benéfica para a proteção e estocagem dos espermatozoides no estado líquido e congelado (Bergeron et al., 2004; Bergeron e Manjunath, 2006).

Quanto aos testes para avaliar a substituição da gema de ovo pelas lipoproteínas de baixa densidade no congelamento do sêmen, vários estudos têm sido realizados, obtendo-se resultados satisfatórios. Moussa et al. (2002), testando diferentes concentrações dessas lipoproteínas em meios diluidores do sêmen bovino, verificaram melhores resultados com a concentração de lipoproteínas entre 5 e 10%, sendo a 8% mais apropriada. Em contrapartida, concentrações superiores a 10%, podem ser danosas ao espermatozoide, provavelmente devido ao aumento da pressão osmótica.

Amirat et al. (2005) avaliaram espermatozoides bovinos congelados em meios diluidores Biociphos[®], que contém

lecitina, Tris-cítrico com 8% (p/v) de lipoproteínas de baixa densidade e Tryladil[®], com 20% de gema de ovo. Os resultados obtidos mostraram grande capacidade das lipoproteínas em preservar a morfologia espermática, em comparação com os demais meios testados, sugerindo que elas oferecem melhor proteção na estocagem do sêmen bovino, podendo ser utilizada também para a preservação do sêmen fresco por períodos curtos.

Amirat et al. (2004) avaliaram a taxa de fertilidade *in vitro* com sêmen bovino congelado, ao comparar meio Tris-cítrico com 8% (p/v) de lipoproteínas de baixa densidade e o meio comercial Optidyl[®], que contém 20% de gema de ovo. O meio contendo as lipoproteínas apresentou maior taxa de clivagem embrionária que o meio controle e não alterou o desenvolvimento embrionário, apresentando taxa de blastocistos semelhante ao controle.

Jiang et al. (2007a), avaliando diferentes concentrações de lipoproteínas de baixa densidade em meios diluidores para o congelamento de espermatozoides suínos, obtiveram resultados que confirmaram o papel dessas lipoproteínas na preservação do DNA durante o procedimento.

Estes mesmos autores, agora avaliando a qualidade dos espermatozoides suínos congelados em meio Tris-glicose contendo concentrações de 6 a 10% (p/v), observaram que a concentração de 9% foi capaz de preservar a motilidade espermática, a integridade de membrana e de DNA, sugerindo, porém, que a determinação da concentração ótima de lipoproteínas a ser utilizada e seu mecanismo de ação ainda necessitam de maiores estudos (Jiang et al., 2007b).

São escassos os trabalhos utilizando as lipoproteínas de baixa densidade nas espécies eqüina e canina. Juliani et al. (2004), utilizando diferentes concentrações de lipoproteínas de baixa densidade no meio lactose-gema contendo 5% de glicerol ou dimetil formamida, verificaram melhores resultados na motilidade pós-descongelamento

do sêmen equino nos tratamentos contendo dimetil formamida adicionada a 10 ou 20% de lipoproteínas de baixa densidade.

Já em cão, Varela Júnior et al. (2004), resfriando sêmen canino em meio Tris-glicose contendo 6, 8 ou 10% (p/v) de lipoproteínas de baixa densidade, verificaram melhores resultados na motilidade, integridade de membrana e sobrevivência espermática a 5°C, quando comparado com meio contendo 20% de gema de ovo. Em sua dissertação de mestrado, este autor avaliou os mesmos tratamentos no congelamento, acrescentando 5% de glicerol, e obteve resultados superiores quanto à motilidade espermática, quando os comparou com o grupo controle, independente das concentrações utilizadas (Varela Júnior, 2005).

1.3.4 - Processos de extração e purificação das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo

A possibilidade existente de substituir a gema de ovo pelas lipoproteínas de baixa densidade é interessante para a técnica de preservação do sêmen, o que torna relevante a realização da sua extração. Como vantagens temos a padronização do componente que está sendo adicionado ao meio, já que existe variabilidade na composição da gema de acordo com a alimentação e a genética animal, a eliminação de componentes indesejáveis, que causam efeitos deletérios ao espermatozóide, e a eliminação do risco sanitário, ao considerar que a gema é um potencial carreador de patógenos (MacDonalds e Foulkes, 1981; Amirat et al., 2005; Jiang et al., 2007b).

A extração é o método de isolamento da substância de interesse, a partir da fonte bruta, que acontece antes do início do processo de purificação. Ela remove partículas-problema ou contaminantes, que geralmente não são compatíveis com as técnicas cromatográficas. Sua realização também permite estabelecer futuros métodos de purificação, mais eficientes, econômicos e capazes de garantir alta repetibilidade e rendimento. Neste

processo, geralmente utiliza-se a técnica de precipitação por adição de sais ou aditivos, quando há a necessidade de estabilizar o produto ou promover a extração (APB, 1999).

As técnicas existentes para extração dos componentes da gema basearam-se em procedimentos usados na obtenção das lipoproteínas de alta e baixa densidade do plasma sanguíneo, que ocorriam por ultracentrifugações, na presença de altas concentrações de sais inorgânicos, e purificadas por colunas cromatográficas de gel agarose (Margolis, 1967; Carroll e Rudel, 1983; Cordle et al., 1985; Vieira et al., 1996; Usui et al., 2000).

Os procedimentos descritos para a extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo envolvem processos de ultracentrifugação por gradientes de densidade, que consumiam longos períodos e apresentavam pequena taxa de recuperação, o que os tornou desinteressantes para uso industrial (Gornall e Kuksis, 1973; Pace e Graham, 1974; Bergeron et al., 2004).

Pela ultracentrifugação, Kuksis (1992) citou que são conseguidas quatro frações, a de baixa densidade (70%), a solúvel em água (8%), a de baixa densidade do grânulo (4%) e a fração de lipovitelina-fosvitina (18%). A fração de baixa densidade pode ainda ser dividida em duas frações: a LDF-I e LDF-II, ambas com grande quantidade lipídica (83-89%). A fração solúvel em água apresenta três tipos de proteínas: α (28%), β (43%) e γ -livetinas (29%), enquanto a terceira fração contém dois componentes lipoprotéicos, a LDF-G1 (23%) e a LDF-G2 (77%). A última fração apresenta 41% de α e 38% de β -lipovitelinas, além da fosvitina (21%) (Kuksis, 1992).

Moussa et al. (2002) propuseram uma técnica rápida, fácil, obtendo-se 97% de pureza e 67% de rendimento. Inicialmente, a gema tem que ser diluída em solução salina de baixa força iônica e, posteriormente, centrifugada em velocidade de 10.000xg, para que ocorra a separação do plasma e dos grânulos da gema. Após a centrifugação, o plasma da gema obtido tem que sofrer a

separação de seus constituintes, as livetinas e as lipoproteínas de baixa densidade, a partir da técnica de precipitação (Causeret et al., 1991; Anton et al., 2003; Nilsson et al., 2006).

Depois de obtida as lipoproteínas de baixa densidade da gema de ovo, esta fração total pode ser separada por análises cromatográficas utilizando diferentes métodos (Hillyard et al., 1980; Okazaki e Hara, 1989). Bengtsson et al. (1977) citado por Kuksis (1992) descreveram uma larga escala de fracionamento da fração de baixa densidade da gema do ovo pela filtração em gel, que produziu muitos componentes com pesos moleculares estimados entre 60.000 a 170.000Da. Moussa et al. (2002) utilizaram a coluna cromatográfica de filtração em gel com resina AcA 34 para confirmar a pureza das lipoproteínas obtidas por seu método de extração, obtendo sete diferentes pesos moleculares.

Eletroforese com gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) é amplamente utilizada para resolução analítica das lipoproteínas da gema do ovo, após sua extração e purificação em colunas cromatográficas (Causeret et al., 1991; Anton et al., 2003), bem como o método de Lowry, para realizar a quantificação da concentração de proteínas obtidas ao final do processo (Manjunath et al., 2002; Moussa et al., 2002).

As lipoproteínas mais testadas no congelamento do sêmen têm sido as recém-obtidas da extração com sulfato de amônio, podendo ser denominadas de naturais, seguido

das frações das lipoproteínas obtidas por métodos cromatográficos. Foulkes (1977) verificou que, ao obter três picos a partir das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo, a interação destes com os espermatozoides se comporta de forma diferente, sendo que espermatozoides bovinos apresentaram maior motilidade quando congelados na presença do terceiro pico. Manjunath et al. (2002) observaram que os picos 1 e 2, obtidos após a cromatografia, apresentaram alta afinidade com as BSP's, sem afirmar, no entanto, qual dos dois apresentou maior interação. Não foram encontrados trabalhos testando as várias frações de lipoproteínas de baixa densidade no congelamento de sêmen nas espécies equina, caprina, ovina e canina, nem trabalhos que tentassem separar os pesos moleculares dessas frações lipoprotéicas por outras técnicas cromatográficas, a fim de utilizá-las no congelamento de sêmen.

Até o presente momento não foram testadas as lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo na forma liofilizada. Liofilização é um método desenvolvido na Segunda Guerra Mundial para a estocagem de sangue, sendo atualmente utilizado na produção de vários produtos farmacêuticos. É o principal processo usado para produzir proteínas e polipeptídeos estáveis, que são fisicamente e quimicamente instáveis em soluções aquosas, além de ser o mais indicado nos casos em que substâncias são sensíveis ao calor (Boyer, 1986; Passot et al., 2005; Tang et al., 2006).

Capítulo 2: Experimento I

Avaliação do uso de diferentes concentrações de sulfato de amônio na técnica de extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de galinha

(Evaluation of ammonium sulfate concentrations used for low-density lipoproteins extraction of hen's egg yolk)

RESUMO

Foram testadas diferentes concentrações de sulfato de amônio no processo de extração das lipoproteínas de baixa densidade (LBD) da gema de ovo, com o objetivo de aumentar a eficiência da extração e obter um produto de qualidade para a aplicação no congelamento de sêmen. O conteúdo da gema foi processado segundo Moussa et al. (2002). O plasma da gema, obtido após duas centrifugações a 11.400xg por 45 minutos, foi dividido em cinco tratamentos, de acordo com a concentração de sulfato de amônio (SA) a ser avaliada, sendo os tratamentos I, II, III, IV e V, correspondentes às concentrações de 10%, 20%, 40%, 45% e 50%. A adição do SA foi feita a 4°C sob agitação, sendo as soluções posteriormente centrifugadas. Os sobrenadantes recuperados foram dialisados em água destilada por, no mínimo, 20h. Após a última centrifugação a 11.400xg/ 45min, recuperou-se a porção flutuante rica em LBD, que foi avaliada quanto ao teor de matéria seca, lípides (Método de Soxhlet), proteínas (Método de Lowry) e padrão eletroforético em SDS-PAGE. Os resultados foram submetidos à ANOVA, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. O teor médio de matéria seca foi 72, 61, 41, 44 e 39% de I a V, respectivamente, sendo o T V com menor valor ($p < 0,05$). A média do teor de lípides foi maior nos tratamentos II, III, IV e V (26,9; 27,1; 31,9 e 29,5%) ($p < 0,05$). A concentração média de proteínas foi menor no tratamento I ($p < 0,05$). A eletroforese mostrou aumento na purificação da LBD com o aumento de SA adicionado, sendo que o tratamento V se mostrou mais purificado. Conclui-se que a concentração de SA a 50% foi melhor na

técnica de extração das LBD da gema do ovo de galinha.

Palavras-chave: Gema do ovo, lipoproteínas de baixa densidade, sulfato de amônio, espermatozóide.

ABSTRACT

The aim of the present research was to evaluate the efficacy of using different ammonium sulfate concentrations to improve low-density lipoprotein (LDL) extraction of hen's egg yolk, to use on semen cryopreservation. Yolk was processed according to the method described by Moussa et al. (2002). The yolk plasma, after two centrifugations at 11400xg/45min., was divided into five treatments, according with the ammonium sulfate concentrations (AS). Treatments I, II, III, IV and V corresponded to concentrations of 10, 20, 40, 45 and 50%, of AS, respectively. The addition of AS was made at 4°C under continuous stirred and the solutions were centrifuged (11400xg/ 45min.). The supernatant was then dialysed at least for 20h. After centrifugation, a floating residue rich in LDL was collected and analysed by dry matter content, lipid content (LC) (Soxhlet method), protein concentration (Lowry's method) and SDS-PAGE. Variance analysis and Tukey test were used to compare means (5%). Dry matter content was 72, 61, 41, 44 and 39% from treatment I to V, respectively, and treatment V showed smaller mean of dry matter ($p < 0.05$). The means of LC was higher in treatments II, III, IV and V (26.9, 27.1, 31.9 and 29.5%) ($p < 0.05$). The treatment I showed smaller mean to protein concentration ($p < 0.05$). An electrophoresis showed an

increase of LDL purification with the increase AS, and group V showed better result. In conclusion, the 50% of ammonium sulfate was the best concentration to the extraction of LDL hen's egg yolk.

Key-words: Egg yolk, low-density lipoprotein, ammonium sulfate, spermatozoa.

2.1 – Introdução

A gema do ovo é uma importante fonte de lípidos de aplicação industrial e biomédica, sendo utilizada em larga escala. Particularmente na indústria, a gema é um ingrediente essencial no preparo de uma variedade de alimentos. Isto se deve às propriedades emulsificantes das lipoproteínas de baixa densidade, presentes no plasma da gema, que contribuem para a formação e estabilização de emulsões, como maionese e cremes (Anton e Gandemer, 1999; Le Denmat et al., 2000; Ghoshi e Coupland, 2008).

Na reprodução animal, a gema também é considerada essencial na preparação de meios diluidores empregados no resfriamento e congelamento do sêmen de várias espécies. Credita-se às lipoproteínas de baixa densidade a responsabilidade pelo efeito protetor da gema sobre a membrana espermática, que reduz os danos celulares causados pela estocagem a baixas temperaturas (Manjunath et al., 2002).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para isolar e estudar as proteínas da gema do ovo, envolvendo o fracionamento por solventes orgânicos, calor, pH e sais, que tendem a modificar a integridade estrutural de seus constituintes (McBee e Cotterill, 1979).

A técnica de ultracentrifugação por gradientes de densidade é demorada e apresenta baixo rendimento na produção, o que a torna desinteressante para o uso industrial. Moussa et al. (2002) propuseram uma técnica rápida e econômica para obtenção das lipoproteínas de baixa densidade, baseada na precipitação por sulfato de amônio a 40%. Esse produto é utilizado normalmente em procedimentos prévios à purificação de

proteínas, através de métodos cromatográficos. Sabe-se que a quantidade e a forma de adição do sulfato de amônio podem alterar o produto final obtido na técnica de extração, implicando em sua maior ou menor pureza, exigindo cuidados especiais nesta etapa do processo (Harris, 1992).

Para obter as lipoproteínas de baixa densidade a serem empregadas no congelamento do sêmen, o objetivo deste trabalho foi testar diferentes concentrações de sulfato de amônio, a partir do uso da técnica descrita por Moussa et al. (2002), no intuito de maximizar a extração das lipoproteínas, bem como caracterizar os produtos finais obtidos quanto ao teor de matéria seca, lípidos, proteínas e quanto ao perfil eletroforético (SDS-PAGE).

2.2 – Material e métodos

2.2.1- Matéria prima e obtenção da gema de ovo de galinha

Utilizaram-se ovos de galinha frescos oriundos de criatório particular, que foram higienizados com solução detergente e preparados para o processo de extração. A extração das lipoproteínas de baixa densidade foi baseada na técnica descrita por Moussa et al. (2002), com algumas alterações. O relatório da extração utilizado está demonstrado no Anexo 1.

Os ovos foram quebrados manualmente, separando a gema do albúmen. A gema foi cuidadosamente rolada em papel-filtro para remoção total da chalaza e dos restos de albúmen impregnados na membrana vitelina. Posteriormente, rompeu-se esta membrana, utilizando a ponta da seringa de plástico estéril de 10mL, e aspirou-se imediatamente seu conteúdo, identificando o volume obtido e depositando-o em um béquer.

2.2.2 – Obtenção do plasma da gema

Para a obtenção do plasma, a gema foi diluída, na proporção de 1:2, em solução salina (NaCl) 0,17M e homogeneizada por

uma hora em agitador magnético, sob refrigeração a 4°C. A solução foi centrifugada^a a 11.400xg por 45 minutos a 4°C. O *pellet*, denominado grânulo, foi descartado e o sobrenadante novamente centrifugado a 11.400xg por 45 minutos a 4°C (Fig. 2.1A). O sobrenadante obtido, que representa a porção do plasma da gema, teve seu pH mensurado^b e corrigido para 8,7 com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N. O volume final foi mensurado utilizando proveta graduada de vidro.

2.2.3 – Extração das lipoproteínas de baixa densidade

A partir do volume obtido após a correção do pH, foi calculada a quantidade de sulfato de amônio a ser adicionada a amostra, de acordo com os tratamentos: tratamento I (T I) solução de 10% de sulfato de amônio, tratamento II (T II) 20%, tratamento III (T III) 40% (Moussa et al., 2002) e tratamentos IV e V, adição de 45 e 50%, respectivamente. As soluções de sulfato de amônio adicionadas apresentavam-se na forma de solução saturada, sendo estas adicionadas lentamente ao plasma, por gotejamento, com o auxílio de bureta graduada, sob agitação constante e à temperatura de 4°C. A temperatura desejada foi obtida com gelo laminado acondicionado em caixa de isopor (Fig. 2.1B). Depois de adicionado o volume necessário da solução de sulfato de amônio, a mistura foi mantida em agitação e refrigeração a 4°C por mais uma hora, sendo posteriormente centrifugada a 11.400xg por 45 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi envasado em membrana de diálise^c e dialisado em água bidestilada por 20 horas, no mínimo (Fig. 2.1C), dependendo do tratamento. As trocas da água foram feitas de três em três horas. O conteúdo da membrana de diálise foi colocado em um béquer, distribuído igualmente em tubos de centrífuga e centrifugado a 11.400xg

por 45 minutos a 4°C. A porção flutuante contida no tubo de centrífuga, que corresponde a lipoproteína de baixa densidade (Fig. 2.1D), foi retirada cuidadosamente com uma pequena espátula, evitando a contaminação com a porção líquida, sob a porção flutuante. A estocagem das lipoproteínas foi feita em tubos de centrífuga a -20°C, até sua utilização. Foram realizadas, em média, três extrações por tratamento, sendo coletadas amostras de cada extração para realização das análises químicas.

2.2.4 – Análises químicas

Determinação do teor de matéria seca

Foi analisado o teor de matéria seca da gema e das amostras de lipoproteínas de baixa densidade, de acordo com o tratamento (Anexo 2). Os pesa-filtros foram identificados e pesados vazios com tampa em balança de precisão^d. Adicionou-se aos mesmos uma quantidade conhecida (mL) de cada amostra, pesando novamente o conjunto. O valor obtido foi subtraído ao valor do pesa-filtro vazio, obtendo o peso da amostra fresca (P_{af}). Os conjuntos foram colocados em uma bandeja de metal, com a tampa semi-aberta, e levados à estufa de secagem^e à temperatura de 104°C, permanecendo por 24 horas. Ao retirá-los da estufa, os pesa-filtros foram tampados e mantidos dentro de dessecadores até seu resfriamento total, quando foram novamente pesados em balança de precisão. O peso do conjunto pós-secagem foi subtraído pelo peso do pesa-filtro vazio, obtendo-se o peso da amostra após a secagem (P_{as}). A diminuição do P_{af} pelo P_{as} resulta no valor da água perdida na secagem (P_a), que foi aplicado à fórmula: $X = P_a \times 100 / P_{af}$, onde X é a porcentagem de água perdida. Subtraindo-se esse valor de 100, obteve-se a porcentagem de matéria seca da

^a Centrífuga: Beckman J2MC;

^b pHmetro: Digimed DMPH-2;

^c Spectra/ Por – Molecular porous membrane tubing; MNCO:12-14,000, diâmetro 29mm.

^d Balança de precisão 0,0001g da marca Metler E260;

^e Estufa de secagem modelo WTB Binder;

^f Centrífuga HT MCT2000;

^g Espectrofotômetro modelo Ultrospec III – Pharmacia Biotech LKB.

amostra. Foram feitas três análises por extração, de cada tratamento.

Determinação do teor de lípidos

A determinação do teor de lípidos presentes na gema do ovo e na lipoproteína de baixa densidade foi feita pelo método de Soxhlet, utilizando três réplicas de 3g por amostra obtida de cada extração e de cada tratamento. Os resultados finais foram expressos por porcentagem de lípidos na matéria fresca.

Dosagem de proteínas

O conteúdo protéico da gema e das lipoproteínas de baixa densidade foi determinado pelo método de Lowry (1951) (Anexo 3). Utilizou-se a albumina sérica bovina (BSA) como padrão, na concentração de 1mg/mL, que foi diluída, em duplicata, em diferentes concentrações. As amostras de gema e de lipoproteínas foram primeiramente diluídas em 1mL de PBS 0,01M dentro de *ependorfs*, misturadas em vórtex e centrifugadas^f a 10.000rpm por 10 minutos. Adicionou-se a cada tubo de ensaio 1mL de reagente de cobre, agitando o conteúdo imediatamente e vigorosamente, deixando-o em repouso por dez minutos. Posteriormente, adicionou-se 100µL de reagente de Fenol, agitando-se imediatamente e vigorosamente a solução, deixando-a em repouso por mais dez minutos até a leitura em espectrofotômetro^g, no comprimento de onda de 660nm. Foram realizadas três análises por amostra por tratamento, sendo os resultados expressos em mg/mL.

Purificação da lipoproteína de baixa densidade em cromatografia de filtração em gel

Realizou-se a técnica cromatográfica em *Fast Performance Liquid Chromatography* (FPLC) utilizando coluna de filtração em gel, modelo Sephacryl™ HR S100 16/60 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suécia),

contendo resina com poros de 1000-100000Da, volume total de 120mL. A coluna foi primeiramente equilibrada com o Tris 50mM, de acordo com Moussa et al. (2002). As lipoproteínas de baixa densidade extraídas a 50% de sulfato de amônio foram eluídas no mesmo tampão da coluna e aplicadas no volume de 2mL por corrida, com uma taxa de fluxo de 0,5mL/min. Os picos foram analisados por cromatógrafo^h e leitura em absorvância de 280nm. Os picos obtidos foram avaliados quanto ao perfil eletroforético.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As análises eletroforéticas de cada etapa de extração, bem como dos produtos obtidos foram feitas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Anexo 4).

O gel de poliacrilamida foi polimerizado entre duas placas de vidro de 16x12,5cm mantidas a uma distância de 0,75mm, por meio de espaçadores de plástico. Utilizou-se o gel de separação de 12,5% e o gel de concentração a 4%. As amostras foram diluídas, na proporção 1:2, em tampão de amostra 2X concentrado com redutor, fervidas a 100°C por cinco minutos e aplicadas nas canaletas do gel, na quantidade de 20µg. A corrida foi conduzida a 200mA e 500 volts por 50 minutos à temperatura ambiente, no aparelho Mini Protean II - BioRad. Em todas as eletroforeses utilizou-se padrão de peso molecularⁱ composto por proteínas recombinantes de 250KDa, 160KDa, 105KDa, 75KDa, 50KDa, 35KDa, 30KDa, 25KDa, 15KDa e 10KDa.

Após a corrida eletroforética, o gel de poliacrilamida foi mantido por uma hora em solução corante de Azul de Coomassie à temperatura ambiente, sob agitação (Anexo 5). Em seguida, o gel foi submerso em solução descorante de proteínas, sendo mantido à temperatura ambiente sob agitação por cinco

^h Cromatógrafo Amersham Pharmacia Biotech, modelo Akta Basic;

ⁱ Amersham Bioscience – RPN800V.

minutos, ocorrendo várias trocas até a visualização das bandas de proteínas. O gel obtido da cromatografia foi corado pelo método da prata (Anexo 6).

A determinação do peso molecular encontrado nas amostras avaliadas foi obtida através do programa Standard curves.

2.2.5 – Análise estatística

Os resultados obtidos nas análises químicas de teor de matéria seca, teor de lípidos e dosagem de proteínas foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Os resultados da eletroforese foram avaliados qualitativamente, sendo este parâmetro o mais importante para a determinação do melhor tratamento.

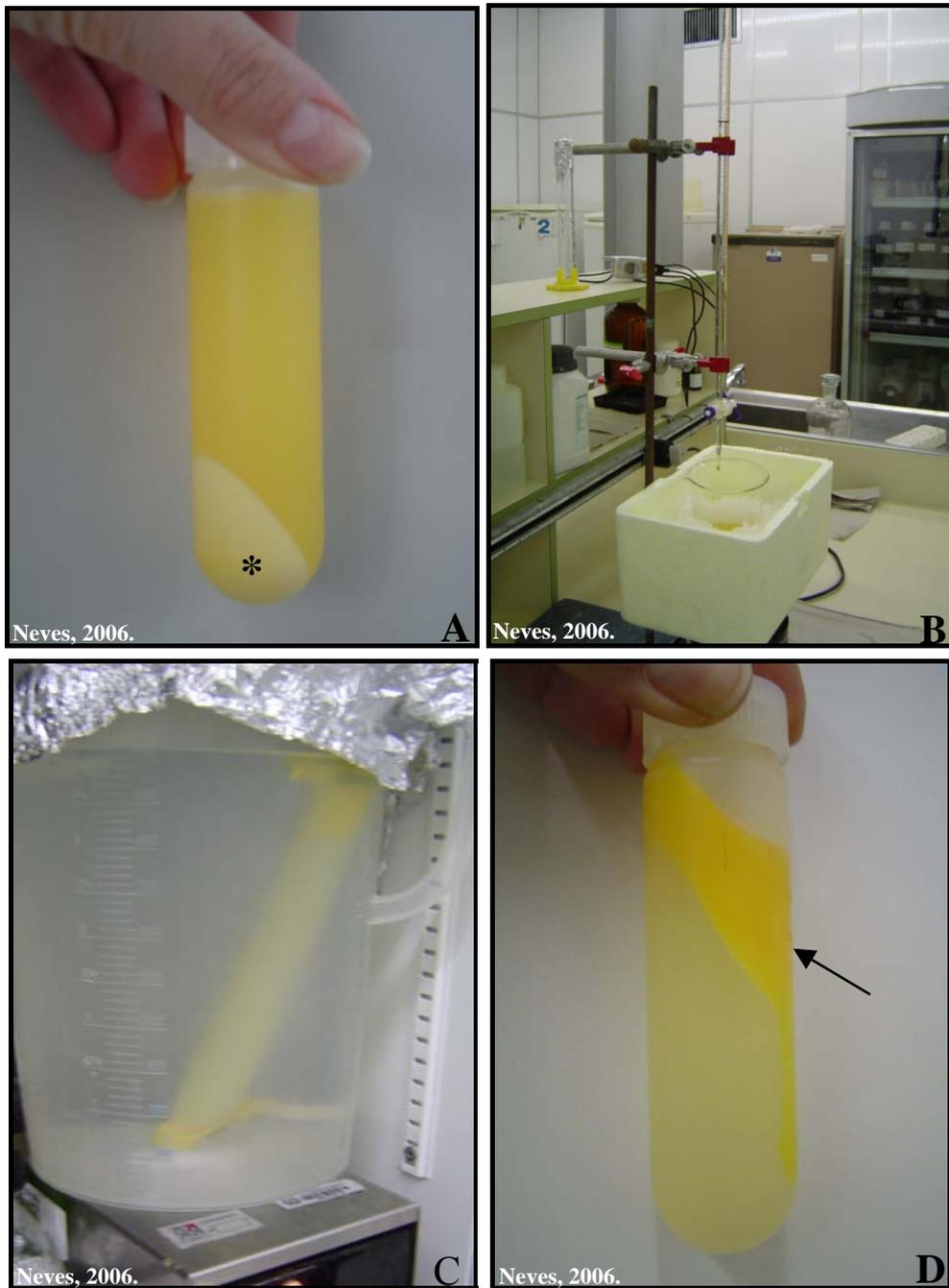


Figura 2.1 – Método de extração das lipoproteínas de baixa densidade (LBD), mostrando em A) a porção do grânulo da gema (*pellet*, *) obtida após primeira centrifugação da gema; B) a forma de adição da solução saturada de sulfato de amônio, na concentração de 40%; C) o plasma da gema acondicionado em membrana durante o processo de diálise; e D) a obtenção da fração da LBD (seta), após a última centrifugação.

2.3 – Resultados

Avaliando-se a técnica de extração das lipoproteínas de baixa densidade, a metodologia descrita por Moussa et al. (2002) e modificada no presente trabalho, quanto a velocidade da centrifugação e a forma de adição do sulfato de amônio, se mostrou rápida e de fácil aplicação. A etapa de separação do grânulo para obtenção do plasma foi eficiente, apresentando alta repetibilidade no seu resultado. A velocidade de centrifugação de 11.400xg não apresentou danos às amostras obtidas em cada etapa do processo, ao avaliar o perfil eletroforético. Com relação à adição da solução saturada de sulfato de amônio, esta se mostrou eficiente na realização da velocidade necessária para evitar a formação de precipitados. Gastou-se cerca de 20 a 30 minutos na sua adição, dependendo do tratamento.

Em todos os tratamentos, ao final da extração foram obtidas duas frações distintas, visualizadas no tubo de centrífuga: uma fração flutuante, de coloração amarelo-vivo e aspecto

pastoso, que representou a fração da lipoproteína de baixa densidade, e uma fração subnadante, líquida. Esta se mostrou amarelada túrbida nos tratamentos com 10 e 20% de sulfato de amônio e translúcida nos tratamentos com 40, 45 e 50%. A separação das duas é o momento mais crítico do processo, devido ao risco de contaminação da porção das lipoproteínas de baixa densidade na fração líquida, que é constituída apenas de água e alguns resíduos. A retirada das lipoproteínas de baixa densidade com espátula foi eficiente, evitando a contaminação das lipoproteínas com o líquido subnadante. As lipoproteínas de baixa densidade conservadas à temperatura de -20°C não apresentaram nenhuma alteração quanto a sua coloração e estrutura, após 30 dias de estocagem, avaliadas macroscopicamente e pelo perfil eletroforético.

Amostras da gema do ovo total e das lipoproteínas de baixa densidade, obtidas nas extrações de cada tratamento, foram avaliadas quanto ao teor de matéria seca, teor de lípidos e concentração de proteínas (Tab. 2.1).

Tabela 2.1 – Teor de matéria seca (%), lípidos (%) e proteína (mg/mL) da gema de ovo e das lipoproteínas de baixa densidade (LBD) extraídas da gema do ovo por precipitação com sulfato de amônio, nas concentrações de 10, 20, 40, 45 e 50% (N= média de três extrações/tratamento).

Análises	Gema	LBD:	10%	20%	40%	45%	50%
Matéria Seca	51±0,1 ^a		72±0,1 ^a	61±0,3 ^a	41±0,2 ^b	44±0,7 ^b	39±0,3 ^c
Lípidos	30,4±2,8 ^a		18,2±0,9 ^b	26,9±0,8 ^a	27,1±0,3 ^a	31,9±1,0 ^a	29,5±0,5 ^a
Proteínas	7,2±1,8 ^a		1,6±0,3 ^b	5,1±0,6 ^a	5,0±3,8 ^a	4,1±4,6 ^a	5,8±3,7 ^a

Média±desvio-padrão; ^{a, b} – Letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p<0,05$) pelo Teste de Tukey.

À medida em que se aumentou a concentração de solução saturada de sulfato de amônio, obteve-se diminuição significativa no teor de matéria seca, se aproximando da estabilização do seu conteúdo nos tratamentos com 40, 45 e 50% de sulfato de amônio. Porém, este último tratamento apresentou o menor teor médio de matéria seca. Houve uma maior média no teor de lípidos nas lipoproteínas de baixa densidade dos tratamentos contendo 20, 40, 45 e 50% de sulfato de amônio. O tratamento IV (45%) apresentou alta variabilidade na média de seus

resultados, devido ao efeito de uma das extrações feitas. Em relação à concentração de proteínas, não se observou variações uniformes no seu conteúdo com o aumento da precipitação, sendo que o tratamento com 10% de sulfato de amônio apresentou menor concentração protéica média.

O perfil eletroforético mostrou maior número de bandas nos tratamentos 10 e 20%, semelhante às encontradas na gema do ovo, devido a uma menor precipitação de substâncias. Os tratamentos contendo 40 e 50% de sulfato de amônio já apresentaram

bandas mais definidas que os demais (Fig. 2.2). Este último tratamento apresentou

menor número de bandas, sendo seus pesos moleculares de 15, 18, 30, 37, 45 e 149KDa.

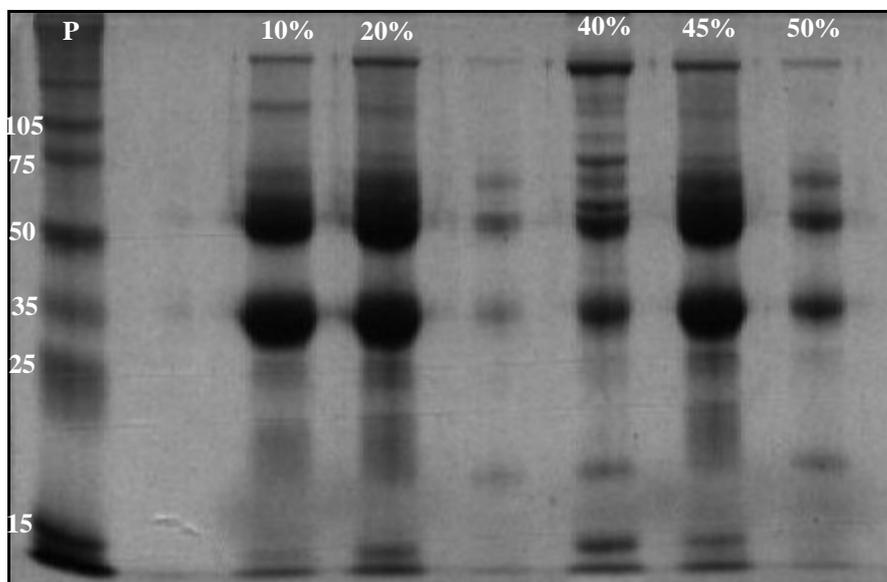


Fig. 2.2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), mostrando os pesos moleculares (KDa) do padrão (P) e das lipoproteínas de baixa densidade extraídas em diferentes concentrações de sulfato de amônio (10, 20, 40, 45 e 50%). Géis de concentração e separação de 4% e 12,5%, respectivamente, corados em Azul de Coomassie.

Por apresentar melhor perfil eletroforético, a extração das lipoproteínas de baixa densidade utilizando sulfato de amônio a 50% foi considerada a melhor, sendo aplicada na coluna de cromatografia de filtração em gel. Dessa substância foram conseguidos três picos cromatográficos (Fig. 2.3A). O primeiro pico foi mais elevado, saindo a maior parte das proteínas de alto peso molecular, enquanto os outros

dois foram menores e menos evidentes, com proteínas de peso molecular intermediário e pequeno, respectivamente. O método de filtração em gel obteve picos parcialmente purificados, sendo que o pico 2 apresentou contaminação oriunda dos picos 1 e 3. Essa observação pôde ser comprovada após realização da eletroforese dos picos (Fig. 2.3B).

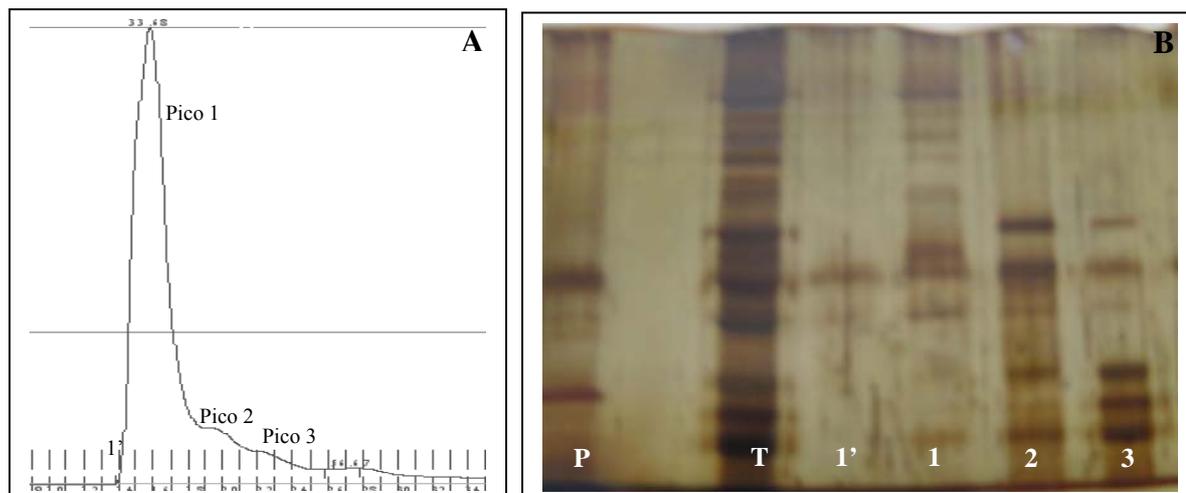


Figura 2.3 – A) Picos cromatográficos obtidos da aplicação das lipoproteínas de baixa densidade (LBD) na coluna de filtração em gel Sephacryl S100 HR, eluídas em Tris 50mM; B) Eletroforese SDS-PAGE dos picos obtidos a partir da corrida cromatográfica, observando-se o padrão (P), LBD total (T), pico 1 (1' e 1), pico 2 (2) e pico 3 (3). Géis de concentração e separação 4% e 12,5%, respectivamente, corados pela prata. (1' – início do pico 1, indicado no gráfico).

2.4 – Discussão

Com relação à técnica de extração da lipoproteína de baixa densidade, a metodologia empregada para a obtenção do plasma da gema é semelhante ao descrito por Le Denmat et al. (2000), Anton e Gandemer (1999), Anton et al. (2003) e Sousa et al. (2007). A separação da porção granular da gema do plasma é fácil por meio da centrifugação. O plasma da gema é altamente solúvel, independente do pH e da concentração de sal utilizada, diferente do grânulo (Sousa et al., 2007). A manutenção da insolubilidade do grânulo é conseguida em solução salina com molaridade próxima a 0,1M, o que é desejável no processo de extração das lipoproteínas e foi realizada no presente trabalho. Este componente passa a ser solúvel quando diluído em meios com alta força iônica, de molaridade acima de 0,3M, sendo completamente dissolvido em solução salina a 1,71M (Anton e Gandemer, 1997). Já em relação ao pH, os grânulos são insolúveis entre 4,3 e 6,5 (Sirvente et al., 2007). Como o

pH inicial da solução da gema se apresentou entre 5,8 e 6,4, não houve a possibilidade de contaminação do plasma pelo grânulo.

A dissociação dos grânulos é indesejável no processo de separação do plasma da gema, principalmente quando este será utilizado na preservação espermática. Os grânulos são compostos por 70% de lipoproteínas de alta densidade, que estão relacionadas às modificações da membrana plasmática no processo de capacitação espermática. A lipoproteína de alta densidade, assim como a heparina, induz a capacitação ao se ligar a moléculas de colesterol, causando seu efluxo da membrana espermática (Thérien et al., 1998; Manjunath e Thérien, 2002). Pace e Graham (1974) obtiveram o pior índice de motilidade espermática quando estes foram congelados com a porção granular. Demianowicz e Strzezek (1995), avaliando as frações de lipoproteínas de alta densidade e de baixa densidade durante o resfriamento a 4°C do sêmen suíno, verificaram baixa motilidade na primeira, em relação à segunda. Amirat et al. (2005) citam que o possível efeito

indesejável da lipoproteína de alta densidade está relacionado a sua rápida ligação à membrana plasmática da cabeça, primeiramente, e depois da cauda, desencadeando o processo de capacitação com total destruição do acrossoma.

Quanto ao processo de centrifugação, a velocidade utilizada neste experimento foi superior à descrita por Moussa et al. (2002) e Anton et al. (2003), e inferior à utilizada por Dyer-Hurdon e Nnanna (1993). Aluko e Mine (1998) citam que a centrifugação é um método seguro para a separação do plasma e do grânulo, sob diluição em igual proporção com solução salina ou água. A velocidade utilizada neste trabalho não apresenta risco de desnaturar proteínas (Le Denmat et al., 2000; Sirvente et al., 2007). Sousa et al. (2007) citam que o plasma não se sedimenta durante a centrifugação, devido aos 85% de lipoproteínas de baixa densidade presentes em sua composição.

O plasma teve seu pH corrigido em 8,7 para a realização da precipitação, assim como descrito por Moussa et al. (2002). A precipitação geralmente é feita quando se deseja separar uma proteína ou uma classe de proteína (Harris, 1992). No presente trabalho, o objetivo foi precipitar as livetinas presentes no plasma da gema. A precipitação pela adição de sais neutros é a mais utilizada no fracionamento de proteínas, sendo ideal ocorrer à 4°C, como feito no presente trabalho. O sulfato de amônio é o sal mais utilizado por ser barato e suficientemente solúvel, sendo sua concentração mensurada a partir do seu grau de saturação. Sousa et al. (2007) observaram menor solubilidade do plasma da gema em solução de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), o que permite a separação dos seus constituintes por precipitação.

O ponto crítico do processo é a adição do sulfato de amônio à solução, que pode ser feita utilizando este reagente na forma granulada ou diluída. Para evitar a formação de grumos do sal e a precipitação de substâncias indesejadas (Harris, 1992), neste trabalho foi utilizada a solução saturada de sulfato de amônio, que foi eficiente na

precipitação dos contaminantes, sem causar problemas, ao ser adicionada por gotejamento. Jolivet et al. (2006), Moussa et al. (2002) e Anton et al. (2003) não explicaram a forma de apresentação do sulfato utilizada em seus trabalhos.

Em todos estes trabalhos citados, assim como no presente, a água bidestilada foi usada como meio para a diálise, variando apenas o tempo de duração. No presente trabalho, devido a maior adição de sulfato de amônio nos tratamentos IV e V, foi necessário maior tempo de diálise para a total retirada do sal, calculada através da fórmula $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$, sendo C_1 a concentração de sulfato de amônio, V_1 o volume do plasma da gema dentro da membrana de diálise, V_2 o volume de água bidestilada utilizada na diálise e C_2 o valor que se deseja obter para saber qual será a concentração de sulfato de amônio após a diálise.

Com relação à obtenção da lipoproteína de baixa densidade após a última centrifugação, verificou-se melhor extração nos tratamentos com precipitação usando mais que 40% de sulfato de amônio. O aspecto do subnadante, mais turbido, como observado nos tratamentos com 10 e 20% de sulfato de amônio mostra que, devido a baixa concentração de sulfato utilizada, a precipitação não ocorreu de forma satisfatória, não eliminando totalmente as livetinas da lipoproteína de baixa densidade. Este fato pôde ser confirmado na eletroforese, onde apareceram mais bandas de proteínas nestes tratamentos.

O valor encontrado para teor de matéria seca da gema foi semelhante ao relatado por Burley e Sleigh (1983) e Moussa et al. (2002), enquanto que o valor obtido para a lipoproteína de baixa densidade a 40% foi semelhante ao encontrado por Anton et al. (2003). A diminuição da porcentagem de matéria seca entre os tratamentos reflete o grau de precipitação. Quanto maior a precipitação, maior a retirada de proteínas contaminantes e menor o teor de matéria seca. O sentido inverso foi obtido para a porcentagem de lípidos encontrada na matéria

fresca. Quanto menor a concentração de sulfato usada, menor a quantidade de lípidos apresentada na matéria fresca. Isto porque não houve ainda uma concentração do conteúdo de lipoproteína de baixa densidade, que possui na sua constituição mais de 80% de lípidos, quando comparados com outros constituintes do plasma (Jolivet et al., 2006).

Não foi observada variação na concentração proteica entre os tratamentos contendo 20% ou mais de sulfato de amônio adicionado. Evans et al. (1968) verificaram que as proteínas presentes nas lipoproteínas de baixa densidade com alto e baixo peso molecular são as mesmas, o que varia é o conteúdo de lípidos. O método de Lowry é o mais utilizado na determinação da concentração de proteínas, porém a reação apresenta pequena variação de resposta na composição dos aminoácidos, quando há a interferência de substâncias durante a análise, como lípidos. Com o material coletado foram realizadas outras análises para dosar as proteínas, dentre elas o teste de Bradford e teste 280-260nm em espectrofotômetro. Dentre as três técnicas, mesmo com variações, a técnica de Lowry foi mais confiável na determinação da concentração de proteínas, sendo utilizada por Anton e Gandemer (1999), Le Denmat et al. (2000) e Moussa et al. (2002).

Comparando-se o perfil eletroforético, observou-se que quanto maior a precipitação, menor o número de bandas presentes na lipoproteína de baixa densidade. O gel mostrado na figura 2.2 evidencia a semelhança das bandas existente entre as lipoproteínas extraídas com 10 e 20% de sulfato de amônio, mostrando que não houve precipitação adequada.

Nas condições experimentais usadas, as lipoproteínas extraídas com 40% de sulfato de amônio foram menos purificadas que a lipoproteína de baixa densidade com 50%, que contém seis bandas de proteínas. Não foi possível comparar os achados de eletroforese com Juliani et al. (2004) e Varela Júnior (2005), pois estes não apresentaram o perfil eletroforético de sua lipoproteína de baixa

densidade. Porém, quando comparou-se a eletroforese mostrada em Moussa et al. (2002) com a do sulfato de amônio a 40% obtida neste trabalho, percebeu-se que estas são diferentes. A única banda comprovadamente semelhante é a de 15KDa, referente a apoproteína-B da lipoproteína de baixa densidade, presente nos tratamentos com 40, 45 e 50% de sulfato de amônio.

Como Moussa et al. (2002) não deixaram claro se o padrão eletroforético da lipoproteína de baixa densidade foi obtido antes ou depois da cromatografia, este fato estimulou a realização dos testes com diferentes concentrações de sulfato de amônio. Apesar disso, verificou-se que o mesmo padrão eletroforético ainda não foi alcançado após a realização dos testes. Ao passar as lipoproteínas de baixa densidade a 50% na coluna de cromatografia é que se obteve um perfil parecido com o exposto por estes autores, representado pelo pico 1.

Quanto à cromatografia, o gráfico obtido foi semelhante ao mostrado por Anton et al. (2003), com três picos cromatográficos, mostrando a separação das proteínas de alto, médio e baixo peso molecular, respectivamente nos picos 1, 2 e 3. Estes resultados, porém, foram diferentes do obtido por Moussa et al. (2002), que conseguiu dois picos, com grande tempo de retenção entre os picos. A cromatografia de filtração em gel foi usada no presente trabalho, assim como por Moussa et al. (2002), Anton et al. (2003), Martinet et al. (2003) e Jolivet et al. (2006), assim como o mesmo eluente.

A filtração em gel é uma técnica que se baseia na separação de proteínas a partir do seu raio hidrodinâmico, que causa a separação pelo tamanho dos seus pesos moleculares. Estas atravessam um gel ao longo da coluna, que possui poros de diferentes tamanhos. Proteínas de maior peso molecular atravessam rapidamente a coluna, por não passarem por dentro dos poros. Quanto menor é a partícula, mais demorada é sua passagem pela coluna (APB, 1999).

Outra observação é que, apesar da diferença no diâmetro dos poros da coluna

utilizada por Anton et al. (2003), estes autores obtiveram o tempo de retenção inicial do eluído próximo ao do presente trabalho, que foi de, no mínimo, 50 minutos após a aplicação, diferente do obtido por Moussa et al. (2002), que foi de 200 minutos, utilizando mesma coluna cromatográfica que Anton et al. (2003).

Posteriormente, analisando trabalhos realizados no mesmo laboratório que originou os trabalhos publicados por Moussa et al. (2002), Anton et al. (2003) e Jolivet et al. (2006), observa-se que nestes dois últimos a técnica de extração é mais claramente citada do que no trabalho de Moussa et al. (2002), deixando evidente que a eletroforese foi realizada após a cromatografia.

Comparando-se o perfil eletroforético apresentado no presente trabalho e em Moussa et al. (2002), Anton et al. (2003) e Jolivet et al. (2006), observou-se que houve variação entre os pesos moleculares obtidos nas lipoproteínas de baixa densidade. Pode-se sugerir que alguns fatores influenciem esse resultado, como temperatura do ambiente, que pode alterar o grau de saturação das soluções, a qualidade dos reagentes e variações na matéria-prima. De acordo com Romanoff e Romanoff (1963) a concentração dos compostos dos ovos pode variar com o tempo de produção, ambiente, dieta, características

hereditárias da linhagem e com a espécie de ave.

Evans et al. (1969), avaliando a influência da dieta na concentração de lipoproteínas de baixa densidade presente na gema, verificaram que os constituintes que mais variam são os lípidos, mantendo-se similar o conteúdo de aminoácidos. O mesmo foi citado MacDonalds e Foulkes (1981). Burley e Sleight (1983), realizando a separação de apoproteínas da lipoproteína de baixa densidade da gema do ovo de aves por cromatografia de hidrofobicidade, observaram que o padrão dos eluídos obtidos em ovos de patos (*Anas platyrhynchos*) é diferente das apoproteínas presentes nos ovos de galinha (*Gallus domesticus*).

2.5 – Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, a técnica descrita por Moussa et al. (2002) com modificações incorporadas no presente trabalho é de fácil realização. A adição de 50% de solução saturada de sulfato de amônio foi mais eficaz na extração das lipoproteínas de baixa densidade, quando comparado às demais concentrações testadas, de acordo com o perfil eletroforético.

Capítulo 3: Experimento II

Padronização de uma técnica de congelamento de sêmen canino

(Standardization of a technique for canine semen freezing)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar os meios diluidores de centrifugação e de congelamento mais eficientes para o sêmen canino congelado em máquina computadorizada, além da temperatura de descongelamento. Foram usados cinco cães e coletados três ejaculados/animal. O sêmen fresco foi avaliado quanto à motilidade total, progressiva, vigor, morfologia e teste hiposmótico (HO). Foram testados no Experimento I (E.I) os meios C1: Glicose-EDTA (GE) + sêmen (+S) sem passar pelo processo de centrifugação, C2: Tris-cítrico (TC) +S sem centrifugação; C3: GE+S e C4: TC+S, ambos centrifugados a 755xg/7min., enquanto C1 e C2 foram mantidos incubados a 37°C. Após a centrifugação, os tratamentos C3 e C4 tiveram os *pellets* ressuspensos em 1mL dos meios de centrifugação em estudo, sendo os espermatozoides avaliados novamente quanto aos parâmetros espermáticos. No Experimento II (E.II), foram testados os meios Tris-cítrico (G1), Lactose-gema (G2) e INRA 82 (G3) com 5% de glicerol. Estes meios foram congelados em sistema computadorizado, com curva de resfriamento de -0,5°C/min, de 25-29°C até 5°C, período de equilíbrio de 1h a 5°C, seguido da curva de congelamento de -20°C/min, de 5°C até -120°C. As amostras foram descongeladas em duas temperaturas: A) 37°C/30seg e B) 52°C/10seg seguida de 37°C/30seg, sendo os espermatozoides avaliados quanto à motilidade, morfologia, HO e fluorescência com CFDA/IP. No E.I, não houve diferença entre os tratamentos, no T0, para os parâmetros de motilidade ($p>0,05$). C3 e C4 apresentaram maior porcentagem de espermatozoides normais que C1 e C2 ($p<0,05$). Glicose-EDTA apresentou resultados superiores que o Tris-cítrico no HO, quando centrifugados ($p<0,05$). No E.II, G1 e

G2 apresentaram superioridade sobre G3 quanto aos parâmetros de motilidade e morfologia ($p<0,05$). Não houve diferença entre os meios quanto ao teste CFDA/IP e HO ($p>0,05$). O descongelamento a 52°C apresentou maior porcentagem de anormalidades acrossomais que a temperatura de 37°C ($p<0,05$). Pode-se concluir que o glicose-EDTA foi eficiente na proteção da integridade funcional da membrana espermática durante a centrifugação. Os meios Tris-cítrico e Lactose-gema preservaram melhor a viabilidade espermática do que o INRA, quando descongelados a 37°C/30seg.

Palavras-chave: Sêmen canino, centrifugação, congelamento, meio diluidor, temperatura de descongelamento.

ABSTRACT

The aims of the present work were to determine the best centrifugation and freeze extenders to freezing canine semen using computerized system. Thaw temperature was evaluated as well. Five dogs were used and three ejaculates/animal were collected. Fresh semen was evaluated for total motility, progressive motility, vigor, spermatic morphology and by the hypoosmotic test (HOST). In Experiment I (E.I), the extenders tested were C1: Glucose-EDTA (GE) + Semen (+S) without passed through centrifugation; C2: Tris-citric (TC) +S without centrifugation; C3: GE+S and C4: TC+S, both centrifuged at 755xg/7min, while C1 and C2 were incubated at 37°C. After centrifugation (T0), the pellets were resuspended at tested treatments that were analysed to spermatics parameter. In Experiment II (E.II), the extender tested were Tris-citric-yolk (G1), lactose-yolk (G2) and INRA 82 (G3), with 5% glycerol. A computerized freezing system was used and cooling rate was -0,5°C/min, from 25-29°C to

5°C, equilibrate period at 5°C/1h followed by freezing rate of -20°C/min, from 5°C to -120°C. The treatments were thawed into two temperatures: A) 37°C/30sec and B) 52°C/10sec followed by 37°C/30sec. Evaluation post thaw were spermatic motility and morphology, HOST and membrane integrity by fluorescence test using CFDA/PI. In E.I, no difference was showed on T0 for motility parameter ($p>0.05$). C3 and C4 showed more normal spermatic morphology than C1 and C2 ($p<0.05$). Glucose-EDTA showed superior results on HOST than Tris-citric, when centrifuged ($p<0.05$). In E.II, G1 and G2 showed better results than G3 to morphologic and motility parameter ($p<0.05$). No difference was observed among treatments as for CFDA/PI and HOST ($p>0.05$). Thawed temperature 52°C showed more acrosome anomaly than 37°C ($p<0.05$). In conclusions, Glucose-EDTA was more efficient to maintain the membrane functionality during centrifugation. Tris-citric and Lactose-yolk were more efficient than INRA 82 to preserve the spermatozoa viability post-thaw using thawing temperature of 37°C/30sec.

Key-words: Canine semen, centrifugation, freezing, extender, thawed temperature.

3.1 – Introdução

Apesar de muitas pesquisas, o sêmen canino ainda não tem estabelecida uma curva de congelamento capaz de garantir a manutenção da viabilidade espermática pós-descongelamento, bem como um método para realização desta curva (Hori et al., 2006). As dificuldades estão relacionadas com o meio diluidor, a concentração do crioprotetor, a forma de envase e a taxa de descongelamento (Yu et al., 2002; Nöthling e Shuttleworth, 2005).

Para o congelamento, é utilizado caixa de isopor com gelo, geladeira e até freezer de ultra-baixa temperatura (-152°C) (Bueno et al., 2001b; Oliveira, 2003; Álamo et al., 2005; Batista et al., 2006). O uso de máquina computadorizada para a realização das curvas

de resfriamento e congelamento é interessante, pois esta executa uma queda homogênea e gradual da temperatura até -120°C, além de permitir a programação da velocidade desejada (Eilts, 2005).

Com a curva de congelamento determinada, passa a ser importante conhecer qual o melhor meio de centrifugação e de congelamento, bem como a melhor taxa de descongelamento a ser usada.

Vários estudos utilizam meios diluidores à base de gema do ovo ou leite desnatado durante o processo de centrifugação (Cunha e Lopes, 1999; Gil et al., 2000), porém poucos trabalhos são encontrados testando meios diluidores salinos em cães.

O meio Tris-cítrico-frutose é considerado o meio de escolha para o congelamento do sêmen canino. Além de possuir o tampão Tris, este possui a frutose, que é considerada uma fonte energética de fácil utilização pelo espermatozóide canino e responsável por sua motilidade rápida e linear (Rodrigues-Gil, 2006). Outros meios têm sido estudados, como a lactose-gema, principalmente por ser fonte de lactose, considerada capaz de preservar a integridade estrutural e funcional da membrana espermática (Peña, 1997), e o meio INRA 82, amplamente utilizado em equinos, com escassos trabalhos em cães (Vidament et al., 2001).

Quanto à temperatura de descongelamento, a sua velocidade depende da taxa de congelamento utilizada, sendo considerado que altas temperaturas, como 70 a 75°C ou 55°C, aumentam a qualidade espermática, quando comparadas com a temperatura de 37°C (Nöthling e Shuttleworth, 2005).

O objetivo deste estudo foi determinar o meio de centrifugação e o meio de congelamento a serem utilizados durante o congelamento do sêmen canino em máquina computadorizada programada, além da temperatura de descongelamento.

3.2 - Material e métodos

3.2.1 – Animais e coleta do sêmen

Foram utilizados cinco cães oriundos de criatório comercial, sendo dois da raça Sharpei e três da raça Labrador, com idades entre dois a cinco anos, avaliados e escolhidos após exames clínicos e andrológicos completos. Os animais receberam ração comercial e água *ad libitum* de acordo com o manejo do local, durante todo o período experimental.

Antes do início do experimento, os animais foram submetidos ao esgotamento das reservas extra-gonádicas, por meio de coletas de sêmen diárias por sete dias consecutivos, sendo iniciada a coleta experimental três dias após o término do esgotamento. Foram coletadas a primeira e segunda fração dos 15 ejaculados utilizados em cada experimento, sendo três por animal, por meio da técnica de manipulação digital sem a presença de fêmea em estro (Linde-Forsberg, 1991). O intervalo entre coletas foi de 72h, sendo as amostras obtidas com o auxílio de funil plástico acoplado a um tubo de centrífuga de plástico graduado, previamente aquecido a 37°C.

3.2.2 – Meios diluidores

No *Experimento I*, foram utilizados os meios de centrifugação Glicose-EDTA e o meio Tris-cítrico (Anexo 7). Os meios de congelamento utilizados no *Experimento II* foram Tris-cítrico, Lactose-gema e INRA 82 modificado por Palmer (1984), todos acrescidos de 5% de glicerol e 20% de gema de ovo de galinha, exceto o INRA, com 2% de gema (Anexo 7).

Todos os meios diluidores foram preparados em câmara de fluxo laminar, com água MilliQ e estocados na temperatura de -20°C até sua utilização, sendo descongelados a 37°C antes de serem utilizados. A osmolaridade^a e o pH^b foram mensurados para controle.

^a Micro osmometre TM, modelo 5004, Natick MA – USA;

3.2.3 – Avaliações espermáticas

Motilidade total, motilidade progressiva e vigor

A motilidade total, a motilidade progressiva e o vigor foram avaliados utilizando-se uma gota de sêmen colocada entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 37°C, e avaliada em microscópio óptico nos aumentos de 100X e 400X. As motilidades total e progressiva foram expressas em porcentagem (0-100) e o vigor espermático numa escala de 0 (imobilidade) a 5 (rápida mobilidade) (Feldman e Nelson, 1996). Apenas as amostras com motilidade progressiva mínima de 80%, vigor ≥ 4 e mínimo de 80% de espermatozoides morfológicamente normais foram submetidas ao congelamento.

Concentração espermática

A concentração espermática foi determinada a partir da contagem de espermatozoides em câmara de Neubauer, após diluição do sêmen em solução de formol salina tamponada, na proporção de 1:100, utilizando microscópio óptico em aumento de 400X.

Morfologia espermática

Uma alíquota 100µL de sêmen foi diluída em 200µL de solução de formol salina tamponada para análise da morfologia espermática. Esta foi avaliada em preparação úmida, utilizando-se lâmina e lamínula e microscópio de contraste de fase no aumento de 1000X, sendo analisadas 200 células. As anormalidades espermáticas observadas foram classificadas quanto a defeitos de cabeça, peça intermediária, peça principal e distal, gota citoplasmática proximal e gota citoplasmática distal. Todo espermatozoide com mais de uma

^b pHmetro: Digimed DMPH-2.

alteração morfológica foi classificado na categoria que representou a alteração mais próxima do ápice do espermatozóide.

Avaliação da integridade funcional da membrana plasmática da cauda dos espermatozoides

A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada pelo teste hiposmótico (HO), de acordo com a técnica descrita por Kumi-Diaka (1993) para a espécie canina. Uma alíquota de 50µL de sêmen foi adicionada a 500µL de solução hiposmótica contendo frutose a 60mOsmol/L (Anexo 7). Esta solução foi incubada por 30 minutos em banho-maria a 37°C e fixada em 250µL de formol salina tamponada, para posterior análise em microscópio de contraste de fase. Foram avaliadas 200 células de acordo com a presença ou não de cauda enrolada, sendo o resultado expresso em porcentagem (Jeyendran et al.,1984).

Avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática e acrossomal da cabeça dos espermatozoides

A integridade estrutural da membrana plasmática e do acrossoma foi avaliada pela técnica da fluorescência, adotando-se dois fluorocromos, o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e o iodeto de propídio (IP), segundo o protocolo proposto por Harrison e Vickers (1990) e modificado por Zúccari (1998). Foi adicionado aos 40µL da solução trabalho 10µL de sêmen (Anexo 8). Esta solução foi incubada por oito minutos em banho-maria a 37°C e avaliada em microscópio de epifluorescência no aumento de 400X, ao abrigo da luz, utilizando filtro de 480 a 610nm. Foram contadas 200 células, considerando-se três categorias de espermatozoides: íntegros, lesados e semi-lesados. Espermatozoides íntegros apresentaram membrana plasmática íntegra, corados pelo CFDA em toda sua extensão. Espermatozoides lesados, corados pelo IP, apresentaram membrana plasmática e

membrana acrossomal lesadas, enquanto que espermatozoides semi-lesados apresentaram-se corados pelo CFDA, devido a integridade da membrana acrossomal, e pelo IP, devido a lesão da membrana plasmática.

Teste de termorresistência (TTR)

O teste de termorresistência foi feito mantendo-se o sêmen à temperatura de 37°C após o descongelamento. As amostras foram avaliadas utilizando-se 10µl de sêmen, colocando-o entre lâmina e lamínula previamente aquecidas, analisando a motilidade total, progressiva e vigor logo após o descongelamento (tempo 0) e aos 30, 60, 90 e 120 minutos, ou até quando apresentarem motilidade progressiva abaixo de 5%.

3.2.4 – Experimentos

Experimento I: Avaliação do meio de centrifugação

O sêmen fresco coletado foi mantido a 37°C em banho-maria, sendo avaliado quanto às motilidades total e progressiva e vigor. Depois de retiradas amostras para teste hiposmótico e morfologia, o sêmen foi dividido em quatro alíquotas, de acordo com os tratamentos:

- C1 (Controle 1): Sêmen diluído em Glicose-EDTA, na proporção 1:2, sem centrifugação;
- C2 (Controle 2): Sêmen diluído em Tris-cítrico, na proporção 1:2, sem centrifugação;
- C3: Sêmen diluído em Glicose-EDTA, na proporção 1:3, com centrifugação;
- C4: Sêmen diluído em Tris-cítrico, na proporção 1:3, com centrifugação.

Enquanto os tratamentos C3 e C4 foram centrifugados a 755xg/7min., C1 e C2 foram mantidos a 37°C em banho-maria. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados, sendo os *pellets* ressuspendidos

com 1mL dos meios diluidores a 37°C, correspondentes aos tratamentos.

O tempo imediatamente após a centrifugação foi considerado como tempo 0 (T0), sendo realizadas as avaliações espermáticas de motilidade total, progressiva e vigor nos quatro tratamentos, sendo coletadas amostras para morfologia e teste hiposmótico. As amostras foram novamente avaliadas aos 30 minutos de incubação (T30), realizando-se as mesmas análises do tempo 0. Aos 60 (T60), 90 (T90) e 120 (T120) minutos, realizaram-se apenas avaliações de motilidade total, progressiva e vigor espermático.

Experimento II: Avaliação do meio de congelamento e da temperatura de descongelamento

Em um segundo momento, os mesmos cães foram utilizados na coleta de sêmen para o congelamento, sendo um total de 15 ejaculados, três por animal. O sêmen fresco foi avaliado quanto a motilidade total, motilidade progressiva e vigor, sendo coletadas amostras para morfologia espermática e teste hiposmótico. Posteriormente, o sêmen foi dividido em três alíquotas de igual volume, sendo diluídas, na proporção 1:3, no meio de centrifugação escolhido no *Experimento I*, e centrifugadas a 755xg/7min. Após descarte dos sobrenadantes, o *pellet* presente em cada tubo de centrífuga foi ressuspensionado até 1mL com o meio correspondente ao tratamento em teste:

- G1: Meio Tris-cítrico, com 20% de gema do ovo e 5% de glicerol (Controle);
- G2: Meio Lactose-gema, com 20% de gema do ovo e 5% de glicerol;
- G3: Meio INRA 82, com 2% de gema do ovo e 5% de glicerol.

Retirou-se 10µL de sêmen do tubo de centrífuga, referente ao G2, para contagem da concentração espermática, considerando-se que todos os tratamentos apresentavam igual volume de sêmen e concentração espermática. O volume das alíquotas foi completado até o

valor necessário para se obter uma concentração final de 100×10^6 espermatozoides/mL. As alíquotas de sêmen foram envasadas em palhetas de 0,5mL, vedadas com massa de modelar atóxica, sendo imediatamente colocadas na máquina de congelamento^c, que realizou a curva de resfriamento de -0,5°C/min, da temperatura ambiente (25-29°C) até 5°C, período de equilíbrio de uma hora a 5°C e posterior curva de congelamento com queda de -20°C/min, de 5°C até -120°C, quando as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido, atingindo a temperatura de -196°C. As palhetas foram estocadas em botijão de nitrogênio até o descongelamento.

Foram testadas duas temperaturas de descongelamento para os três tratamentos: A) 37°C por 30 segundos e B) 52°C por 10 segundos, seguida de 37°C por 30 segundos. Após o descongelamento, as amostras foram avaliadas quanto à motilidade total, motilidade progressiva e vigor (tempo 0), sendo coletadas alíquotas para morfologia, teste hiposmótico e fluorescência. O teste de termorresistência foi feito até 120 minutos de incubação, sendo avaliados a motilidade total, progressiva e vigor.

3.2.5 – Análise estatística

O delineamento experimental utilizado no *Experimento I* foi blocos ao acaso, bloqueando o efeito cão. Os resultados obtidos para motilidade total, progressiva e vigor foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, comparando-se as médias pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. Já os resultados obtidos para morfologia espermática e teste hiposmótico foram analisados pela análise de variância (ANOVA), comparando-se as médias pelo teste de Student Newman Keuls a 5% de significância.

O *Experimento II* utilizou o delineamento de blocos com parcelas subdivididas, bloqueando-se o cão e testando os

^c Modelo TK3000 – Tetakon, Brasil.

meios diluidores (parcelas) descongelados em duas temperaturas (subparcelas). Os resultados foram submetidos a ANOVA, comparando-se as médias pelo teste de Student Newman Keuls (5%), para os meios de congelamento, e teste de Duncan (5%), para as temperaturas de descongelamento. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SAS (*Statistical Analysis System*).

3.3 - Resultados

Nos dois experimentos, os cães apresentaram sêmen de coloração branco turvo, odor normal e volume médio de $2,6 \pm 0,8$ mL, correspondente às coletas das duas primeiras frações. As médias para motilidade total e progressiva foram de $85,7 \pm 6,7\%$ e $80,7 \pm 6,9\%$, respectivamente, além do vigor médio de $4 \pm 0,7$ e da concentração média de $231 \pm 74 \times 10^6$ espermatozoides/mL, após a centrifugação. As porcentagens médias de espermatozoides morfolologicamente normais e reativos ao teste hiposmótico foram de $85 \pm 7,5\%$ e $88 \pm 7,5\%$, respectivamente.

Experimento I: Avaliação do meio de centrifugação

Avaliando-se os parâmetros espermáticos de motilidade total, motilidade progressiva e vigor, observou-se que no tempo 0, após a centrifugação ou não, não houve diferença entre os tratamentos ($p > 0,05$) (Tab. 3.1). Após 30 minutos de incubação, observou-se que C2 apresentou maior porcentagem média de espermatozoides com motilidade total, enquanto que o C3 apresentou menor vigor, quando comparado aos tratamentos C1 e C2 ($p < 0,05$). Não houve diferença na motilidade progressiva entre os tratamentos ($p > 0,05$). Aos 60, 90 e 120 minutos após a centrifugação, não foi observada diferença entre os tratamentos para a motilidade total, progressiva e vigor ($p > 0,05$). A motilidade espermática progressiva dos tratamentos durante o período de incubação, está mostrada na figura 3.1.

Durante o período de incubação a 37°C , observou-se que os tratamentos contendo Glicose-EDTA (C1 e C3) apresentaram maior queda da motilidade progressiva entre os tempos avaliados, porém não houve diferença entre os tratamentos ($p > 0,05$) (Fig. 3.2).

Tabela 3.1 – Motilidade espermática total (MT), progressiva (MP) e vigor (V) dos espermatozoides caninos logo após a centrifugação (Tempo 0) (N=15 ejaculados/tratamento) ($p > 0,05$).

Tratamentos	MT (%)	MP (%)	V (0-5)
C1	$68,7 \pm 10,7$	$63,3 \pm 10,2$	$3,2 \pm 0,3$
C2	$69,7 \pm 5,8$	$64,3 \pm 5,6$	3 ± 0
C3	$66 \pm 5,7$	$60,7 \pm 6,4$	$3,3 \pm 0,4$
C4	$57 \pm 9,3$	$52,6 \pm 9,5$	$3,1 \pm 0,4$

Média \pm desvio-padrão; C1: Glicose-EDTA (GE) sem centrifugação (s/c); C2: Tris-cítrico (TC) s/c; C3: GE com centrifugação (c/c); C4: TC c/c.

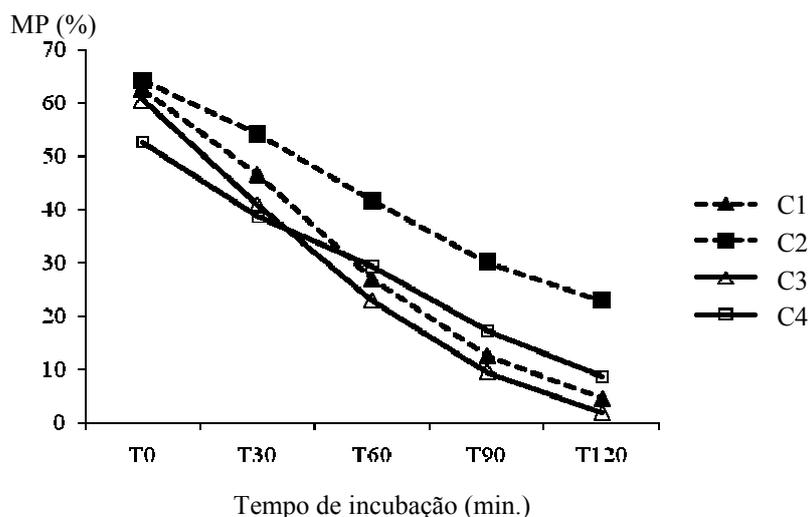


Figura 3.1 – Motilidade progressiva (MP, %) dos espermatozoides caninos diluídos em meios Glicose-EDTA (GE) e Tris-cítrico (TC), centrifugados (c/c) ou não (s/c), logo após a centrifugação (T0) e aos 30, 60, 90 e 120 minutos após a incubação a 37°C ($p>0,05$). (C1: GE s/c; C2: TC s/c; C3: GE c/c; C4: TC c/c).

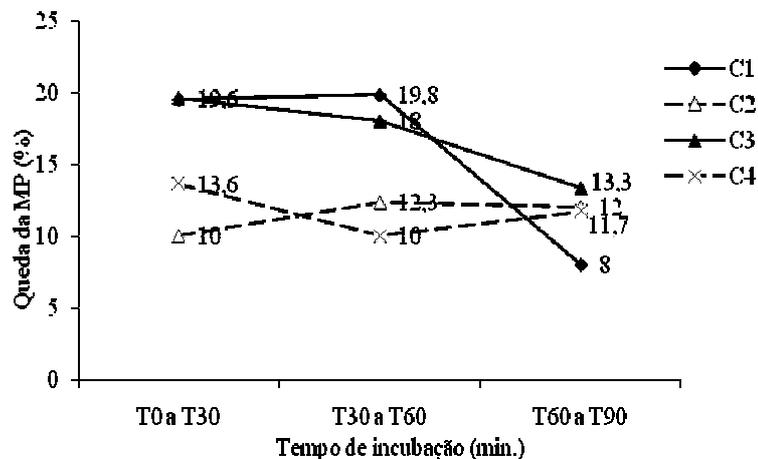


Figura 3.2 – Taxa de queda da motilidade progressiva de espermatozoides caninos diluídos nos meios Glicose-EDTA (GE) e Tris-cítrico (TC), centrifugados (c/c) ou não (s/c), entre os tempos T0 a T90 de incubação a 37°C ($p>0,05$). (C1: GE s/c; C2: TC s/c; C3: GE c/c; C4: TC c/c).

Não foram encontradas diferenças entre os tratamentos quanto as anormalidades espermáticas de defeito de cabeça (média geral de $1,03\pm 1,6\%$), de peça intermediária

($30\pm 17\%$), de peça principal e peça distal ($24\pm 16\%$), presença de gota citoplasmática proximal ($1,2\pm 1,9\%$) e distal ($0,5\pm 0,9\%$), independente do tempo avaliado ($p>0,05$). A

porcentagem média de espermatozoides morfologicamente normais, no tempo 0, foi maior no C4, quando comparado aos tratamentos não centrifugados ($p < 0,05$), enquanto que no tempo 30 o C4 apresentou maior média de espermatozoides morfologicamente normais ($p < 0,05$) (Fig. 3.3).

A média de espermatozoides reativos positivamente ao teste hiposmótico nos tratamentos contendo Glicose-EDTA (C1 e C3) foi superior ao tratamento C4, no tempo 0 ($p < 0,05$) (Tab. 3.2). Aos 30 minutos de incubação, não foram observadas diferenças entre os tratamentos ($p > 0,05$).

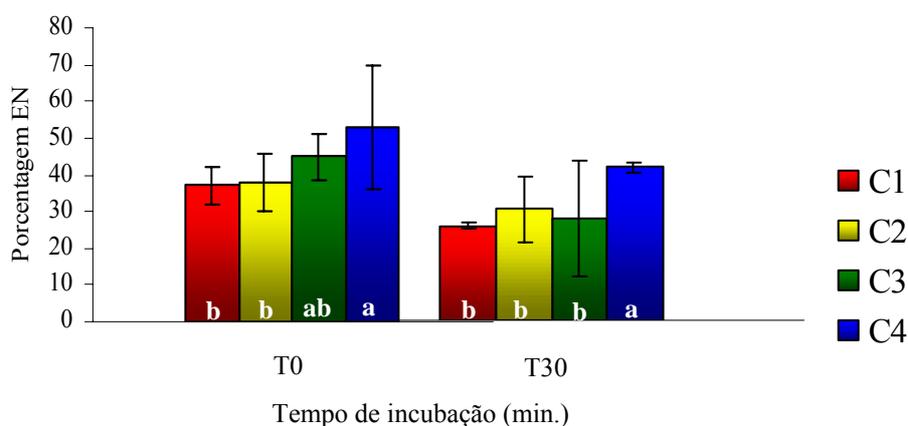


Figura 3.3 - Média de espermatozoides caninos morfologicamente normais (EN) nos meios Glicose-EDTA (GE) e Tris-cítrico (TC), centrifugados (c/c) ou não (s/c), nos tempos 0 (T0) e 30 minutos (T30) após a incubação a 37°C ($p < 0,05$). (C1: GE s/c; C2: TC s/c; C3: GE c/c; C4: TC c/c).

Tabela 3.2 – Porcentagem de espermatozoides caninos reativos ao teste hiposmótico (HO) nos tempos 0 (T0) e 30 (T30) minutos após a centrifugação, diluídos em meios Tris-cítrico e Glicose-EDTA (N= 15 ejaculados/ tratamento).

Tratamentos	HO T0	CV T0 (%)	HO T30	CV T30 (%)
C1	90,5±2,1 ^a	2	80,4±10,6 ^a	13
C2	85±8,4 ^{ab}	10	80,5±3,5 ^a	18
C3	90,5±2,8 ^a	3	86,3±1,4 ^a	2
C4	79,3±2,1 ^b	3	80,8±12,0 ^a	15

CV = Coeficiente de variação; Média±desvio-padrão; ^{a,b} – letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Student Newman Keuls; C1: Glicose-EDTA (GE) sem centrifugação (s/c); C2: Tris-cítrico (TC) s/c; C3: GE com centrifugação (c/s); C4: TC c/c.

Experimento II: Avaliação do meio de congelamento e da temperatura de descongelamento

O tempo médio gasto, do início da coleta até o início do resfriamento do sêmen, foi de aproximadamente 45,6 minutos, variando entre 33 a 55 minutos. A máquina de congelamento executou a curva de resfriamento em 40 minutos, em média, variando este tempo de acordo com a temperatura da máquina no início do processo, que oscilou entre 22 a 29°C. O tempo total gasto em todo o procedimento, incluindo a

realização do período de equilíbrio de 1h a 5°C, foi de aproximadamente 160 minutos.

Avaliando-se a motilidade total e progressiva e o vigor, os espermatozóides congelados nos meios Tris-cítrico-gema (G1) e lactose-gema (G2) apresentaram porcentagens médias semelhantes ($p>0,05$), sendo o INRA 82 (G3) significativamente inferior ($p<0,05$), tanto no tempo 0 (T0) após o descongelamento (Tab. 3.3) quanto durante o teste de termorresistência (Fig. 3.4), independente da temperatura de descongelamento testada ($p>0,05$).

Tabela 3.3 – Motilidade total (MT, %), progressiva (MP, %) e vigor (V, 0-5) logo após o descongelamento (T0) dos espermatozóides caninos, considerando-se os meios de congelamento (N= 30 amostras/tratamento) e as duas temperaturas de descongelamento testadas (N= 45 amostras/tratamento).

Tratamentos	MT T0		MP T0		V T0	
	A	B	A	B	A	B
G1	49,7±17,2 ^{aA}	46,7±15,4 ^{aA}	42,7±17,7 ^{aA}	42±14,9 ^{aA}	2,6±0,4 ^{aA}	2,6±0,7 ^{aA}
G2	51,3±10,3 ^{aA}	44±5,5 ^{aA}	44,3±13,1 ^{aA}	38±5,1 ^{aA}	2,4±0,3 ^{aA}	2,1±0,2 ^{aA}
G3	22±9,4 ^{bA}	28,3±16,8 ^{bA}	15,7±8,9 ^{bA}	20±14,9 ^{bA}	1,6±0,4 ^{bA}	1,7±0,4 ^{bA}

Média±desvio-padrão; ^{a,b} – letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p<0,05$) pelo teste de Student Newman Keuls para os meios diluidores; ^{A,B} – letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si ($p<0,05$) pelo teste de Duncan para as temperaturas de descongelamento. G1: Tris-cítrico-gema; G2: Lactose-gema; G3: INRA 82; A: 37°C/30seg.; B: 52°C/10seg seguido de 37°C/30seg.

Não houve diferença nas taxas de queda da motilidade progressiva entre os meios diluidores (Fig. 3.5A), quando

descongelados a 37°C/30seg. ou 52°C/10seg. seguido de 37°C/30seg. (Fig. 3.5B).

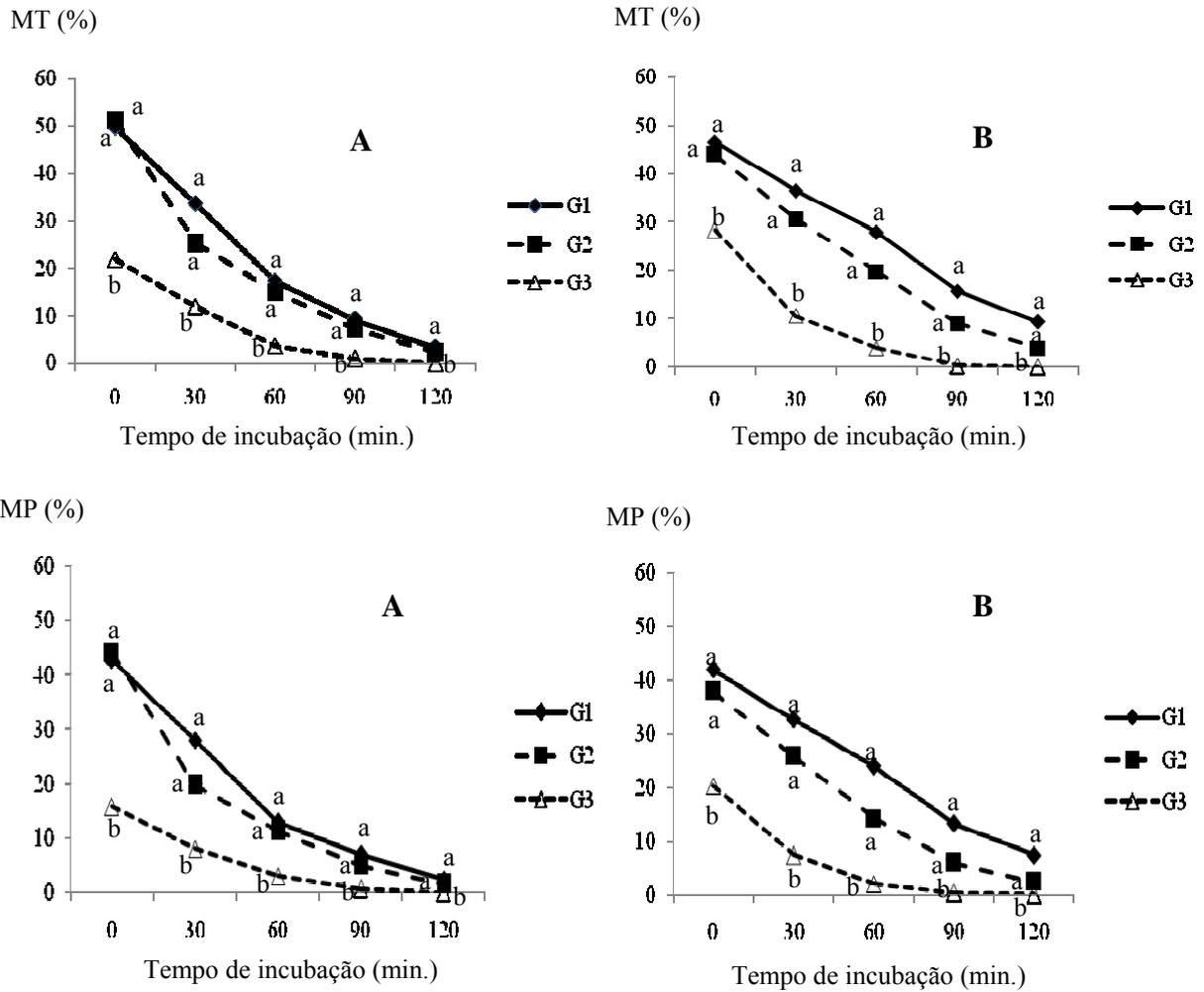


Figura 3.4 – Motilidade total (MT) e progressiva (MP) dos espermatozoides caninos congelados nos meios Tris-citríco-gema (G1), Lactose-gema (G2) e INRA 82 (G3), nos tempos avaliados após o descongelamento ($p < 0,05$), independente da temperatura de descongelamento usada ($p > 0,05$). (A: 37°C/30seg.; B: 52°C/10seg. seguido de 37°C/30seg.).

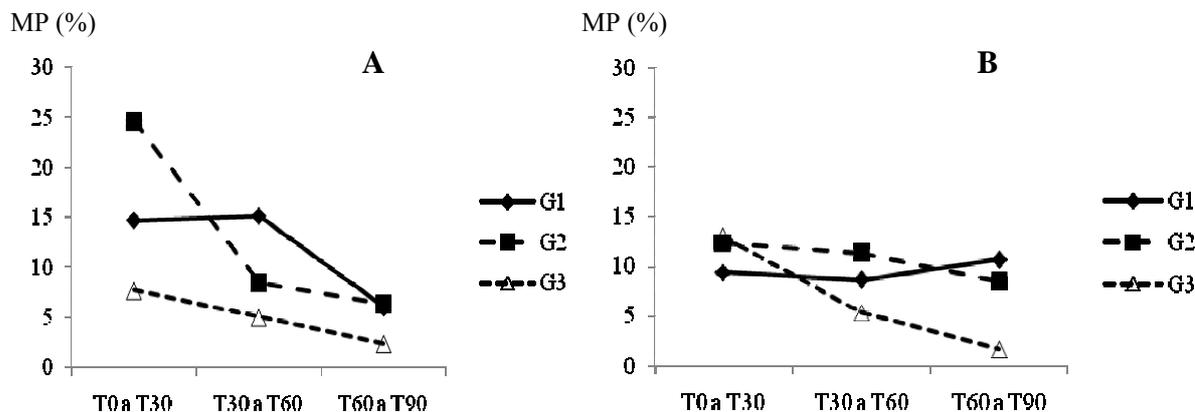


Figura 3.5 – Taxa de queda da motilidade progressiva (MP) dos espermatozoides caninos do tempo 0 (T0) até 90 minutos (T90) após o descongelamento, considerando os meios de congelamento (G1: Tris-cítrico-gema; G2: Lactose-gema; G3: INRA82) e as temperaturas de descongelamento testadas (A: 37°C/30seg.; B: 52°C/10seg. seguida de 37°C/30seg.) (p>0,05).

A média de espermatozoides morfológicamente normais foi maior nos tratamentos G1 e G2, quando comparados ao G3 (p<0,05) (Tab. 3.4), independente da temperatura de descongelamento utilizada. Defeitos de cabeça, acrossoma, presença de gota citoplasmática proximal e distal não apresentaram diferença entre os tratamentos e entre as temperaturas de descongelamento. O G3 apresentou maior média de defeitos de peça intermediária (18,3±9,2%) que G1 (3,9±1,6%) e G2 (4,8±2,5%) e maior média de defeitos de peça principal e distal (39,43±15,6%) que G1 (12,7±10,5%) e G2 (8,9±6,7%). Já o descongelamento a 52°C

apresentou defeitos de acrossoma (4,04±1,5%) e de peça intermediária (10,3±7,7%) superiores que o descongelamento a 37°C (2,2±3% e 7,7±2,3%, respectivamente).

A preservação da integridade de membrana dos espermatozoides, quanto ao teste hiposmótico, foi semelhante entre os meios de congelamento testados (Tab 3.4), independente da temperatura de descongelamento utilizada (p>0,05), assim como a preservação da integridade funcional das membranas plasmática e acrossomal, observada no teste de fluorescência, independente da categoria espermática avaliada (p>0,05).

Tabela 3.4 – Porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais (Normais), reativos ao teste hiposmótico (HO) e com as membranas espermáticas íntegras (Íntegros) no descongelamento de sêmen canino, considerando os meios de congelamento (N= 30 amostras/tratamento) e as temperaturas de descongelamento testadas (N= 45 amostras/tratamento).

Tratamentos	Normais		HO		Íntegros	
	A	B	A	B	A	B
G1	56,3±9,1 ^{aA}	58,4±14,8 ^{aA}	52,6±3,5 ^{aA}	56,3±4,8 ^{aA}	44,6±6,2 ^{aA}	48,5±11,3 ^{aA}
G2	65±11,8 ^{aA}	68,9±13,9 ^{aA}	65,4±5 ^{aA}	67,5±9,7 ^{aA}	39,5±16,8 ^{aA}	53,9±8,6 ^{aA}
G3	38,4±9,6 ^{bA}	34,3±8,3 ^{bA}	61,7±10,6 ^{aA}	60,3±5,2 ^{aA}	39,1±6 ^{aA}	35,1±11,9 ^{aA}

Média±desvio-padrão;^{a,b} – letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si (p<0,05) pelo teste de Student Newman Keuls para os meios diluidores; ^{A, B} – Letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si (p<0,05) pelo teste de Duncan para as temperaturas de descongelamento. G1: Tris-cítrico-gema; G2: Lactose-gema; G3: INRA 82; A: 37°C/30seg.; B: 52°C/10seg seguido de 37°C/30seg.

3.4 – Discussão

Os ejaculados utilizados neste experimento apresentaram parâmetros espermáticos dentro dos padrões preconizados pelo CBRA (1998). Os valores mínimos de motilidade progressiva e vigor exigidos para o congelamento do sêmen foram semelhantes aos utilizados por Bueno et al. (2001a) e Oliveira (2003). É importante manter um padrão homogêneo dos ejaculados utilizados, já que a qualidade do sêmen fresco também é um fator que pode influenciar o desempenho do sêmen descongelado (Farstad, 2000).

Após a centrifugação, não foram observadas diferenças entre as médias dos tratamentos quanto aos parâmetros espermáticos de motilidade total, progressiva e vigor, nos tempos avaliados durante o período de incubação. Houve uma queda maior que 10% da motilidade espermática pós-centrifugação, quando comparada com a motilidade do sêmen fresco. Esta redução não é observada quando o sêmen canino é diluído pré-centrifugação em meios à base de gema de ovo ou leite desnatado (Cunha, 2002; Rijsselaere et al., 2002). Martin et al. (1979) observaram uma diferença de até 10% na motilidade dos espermatozoides eqüinos após a centrifugação, diluídos em glicose-EDTA, quando comparada com o sêmen fresco.

A centrifugação é o método preconizado para padronização do volume e da concentração do sêmen e para eliminação do plasma seminal, conhecido por exercer efeitos negativos sobre o sêmen congelado. Schäfer-Somi et al. (2006), testando a influência da centrifugação sobre o sêmen canino congelado, observaram que a centrifugação pode reduzir a motilidade espermática, mas há uma compensação ao incrementar a motilidade espermática após o descongelamento, por eliminar o plasma seminal.

A centrifugação, no entanto, pode causar efeitos mecânicos sobre as membranas espermáticas, alterar as funções espermáticas e causar lesões de membrana, devido ao aumento na produção das espécies oxigênio reativas, também chamadas de ROS, que está

relacionada com o aumento da peroxidação lipídica na membrana plasmática do espermatozóide (Parinaud et al., 1997; Carvajal et al., 2004).

Para evitar os efeitos indesejáveis da centrifugação, recomenda-se o uso de um protocolo com curta duração e baixa velocidade, sendo a velocidade utilizada neste trabalho próxima à estabelecida por Rijsselaere et al. (2002), que é de 720xg. A diluição do sêmen pré-centrifugação também foi realizada, como o preconizado, porém utilizando meios diluidores sem gema do ovo ou leite desnatado em sua constituição, os quais se mostram importantes no processo de centrifugação (Cunha e Lopes, 1999; Pagl et al., 2006). Estes constituintes são utilizados no intuito de estabilizar a membrana plasmática, exercer efeito osmótico e competir com agentes do plasma seminal por sítios de ligação com a membrana plasmática, como no caso dos tratamentos com o sêmen diluído sem centrifugação (Parks, 1997; Rijsselaere et al., 2002).

A ausência dessas substâncias pode ter influenciado na redução da motilidade e da porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais, e no aumento das anormalidades de peça intermediária, principal e distal, observados após a centrifugação e com 30 minutos de incubação a 37°C em todos os tratamentos.

É interessante utilizar meios de centrifugação sem gema do ovo ou leite desnatado em situações onde novos componentes para o meio de congelamento são testados, para evitar a influência do meio de centrifugação no congelamento. As moléculas da gema ou do leite, durante o processo de centrifugação, podem impregnar a membrana espermática e formar fortes ligações, que podem alterar os resultados no descongelamento, positiva ou negativamente, camuflando os verdadeiros efeitos das substâncias que estão sendo testadas.

Neste contexto, foram poucos os trabalhos encontrados que testaram meios iônicos na centrifugação. Cochran et al. (1984) observaram redução da motilidade após a

centrifugação do sêmen equino, porém não houve influência negativa nos resultados pós-descongelamento. Martin et al. (1979) verificaram que é interessante ressuspender os *pellets* rapidamente após a centrifugação, para diminuir a produção de ROS no aglomerado celular. A ressuspensão feita com outro meio diluidor, de preferência o meio de congelamento, é interessante devido ao maior poder tamponante apresentado por ele, provavelmente pela presença da gema do ovo, essencial em meios de congelamento (Carvajal et al., 2004).

Martin et al. (1979) e Cochran et al. (1984) obtiveram vantagens no uso do meio Glicose-EDTA na centrifugação do sêmen equino. Este diluidor apresenta baixa viscosidade, o que permite maior taxa de sedimentação, sendo perdidos somente 5% de espermatozóides no sobrenadante. Este meio fornece também a glicose, uma fonte energética importante para a motilidade espermática, porém capaz de induz movimentos espermáticos oscilatórios, característicos de hiperativação (Rigau et al., 2001), que podem ter afetado a longevidade dos espermatozóides diluídos neste meio. Este meio foi capaz de manter a integridade funcional da membrana espermática, observada pelo teste hiposmótico.

Não foram encontrados trabalhos testando o Tris-cítrico sem gema no processo de centrifugação. Neste meio está disponível a frutose, que é facilmente metabolizada pelo espermatozóide, fornecendo energia para sua motilidade, caracterizada por movimentos rápidos e lineares (Rigau et al., 2001). Silva (2005) cita que o Tris, além de ser um potente estabilizador de pH, pode atuar controlando o metabolismo da frutose, contribuindo para a preservação de energia, o que pode ter influenciado na menor queda da motilidade nos tratamentos diluídos com este meio, ao longo do período de incubação. A frutose também pode aumentar a viscosidade do meio, contribuindo para a proteção da membrana plasmática, como observado na porcentagem de espermatozóides morfológicamente normais, porém pode atuar negativamente,

diminuindo a taxa de sedimentação (Rijsselaere et al., 2002).

Como o objetivo deste experimento foi encontrar um meio diluidor capaz de preservar o espermatozóide durante a centrifugação, sem a presença da gema do ovo ou do leite desnatado, o meio Glicose-EDTA foi mais eficiente na preservação da integridade funcional da membrana, quando comparado ao meio Tris-cítrico.

Nos estudos em que a máquina computadorizada é utilizada no processo de congelamento, ela geralmente realiza apenas a curva de congelamento (Peña e Linde-Forsberg, 2000a; Schäfer-Somi et al., 2006). A máquina computadorizada utilizada no presente trabalho foi capaz de realizar as curvas de resfriamento e congelamento com quedas controladas e homogêneas, o que permitiu a redução do tempo total gasto em todo o processo, que foi de 160min. A queda de 0,5°C/min é capaz de causar menos danos às células espermáticas, como citado por Bouchard et al. (1990). A velocidade da curva de congelamento de -20°C/min é inferior à preconizada por Hay et al. (1997), porém esta ocorreu de forma homogênea, ao contrário do obtido por Olar et al. (1989) e Peña e Linde-Forsberg (2000b), com variações de velocidade ao longo do processo.

Este tempo foi inferior ao gasto por Oliveira (2003) que resfriou o sêmen canino em caixa de isopor e gelo reciclável e congelou em vapor de nitrogênio. A máquina de congelamento programada se mostrou prática, fácil de transportar e manusear, segura e com baixo gasto de nitrogênio, necessário no processo de congelamento. O uso da máquina permite a eliminação ou diminuição dos efeitos negativos do protocolo de congelamento, que é um dos pontos críticos no processo de criopreservação.

Houve superioridade dos meios Tris-cítrico-gema e Lactose-gema sobre o INRA 82 na preservação dos parâmetros de motilidade espermática, ao longo do teste de termorresistência, e da morfologia espermática normal. Oliveira et al. (1999), ao testarem meios de congelamento para o sêmen canino

com 6% de glicerol, não obtiveram diferença entre Tris-gema e Lactose-gema na manutenção da motilidade progressiva e vigor pós-descongelamento. Olar et al. (1989) relataram que a preservação dos espermatozoides caninos no meio Tris-gema, envasados em palhetas de 0,5mL, é melhor que no meio Lactose-gema, não sendo esta diferença observada no presente trabalho.

O meio Tris-cítrico-gema é o meio diluidor padrão utilizado no congelamento do sêmen canino, obtendo os melhores resultados quanto a qualidade espermática pós-descongelamento, quando associado com o glicerol (Nöthling et al., 2007). Já o meio Lactose-gema é utilizado no congelamento do sêmen canino, apresentando vantagens interessantes sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento (Oliveira et al., 2003).

Vários fatores podem explicar o sucesso destes dois meios diluidores no congelamento do sêmen canino. Primeiramente, ambos possuem carboidratos da classe dos monossacarídeos como fonte primária de energia para os espermatozoides, sendo a glicose fornecida pelo meio Lactose-gema e a frutose, encontrada no plasma seminal, fornecida pelo meio Tris-cítrico. Os monossacarídeos são açúcares simples com seis átomos de carbono (hexose) facilmente metabolizáveis pelos espermatozoides (Berg et al., 2004; Rodrigues-Gil, 2006).

O espermatozoide canino é capaz de metabolizar a frutose e a glicose, a partir de processos distintos, o que resulta na produção de energia para a realização de diferentes funções, inclusive na manutenção da motilidade espermática (Ponglowhapan et al., 2004). Além da diferença dos padrões de motilidade desencadeados por estes monossacarídeos, citados anteriormente, no cão a glicose também é importante na regulação de funções metabólicas, sendo capaz de ativar a proteína quinase AKT, envolvida em uma série de processos celulares (Rodrigues-Gil, 2006).

Porém, além de fonte energética, os monossacarídeos atuam na manutenção da pressão osmótica, na diminuição da

desidratação celular durante o congelamento e na diminuição do ponto crioscópico da água, o que contribui para a manutenção da integridade da membrana plasmática, obtida nos resultados (Johnston et al., 2001).

A morfologia espermática e a integridade funcional e estrutural de membrana dos espermatozoides congelados nestes dois meios diluidores, principalmente no meio Lactose-gema, também apresentaram influência da presença dos carboidratos nos meios. O efeito crioprotetor se baseia na interação direta dos carboidratos com a membrana espermática, ao ocorrer a ligação dos íons hidrogênio dos grupos funcionais hidroxila (-OH) dos carboidratos com o grupo fosfato da cabeça dos fosfolípidos de membrana do espermatozoide, o que contribui na estabilização da membrana plasmática durante o congelamento (De Leeuw et al., 1993).

Neste processo, a lactose, que é um dissacarídeo formado por dois monossacarídeos, galactose e glicose, é mais efetiva que os monossacarídeos (Berg et al., 2004; Cunha, 2002). O dissacarídeo, por apresentar alto peso molecular e não ser metabolizável pelos espermatozoides, funciona como substituto de eletrólitos, realizando efeito osmótico (De Leeuw et al., 1993; Peña, 1997). Chirinéa et al. (2003), avaliando o efeito da adição de diferentes açúcares no meio de congelamento, não obtiveram diferenças entre a lactose, rafinose, sacarose ou glicose quanto a manutenção da motilidade total, progressiva e vigor dos espermatozoides caninos, sendo que a lactose apresentou superioridade na manutenção da integridade de membrana plasmática.

Além disso, o meio Lactose-gema apresenta substâncias em sua composição, como o EDTA e o Equex, que atuam positivamente no congelamento. O EDTA reduz a concentração de cálcio na solução, indisponibilizando-o e diminuindo a chance de ocorrer capacitação espermática. Já o Equex parece solubilizar as lipoproteínas da gema do ovo, aumentando sua ação protetora sobre a célula espermática, aumentando a estabilidade

da membrana espermática (Peña e Linde-Forsberg, 2000a).

O INRA 82, assim como os outros diluidores, conseguiu manter a integridade funcional e estrutural da membrana plasmática, porém não obteve resultados satisfatórios na manutenção da motilidade e da morfologia espermática. Como vantagens, o INRA 82 apresenta em sua composição a presença de três carboidratos, a glicose, a lactose e a rafinose, que é um trissacarídeo com funções parecidas com as da lactose, atuando de forma eficiente na manutenção da integridade celular. Yildiz et al. (2000) citam que a combinação de dois ou mais carboidratos depende de concentrações apropriadas no meio diluidor para promover maior proteção às células. Este fator pode ter influenciado os resultados obtidos no presente trabalho, já que o meio INRA 82 foi formulado para uso em sêmen equino. Nesta espécie, este meio diluidor é utilizado com maior frequência (Vidament et al., 2001; Juliani et al., 2007), apresentando resultados satisfatórios pós-descongelamento. No entanto, Oliveira et al. (2005) obtiveram resultados inferiores no sêmen canino congelado com o meio INRA 82, contendo 6% de glicerol ou dimetil formamida, quando comparado ao meio Tris-gema com 6% de glicerol.

O meio INRA 82 tem uma composição complexa, por conter leite desnatado, glicose, gema do ovo, outros carboidratos, vários sais e HEPES como substância tamponante. Porém, a quantidade de gema do ovo presente é de 2%, que está dentro da faixa de quantidade utilizada para o sêmen equino, porém abaixo do preconizado para o sêmen canino, que é de 20% (Rota et al., 1997; Vidament et al., 2001; Rota et al., 2004).

Linde-Forsberg e Forsberg (1989), citado por Silva et al. (2000), afirmam que o meio de congelamento deve conter concentração de 20% de gema do ovo para que haja proteção eficaz das células espermáticas durante o processamento. A gema do ovo é considerada componente essencial nos meios de congelamento utilizados nas espécies

domésticas, sendo considerada por alguns autores mais importante que o glicerol (Pace e Graham, 1974), com um mecanismo de ação mais complexo que o deste crioprotetor.

O mecanismo de ação do leite desnatado sobre a manutenção da viabilidade espermática não é conhecido. Credita-se às micelas de caseína, principal proteína do leite, a responsabilidade pelo efeito crioprotetor. A lactose do leite parece atuar conjuntamente com a caseína, porém sozinha não é suficiente para garantir a viabilidade espermática pós-descongelamento (Bergeron e Manjunath, 2006).

Santos et al (1999), testando cinco meios de congelamento para o sêmen canino, encontraram melhores resultados nos meios Tris-cítrico-gema e Glicina-citrato, que nos meios Glicose-leite desnatado, Tris-frutose-citrato e lactose a 11%. Estes autores relataram que, apesar do leite desnatado apresentar características favoráveis para a criopreservação do sêmen, como viscosidade, capacidade tamponante, fonte energética e atividade antibacteriana, não há maneira de evitar possíveis reações no leite, como acidificação, com conseqüentes danos à integridade de membrana e aumento no aparecimento de patologias espermáticas. Eilts (2005) verificaram que a motilidade, mas não a integridade de membrana dos espermatozoides caninos, é mais afetada com o transporte em citrato-gema que em leite desnatado. No presente trabalho, no entanto, a motilidade foi o parâmetro espermático mais afetado.

As temperaturas de descongelamento não influenciaram negativamente os resultados obtidos nas avaliações da motilidade espermática, considerando-se a curva de congelamento realizada em máquina computadorizada programada. A viabilidade do uso da temperatura de 37°C por 30 segundos foi verificada por Yildiz et al. (2000), Santos et al. (2001) e Chirinéa et al. (2003). Eilts (2003), citado por Eilts (2005), afirma que o uso de protocolo de descongelamento à temperatura de 55°C por 10 segundos, para palhetas de 0,5mL, é capaz de apresentar

resultados satisfatórios sobre a motilidade espermática do sêmen canino.

Os espermatozoides caninos parecem exibir máxima taxa de sobrevivência quando congelados a $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e descongelados em temperaturas rápidas. Quando estes são congelados em velocidade superior a $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, como é o caso deste experimento, o descongelamento deve ocorrer rapidamente (Yu et al., 2002). Vários autores afirmam obter melhores resultados quando o descongelamento do sêmen canino é feito rapidamente, em temperaturas entre 70 e 75°C , por não permitir a ocorrência de reorganização dos cristais de gelo intracelular (Nöthling et al., 2007). No entanto, não foram observadas diferenças entre as temperaturas de descongelamento testadas quanto à presença de espermatozoides morfológicamente normais, com a funcionalidade da membrana plasmática presente e com a manutenção da integridade estrutural de membrana, o que indica que elas podem ser utilizadas no descongelamento do sêmen canino quando usada curva de congelamento de $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

No presente trabalho, a temperatura de descongelamento de $52^{\circ}\text{C}/10\text{seg}$ seguida de $37^{\circ}\text{C}/30\text{seg}$ obteve maior porcentagem de anormalidades acrossomais que a temperatura de $37^{\circ}\text{C}/30\text{seg}$. Alguns fatores podem influenciar o aparecimento desses defeitos no sêmen canino, como taxa de congelamento, diâmetro da palheta e variação individual (Nöthling e Shuttleworth, 2005).

A possibilidade da temperatura de descongelamento a 52°C ocasionar maior ocorrência de anormalidades acrossomais, de acordo os resultados obtidos, mesmo mantendo a viabilidade espermática, observada a partir dos testes hiposmótico, de fluorescência e da morfologia espermática,

sugere que a temperatura de escolha para o descongelamento seja a de 37°C por 30 segundos. Esta temperatura, além de ser de fácil aplicação prática, já é utilizada no descongelamento do sêmen de várias espécies domésticas à campo, utilizando a mesma água em que é incubado o sêmen pré-inseminação artificial. Por ser uma temperatura próxima do fisiológico, seu uso diminui as chances de perdas espermáticas por falha humana, no momento do descongelamento.

3.5 – Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que o meio Glicose-EDTA foi eficiente na manutenção da integridade funcional da membrana espermática durante o processo de centrifugação. O meio Tris-cítrico também pode ser utilizado como meio de centrifugação, pois é capaz de manter a morfologia espermática normal, porém não foi tão eficiente na manutenção da integridade funcional da membrana espermática.

Para a curva de resfriamento de $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e curva de congelamento de $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$, obtida utilizando-se máquina computadorizada programada, os meios Tris-cítrico e Lactose-gema, foram eficientes na preservação da viabilidade espermática. O meio INRA 82 não apresentou resultados favoráveis no congelamento do sêmen canino.

A temperatura de escolha para o descongelamento do sêmen, nas condições experimentais, foi o de 37°C por 30 segundos, por apresentar menor porcentagem de anormalidades acrossomais e de peça intermediária.

Capítulo 4: Experimento III

Avaliação *in vitro* de células espermáticas caninas congeladas em diluidores com diferentes concentrações de lipoproteínas de baixa densidade da gema de ovo de galinha, nas formas natural e liofilizada

(*In vitro evaluation of canine sperm cells frozen in extenders with different concentrations of natural and lyophilized low-density lipoprotein of hen's egg yolk*)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos das lipoproteínas de baixa densidade (LBD) da gema do ovo, na forma natural (N) e liofilizada (L), sobre a criopreservação do sêmen canino. O delineamento experimental foi o quadrado latino, utilizando quatro cães, quatro períodos e 16 ejaculados, sendo estes divididos em duas alíquotas durante o processamento. Foram testados oito tratamentos utilizando meio Tris-cítrico com 5% de glicerol. T1 e T8: 20% gema (controle); T2: 9,64mg LBDN; T3: 19,28mg LBDN; T4: 24,1mg LBDN e 9,64, 19,28 e 24,1mg de LBDL, correspondendo aos tratamentos T5, T6 e T7, respectivamente. O sêmen fresco foi avaliado quanto a motilidade total, progressiva, vigor, morfologia espermática e teste hiposmótico (HO). As alíquotas de sêmen foram diluídas em Glicose-EDTA e centrifugadas a 755xg/7min, sendo os *pellets* ressuspendidos nos respectivos meios de congelamento. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5mL, na concentração de 100×10^6 sptz/mL, e congelado em máquina computadorizada programada, em curva de resfriamento de 0,5°C/min, da temperatura ambiente até 5°C, período de equilíbrio de 1h e posterior curva de congelamento de -20°C/min, de 5 até -120°C. O descongelamento foi feito a 37°C/30seg., sendo avaliado a motilidade nos tempos 0, 30, 60 e 90min, além de morfologia espermática. Adicionalmente, as alíquotas foram avaliadas quanto a integridade funcional (HO) e estrutural (CFDA/IP) da membrana espermática. Os resultados foram analisados ao testes de ANOVA e Kruskal-Wallis, comparando-se as médias pelo teste de Tukey

a 5% e Dunn a 5%, respectivamente. Os resultados foram semelhantes entre T1 a T5 no tempo 0 para motilidade total ($60 \pm 4,1$; 65 ± 11 ; $57,5 \pm 9,6$; $66,2 \pm 7,5$ e $30 \pm 8,2\%$, respectivamente), progressiva e vigor ($p > 0,05$), sendo que T6 e T7 não apresentaram espermatozoides viáveis. Não houve diferença entre os tratamentos durante o TTR ($p > 0,05$). Quanto ao teste HO, os tratamentos T1 a T5 foram superiores a T6 e T7 ($p < 0,05$). T1 e T4 obtiveram melhores resultados no teste CFDA/IP e morfologia espermática ($p < 0,05$). Pode-se concluir que os meios diluidores contendo LBDN, nas quantidades de 9,64, 19,28 e 24,1mg, foram eficientes na preservação de espermatozoides caninos durante o congelamento.

Palavras-chave: Congelamento, sêmen canino, gema do ovo, lipoproteínas de baixa densidade.

ABSTRACT

The aim of the present research was to evaluate the effects of low-density lipoprotein (LDL) in natural (N) and lyophilized (L) form, on the cryopreservation of canine semen. The experimental design was based on a latin square, using four dogs, four periods and 16 ejaculates, that was divided into two samples during the process. Eight treatments (T) were evaluated, using Tris-citric and 5% glycerol. T1 to T8 were as follows: T1 and T8: 20% egg yolk; T2: 9.64mg LDLN; T3: 19.28mg LDLN; T4: 24.1mg LDLN; T5: 9.64mg LDLL; T6: 16.28mg LDLL; T7: 24.1mg LDLL. Total motility, progressive motility, vigor, spermatic morphology and hypoosmotic test (HOST) were evaluated in fresh semen. The samples

were diluted in Glucose-EDTA extender and centrifuged at 755xg/7min. The pellets were rediluted in T1 to T8 extenders and frozen using a computadorized system in 0.5mL straws with 100×10^6 spermatozoa/mL. Cooling rate was $-0.5^\circ\text{C}/\text{min}$., from room temperature to 5°C , equilibrated at 5°C during 1h, and freezing rate was $-20^\circ\text{C}/\text{min}$., from 5 to -120°C . Immediately post-thaw ($37^\circ\text{C}/30\text{sec}$.), the samples were analysed on motility parameter and during a thermo resistance test (TRT). HOST and fluorescence tests the latter using CFDA/PI and sperm morphology was also evaluated. Kruskal-Wallis and ANOVA tests were used. Means were compare by Dunn and Tuckey tests, respectively ($p < 0.05$), using the Instat program. No difference among T1 to T5 were observed on time 0 to total motility ($60. \pm 4.1$; 65 ± 11 ; 57.5 ± 9.6 ; 66.2 ± 7.5 and $30 \pm 8.2\%$, respectively), progressive motility and vigor ($p > 0.05$). T6 and T7 not showed spermatozoa alived. No difference was observed during TRT test ($p > 0.05$). Using HOST test, T1 to T5 were better than T6 and T7 ($p < 0.05$). The morphology and CFDA/PI test were better in T1 to T4 ($p < 0.05$). These results showed that LDL in nature form was efficient in protecting canine spermatozoa of cryoinjury, in 9.64, 19.28 and 24.1mg used.

Key-words: Freezing, canine semen, low-density lipoprotein, egg yolk.

4.1 - Introdução

Várias pesquisas têm comprovado os efeitos positivos da lipoproteína de baixa densidade da gema do ovo sobre espermatozoides submetidos a baixas temperaturas, sendo considerada a responsável pela resistência espermática ao choque térmico e pelo aumento em sua motilidade e na integridade da membrana plasmática e acrossomal após o descongelamento (Watson, 1981a; Jiang et al., 2007a).

Um fator que desestimulava a extração das lipoproteínas de baixa densidade em escala industrial era seu longo período de duração. Porém, Moussa et al. (2002) desenvolveram

um método de extração rápido e com alto rendimento, o que tornou fácil sua aplicação nos testes de preservação espermática.

Apesar de corresponder a 68% do conteúdo total da gema do ovo de galinha, a extração das lipoproteínas de baixa densidade se torna interessante por separar componentes da gema considerados tóxicos ao espermatozóide, como as lipoproteínas de alta densidade, e permitir a quantificação e padronização da concentração de proteínas a ser adicionada ao meio diluidor (Jolivet et al., 2006).

Atualmente, vários estudos têm sido desenvolvidos no intuito de avaliar os efeitos das lipoproteínas de baixa densidade sobre espermatozoides de várias espécies, quando resfriados ou congelados com meios sem a presença da gema de ovo total. Em estudos realizados no sêmen do varrão, Demianowicz e Strzezek (1996) relataram maior sobrevivência dos espermatozoides resfriados em meio contendo lipoproteínas de baixa densidade em substituição à gema de ovo total. Trabalhos recentes (Moussa et al., 2002; Amirat et al., 2005) também relataram melhora na motilidade e na habilidade fecundante do sêmen congelado em bovinos, o que sinalizou a possibilidade de testá-la em eqüinos (Juliani et al., 2004) e caninos (Varela Júnior, 2005). Nestas espécies, porém, as pesquisas ainda são escassas.

Não foram encontrados estudos utilizando as lipoproteínas na forma liofilizada. A liofilização é um método de estocagem seguro, capaz de manter a estabilidade e a viabilidade de substâncias por longos períodos (Boyer, 1986).

Conhecer a concentração protéica das lipoproteínas de baixa densidade capaz de exercer o efeito crioprotetor sobre os espermatozoides, associado ao efeito da mesma sob a forma liofilizada, pode permitir uma utilização mais racional dessas lipoproteínas, aumentando a produção de meios diluidores a partir de uma única extração, bem como permitir sua estocagem por longos períodos de tempo.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi testar a substituição da gema do ovo de galinha pelas lipoproteínas de baixa densidade, natural e liofilizada, no congelamento do sêmen canino, considerando-se diferentes concentrações protéicas de lipoproteínas.

4.2 - Material e métodos

4.2.1 – Extração, forma de utilização e avaliação química das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de galinha

Extração das lipoproteínas de baixa densidade

A técnica da extração das lipoproteínas de baixa densidade foi realizada segundo Moussa et al. (2002) com alterações, de acordo com o capítulo 2. Foram utilizados ovos frescos oriundos de criatório particular, que foram higienizados com detergente e quebrados manualmente. Após separação da clara, a gema foi rolada em papel filtro para retirada da chalaza e de traços do albúmen. Posteriormente, rompeu-se a membrana vitelínica e aspirou-se um conteúdo conhecido de gema, com o auxílio de uma seringa de plástico estéril, que foi colocado em béquer. Adicionou-se igual volume de solução salina a 0,17M, sendo a solução misturada por uma hora a 4°C.

Em seguida, a solução foi colocada em tubos de centrífuga de plástico e centrifugada^a a 11.400xg por 45 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido, denominado plasma, foi novamente centrifugado nas mesmas condições. O plasma retirado teve seu pH corrigido para 8,7, utilizando-se NaOH 0,1N. O volume final foi mensurado e, a partir dele, calculou-se o volume de solução saturada de sulfato de amônio a ser adicionado para alcançar 50% de saturação, sob agitação constante e refrigeração, utilizando-se uma bureta de vidro graduada. Posteriormente, a solução foi mantida sob agitação constante por

mais uma hora a 4°C, sendo novamente centrifugada a 11.400xg/45min a 4°C.

O sobrenadante recuperado foi dialisado por no mínimo 36 horas em água bidestilada, sendo envasado em membrana de diálise^b para completa retirada do sulfato de amônio, sob agitação constante a 4°C. Foram realizadas várias trocas da água bidestilada, respeitando o intervalo mínimo entre elas de três horas. Posteriormente, a solução foi novamente centrifugada a 11.400xg/45 minutos a 4°C, sendo o resíduo flutuante, rico em lipoproteínas de baixa densidade, retirado com auxílio de espátula e quantificado, seguindo dois procedimentos: uma parte das lipoproteínas de baixa densidade recém-extraídas, denominadas de natural, foi imediatamente adicionada ao meio diluidor, enquanto a outra parte foi liofilizada por 48 horas.

Liofilização das lipoproteínas de baixa densidade

Colocou-se em um tubo de centrífuga graduado um volume de lipoproteínas de baixa densidade inferior a 1/3 do volume total do frasco, que então foi fechado com tampa furada. Em seguida, o tubo de centrífuga foi resfriado em nitrogênio líquido, a um ângulo de 45° em relação à lâmina de nitrogênio, para o congelamento do conteúdo em camadas sobre a parede do tubo. Posteriormente, o tubo de centrífuga contendo a lipoproteína de baixa densidade foi colocado no liofilizador^c, previamente ligado e resfriado a -40°C, e mantido até total secagem das lipoproteínas. Após a liofilização, o material foi armazenado à temperatura de -20°C, em tubo de centrífuga com tampa sem furo, até o uso.

Análises químicas

A matéria seca das lipoproteínas de baixa densidade foi determinada após

^a Centrífuga Beckman J2MC;

^b Spectra/Por – Molecular porous – MNCO: 12-14,000, diameter 29mm.

^c Liofilizador Edwards;

dessecação a 104°C por 24 horas em estufa de secagem^d e expressa em porcentagem. O conteúdo protéico foi determinado utilizando o método de Lowry (1951), sendo expresso pela porcentagem de proteínas na matéria fresca. Já o conteúdo lipídico foi determinado pelo método Soxhlet, sendo expresso pela porcentagem em gramas de lípidos na matéria fresca. A composição protéica foi analisada pela eletroforese em SDS-PAGE. Todas essas técnicas foram descritas no Capítulo 2.

4.2.2 – Congelamento do sêmen canino

Animais

Foram utilizados quatro cães como doadores de sêmen, selecionados após avaliações clínicas e andrológicas prévias. Três deles eram da raça Labrador, com idade entre três e cinco anos, oriundos de criatório comercial, sendo o quarto animal sem raça definida, oriundos do canil da Escola de Veterinária da UFMG. Todos os animais foram mantidos no seu local de origem durante o experimento, recebendo alimentação e água de acordo com a rotina local.

Antes do início do experimento, os animais foram submetidos ao esgotamento das reservas extra-gonádicas, por meio de coletas de sêmen diárias por sete dias consecutivos, sendo iniciada a coleta experimental três dias após o término do esgotamento. As coletas foram realizadas por meio de manipulação digital do pênis a cada 72h, sem a presença de fêmea em estro, segundo a técnica descrita por Linde-Forsberg (1991). A primeira e a segunda fração do ejaculado, identificadas pela coloração, foram coletadas utilizando-se funil de plástico acoplado a tubo de centrífuga de plástico graduado, previamente aquecido a 37°C.

Meios diluidores de centrifugação e congelamento

Foi utilizado o meio Glicose-EDTA para a diluição no processo de centrifugação e o meio básico Tris-cítrico para o congelamento do sêmen, contendo 20% de gema de ovo e 5% de glicerol, de acordo com o Experimento II, capítulo 3. A fórmula, o pH^e e a osmolaridade^f dos meios diluidores estão apresentados no Anexo 9. Os meios testados tiveram a gema de ovo total substituída por lipoproteínas de baixa densidade, levando-se em consideração a quantidade protéica presente na gema do ovo total e nas lipoproteínas, obtida pelo método de Lowry (1951).

Os 20mL de gema do ovo total, utilizados no tratamento controle, apresentaram 120mg de proteínas. A partir desse valor, calculou-se a quantidade protéica presente em 8% desse volume. Essa porcentagem foi estipulada de acordo com os resultados obtidos por Moussa et al. (2002) em bovinos. A partir daí testou-se também 16 e 20% de proteínas. Os valores encontrados foram de 9,64 (8%), 19,28 (16%) e 24,1mg (20%) de proteínas.

O volume de lipoproteínas de baixa densidade natural adicionado nos tratamentos T2, T3 e T4 foram 1,12, 2,24 e 2,8mL, respectivamente. As lipoproteínas de baixa densidade liofilizadas foram ressuspendidas em meio tampão fosfato 0,1M pH 7,0 com Tween 20 a 1%. A diluição foi feita em 3mg/mL, sendo o volume obtido para os tratamentos T5, T6 e T7 de 3,21, 6,42 e 8,0mL, respectivamente. Os volumes descritos para as lipoproteínas de baixa densidade, nas duas formas de apresentação, correspondem às quantidades protéicas calculadas (9,64, 19,28 e 24,1mg, respectivamente).

Avaliação seminal e espermática

Foram coletados quatro ejaculados por animal, um a cada dia durante quatro dias, totalizando 16 ejaculados. Após a coleta, o

^d Estufa de secagem WTB Binder.

^e pHmetro: Digimed DMPH-2;

^f Micro OsmometreTM, modelo 5004, Natick MA – USA.

volume, cor e odor de cada ejaculado foram registrados, sendo realizadas as seguintes avaliações espermáticas: motilidade espermática total, progressiva e vigor, teste de integridade funcional da membrana plasmática e morfologia espermática. O detalhamento dos protocolos para a realização de cada técnica está descrito no Capítulo 3.

Processamento do sêmen para congelamento

A seqüência dos procedimentos realizados para o congelamento e descongelamento de sêmen canino está resumida no Anexo 10. De acordo com a análise microscópica do sêmen fresco, somente ejaculados que apresentaram motilidade progressiva mínima de 80%, vigor ≥ 4 e morfologia espermática $\geq 80\%$ foram submetidos ao congelamento.

Depois de avaliada a motilidade total, progressiva e vigor, bem como coletadas amostras para o teste hiposmótico e avaliação da morfologia espermática, o sêmen foi dividido em duas alíquotas de igual volume, colocadas em tubos de centrifuga de 15mL graduados, sendo diluídas em meio de centrifugação Glicose-EDTA na proporção 1:3. As amostras foram centrifugadas a 755xg por sete minutos. Os sobrenadantes foram descartados, sendo os *pellets* ressuspensos com o meio diluidor a ser testado, até completar 1mL.

Logo em seguida, retirou-se 10 μ l de sêmen para determinação da concentração espermática, na diluição de 1:100 em formol salina, utilizando câmara de Neubauer. A diluição final nos meios de congelamento foi ajustada de forma a obter 100 milhões de espermatozoides/mL. Neste momento, a motilidade espermática progressiva e o vigor foram novamente avaliados.

A alíquota de sêmen diluída foi envasada em palhetas de 0,5mL, vedadas com massa de modelar atóxica, sendo imediatamente colocadas na máquina de congelamento programada[§] (Fig. 4.1A e B). A

curva de resfriamento, da temperatura ambiente até 5°C, foi de -0,5°C/min, sendo as palhetas mantidas nesta temperatura por um período de equilíbrio de uma hora. Posteriormente, iniciou-se a curva de congelamento de -20°C/min, de 5°C a -120°C (Fig. 4.1C), quando as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido, chegando a -196°C. Estas foram armazenadas em botijão de nitrogênio até seu descongelamento. Os tratamentos testados foram:

- T1: Tris-cítrico, 5% glicerol e 20% gema de ovo total (controle);
- T2: Tris-cítrico, 5% glicerol e 9,64mg de lipoproteínas de baixa densidade (LBD) natural;
- T3: Tris-cítrico, 5% glicerol e 19,28mg LBD natural;
- T4: Tris-cítrico, 5% glicerol e 24,1mg LBD natural;
- T5: Tris-cítrico, 5% glicerol e 9,64mg LBD liofilizada;
- T6: Tris-cítrico, 5% glicerol e 19,28mg LBD liofilizada;
- T7: Tris-cítrico, 5% glicerol e 24,1mg LBD liofilizada;
- T8: Tris-cítrico, 5% glicerol e 20% gema de ovo total (controle).

Descongelamento do sêmen e avaliação espermática

O descongelamento das palhetas foi realizado em banho-maria na temperatura de 37°C por 30 segundos, como estabelecido no Capítulo 3. Depois de descongeladas, as amostras de sêmen foram avaliadas quanto a motilidade espermática total, progressiva e vigor, sendo coletadas amostras para morfologia espermática, teste de integridade funcional e integridade estrutural da membrana plasmática e acrossomal do espermatozóide, utilizando os fluorocromos CFDA e IP, como descrito no Capítulo 3. Além disso, foi feito o teste de termorresistência até se obter 5% de motilidade espermática progressiva.

[§] modelo TK3000 - Tetakon.

4.2.3 – Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi quadrado latino, utilizando-se quatro cães, quatro períodos experimentais e oito tratamentos, ao dividir o ejaculado em duas alíquotas, sendo estas independentes. Apesar de haver dois tratamentos controle, a fim de se completar o quadrado latino, a estatística considerou apenas um deles, sendo este escolhido aleatoriamente, por sorteio.

Os resultados das análises subjetivas, como motilidade total, progressiva e vigor, foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, quando as variáveis se mostraram independentes (Tratamentos x Tempo), e pelo

método de Friedman, quando as variáveis se mostraram dependentes (Tempos x Tratamento). As médias foram comparadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn a 5%. Os resultados de morfologia espermática, teste hiposmótico e fluorescência foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

A correlação entre os parâmetros de motilidade (total, progressiva e vigor) e de morfologia, integridade estrutural e funcional da membrana espermática foram calculadas pelo coeficiente de Pearson a 1%. As análises foram feitas utilizando o programa estatístico Instat.

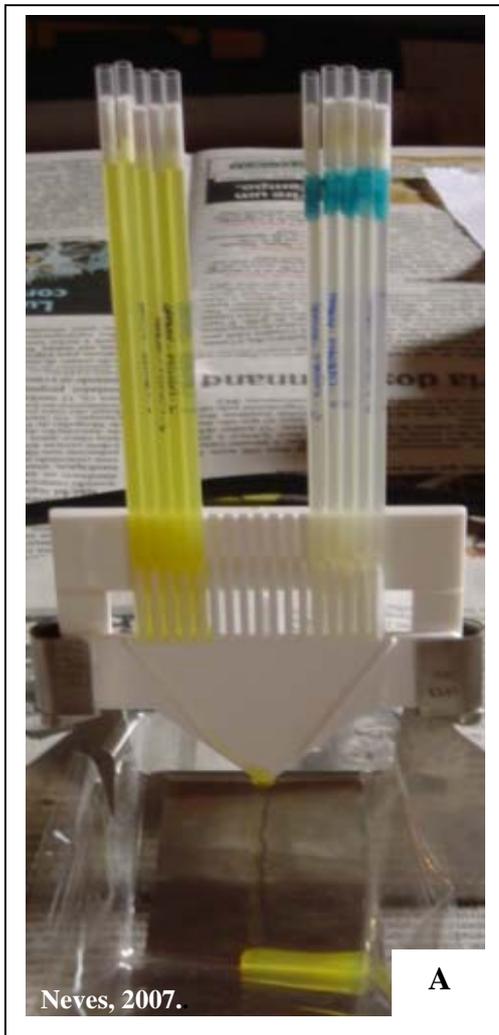


Figura 4.1 – A) sêmen de cão Labrador envasado em palhetas de 0,5mL, diluído em meio Tris-cítrico-gema (Esquerda) e meio Tris-cítrico com 9,64mg de lipoproteínas de baixa densidade na forma natural (Direita); B) máquina de congelamento modelo TK3000 (Tetakon – Brasil); C) palhetas resfriadas iniciando processo de congelamento, numa curva de $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

4.3 - Resultados

Os ejaculados utilizados no experimento apresentaram volume médio de $2,53 \pm 0,9$ mL, considerando-se as duas primeiras frações, motilidade total média foi de $86,9 \pm 3\%$, motilidade progressiva média de $81,9 \pm 3\%$, vigor médio de $4,5 \pm 0,7$ e concentração média de $260,6 \pm 47,2 \times 10^6$ espermatozoides/mL.

Foram utilizados 87 mL de gema de ovo total que resultaram em 52 mL de lipoproteínas de baixa densidade, o que corresponde a um rendimento aproximado de 60%. Os valores obtidos da dosagem de proteínas, teor de lípidos e porcentagem de matéria seca da gema de ovo e das lipoproteínas extraídas estão apresentados na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Teor de matéria seca, dosagem de proteínas e de lípidos da gema de ovo total de galinha e das lipoproteínas de baixa densidade (LBD).

	Matéria seca (%)	Proteínas (mg/mL)	Lípidos (%)
Gema de ovo total	49	6,0	32,3
LBD	39	8,5	29,5

No congelamento, o tempo médio gasto entre a coleta do sêmen e início do resfriamento foi de 41 min. A temperatura da máquina de congelamento, no início do processo, variou de 24 a $26,4^\circ\text{C}$, o que influenciou no tempo gasto para que a temperatura de 5°C fosse alcançada, sendo em média foi de 43 minutos.

Antes de envasar o sêmen nas palhetas, a motilidade progressiva e o vigor foram reavaliados (Fig. 4.2), não sendo encontradas diferenças entre os tratamentos quanto à motilidade progressiva e o vigor avaliados ($p > 0,05$).

Após o descongelamento, foram observadas diferenças entre os tratamentos

para motilidade espermática total, progressiva e vigor no tempo 0 ($p < 0,05$), pois os tratamentos T6 e T7 não apresentaram espermatozoides móveis (Tab. 4.2). Entre os outros tratamentos não houve diferença ($p > 0,05$). O coeficiente de variação da motilidade total e progressiva, no tempo 0, foi menor que 25% nos tratamentos T1 a T4, enquanto que o tratamento T5 apresentou valores superiores a 25%, chegando a 32% para a motilidade progressiva. O vigor espermático apresentou coeficiente de variação menor que 16% nos tratamentos testados.

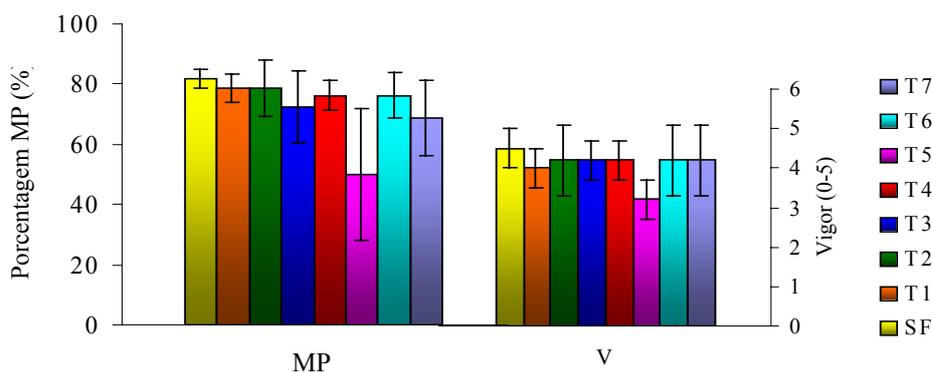


Figura 4.2 – Médias de motilidade progressiva (MP) e vigor (V) apresentadas por espermatozoides caninos recém coletados (SF) e diluídos, após a centrifugação, em meios a base de gema (T1) e de lipoproteínas de baixa densidade, natural (N) e liofilizadas (L), em diferentes concentrações (T2: 9,64mg N; T3: 19,28mg N; T4: 24,1mg N; T5: 9,64mg L; T6: 19,28mg L; T7: 24,1mg L) ($p > 0,05$).

Tabela 4.2 – Motilidade total (MT), progressiva (MP) e vigor (V) de espermatozoides caninos no sêmen fresco e congelado, quando diluído em meio Tris-citríco contendo gema do ovo (T1) e diferentes concentrações de lipoproteínas de baixa densidade (T2 a T7), logo após o descongelamento (tempo 0) (N = média de quatro cães/ tratamento).

Tratamentos	MT (%)	MP (%)	V (0-5)
Sêmen fresco	86,9±3	81,9±3	4,5±0,7
T1	60±4,1 ^a	55±4,1 ^a	3,2±0,5 ^a
T2	65± 11,5 ^a	60±11,5 ^a	4±0 ^a
T3	57,5±9,6 ^a	52,5±9,6 ^a	4±0 ^a
T4	66,2±7,5 ^a	61,2±7,5 ^a	4±0 ^a
T5	30±8,2 ^a	25±8,2 ^a	3,7±0,5 ^a
T6	0 ^b	0 ^b	0 ^b
T7	0 ^b	0 ^b	0 ^b

Média±desvio-padrão; ^{a,b} - Letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes (p<0,05) pelo Teste de Dunn; T1: Tris-citríco com 20% de gema de ovo (Controle); T2: 9,64mg de lipoproteínas de baixa densidade (LBD) natural (N); T3: 19,28mg LBD N; T4: 24,1mg LBD N; T5: 9,64mg LBD liofilizada (L); T6: 19,28mg LBD L; T7: 24,1mg LBD L.

Não houve diferença entre os tratamentos T1 a T5, quando estes foram comparados quanto aos parâmetros de motilidade, total, progressiva e vigor, nos tempos avaliados durante o teste de termorresistência (p>0,05). Também não houve diferença do desempenho do tratamento entre os tempos de incubação (p>0,05). Os espermatozoides apresentaram motilidade progressiva média de 5% após 60±12,2min de incubação em T1, 75±17,3min em T2, 90±24,5min em T3 e 60±24,5 e 60±24,5min em T4 e T5, respectivamente. Não houve diferença estatística entre os tratamentos quanto à queda da motilidade total e progressiva apresentada pelos espermatozoides caninos (p>0,05) (Fig. 4.3).

Quanto à morfologia espermática, foi encontrada maior porcentagem de espermatozoides normais nos tratamentos T1, T2 e T4 (p<0,05), sendo que os tratamentos que utilizaram as lipoproteínas de baixa densidade liofilizadas apresentaram menor porcentagem de espermatozoides normais (Tab. 4.3). Não foi encontrada diferença estatística entre os tratamentos quanto à média obtida para os defeitos de cabeça (média geral de 1,1±1,6%), peça intermediária (4,6±5,7%), peça principal e distal (19,8±9,3%), gota citoplasmática proximal (0,2±0,4%) e distal

(0%) (p>0,05). O tratamento T7 apresentou maior porcentagem de defeitos de acrossoma que os tratamentos T1 a T4 (p<0,05).

No teste hiposmótico, os tratamentos T1 a T5 apresentaram maior porcentagem de espermatozoides reativos que os tratamentos T6 e T7 (p<0,05) (Tab. 4.3). O coeficiente de variação médio encontrado para este teste foi de 23%, sendo o menor valor no T4 (9%) e o maior no T6 (52%).

Quanto à avaliação da integridade estrutural das membranas plasmática e acrossomal (Tab. 4.4), os tratamentos T1 a T5 apresentaram maior porcentagem média de espermatozoides íntegros, quando comparados aos tratamentos T6 e T7 (p<0,05). Não houve diferença entre os tratamentos quanto à categoria *lesado* (p>0,05), sendo que o percentual encontrado para a categoria *semi-lesado* foi menor nos tratamentos T1, T2 e T4 e maior no T6 (p<0,05). O coeficiente de variação dos tratamentos T1 a T4 esteve abaixo dos 20%, enquanto que nos tratamentos com lipoproteínas liofilizadas foi de 42% (T5) a 100% (T7). Já o coeficiente de variação para a categoria *lesado* mostrou-se superior a 40% em todos os tratamentos.

Foi encontrada forte correlação positiva entre os parâmetros de motilidade espermática (total, progressiva e vigor) com a integridade

estrutural da membrana ($r=0,91$; $r=0,90$; $r=0,88$) e com a reatividade positiva ao teste hiposmótico ($r=0,92$; $r=0,91$; $r=0,88$). A

correlação positiva com a morfologia espermática normal ($r=0,68$; $r=0,69$; $r=0,43$) não foi tão expressiva.

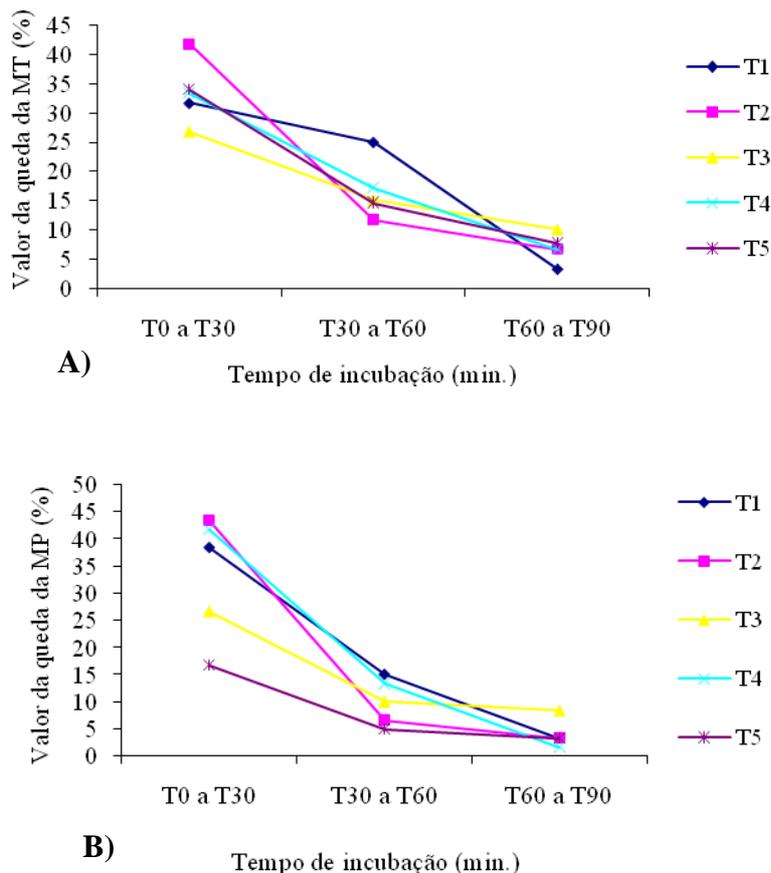


Figura 4.3 – Média da queda da motilidade total (A) e progressiva (B) de espermatozoides caninos descongelados e incubados a 37°C do tempo 0 até T90, diluídos em meio Tris-cítrico contendo 20% de gema de ovo (T1) e lipoproteínas de baixa densidade, natural (N) e liofilizadas (L), em diferentes concentrações (T2: 9,64mg N; T3: 19,28mg N; T4: 24,1mg N; T5: 9,64mg L; T6: 19,28mg L; T7: 24,1mg L) ($p>0,05$).

Tabela 4.3 – Porcentagem de espermatozoides com anormalidades de acrossoma (Acrossoma), morfologicamente normais (Normais) e reativos ao teste hiposmótico (HO) obtida do sêmen canino fresco e congelado em Tris-cítrico contendo 20% de gema do ovo (T1, controle) e diferentes concentrações de lipoproteínas de baixa densidade (T2 a T7) (N = média de quatro cães/ tratamento).

Tratamento	Acrossoma	Normais	HO
Fresco	0,6±0,1	87,5±7,2	91,5±2,7
T1	15,2±10,9 ^b	57,2±10,6 ^a	54±6,7 ^a
T2	11±4,7 ^b	47±7,2 ^a	54,5±11,1 ^a
T3	20,2±8,3 ^b	41,5±9,9 ^{ab}	57,7±13,7 ^a
T4	14,2±7,9 ^b	50,5±7,8 ^a	58,5±5,8 ^a
T5	26±13,9 ^{ab}	29,5±13,1 ^b	42,8±8,7 ^a
T6	26,7±5,4 ^{ab}	33,7±6,2 ^b	6,5±3,4 ^b
T7	40,7±12,3 ^a	29,2±4 ^b	5,7±1,7 ^b

Média±desvio-padrão; ^{a,b} - Letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey; T2: 9,64mg de lipoproteínas de baixa densidade (LBD) natural (N); T3: 19,28mg LBD N; T4: 24,1mg LBD N; T5: 9,64mg LBD liofilizada (L); T6: 19,28mg LBD L; T7: 24,1mg LBD L.

Tabela 4.4 – Porcentagem de espermatozoides lesados, semi lesados e íntegros, obtida no teste de integridade estrutural de membrana plasmática e acrossomal, utilizando CFDA/IP, do sêmen canino congelado em meio Tris-cítrico contendo 20% de gema de ovo (T1, controle) e diferentes concentrações de lipoproteínas de baixa densidade (T2 a T7) (N = média de quatro cães/ tratamento).

Tratamento	Lesados	Semi lesados	Íntegros
T1	22,7±15 ^a	26,3±16,2 ^a	55,7±8,1 ^a
T2	19,3±8,1 ^a	28±13,5 ^a	52,7±6,5 ^a
T3	19,7±8,1 ^a	32±5,3 ^{ab}	48,3±3,1 ^a
T4	19,3±9,8 ^a	29,3±16,5 ^a	51,3±10,7 ^a
T5	21,3±14,7 ^a	40,7±11 ^{ab}	38±16 ^a
T6	32±26,8 ^a	66,3±25,8 ^b	1,7±1,1 ^b
T7	36±18,2 ^a	54,7±9,6 ^{ab}	9,3±9,5 ^b

Média±desvio-padrão; ^{a,b} - Letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey; T2: 9,64mg de lipoproteínas de baixa densidade (LBD) natural (N); T3: 19,28mg LBD N; T4: 24,1mg LBD N; T5: 9,64mg LBD liofilizada (L); T6 – 19,28mg LBD L; T7: 24,1mg LBD L.

4.4 – Discussão

O processo de extração das lipoproteínas de baixa densidade apresentou um rendimento na produção de aproximadamente 60%, próximo aos 67% obtidos por Moussa et al. (2002).

Os valores encontrados para a porcentagem de matéria seca da gema do ovo total e das lipoproteínas estão próximos aos obtidos por Moussa et al. (2002) e por Anton et al. (2003), ao caracterizarem química e estruturalmente as lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de galinha.

Na matéria seca das lipoproteínas obtida, 77% de seu conteúdo correspondeu à porção lipídica, enquanto que os 23% restantes

representaram a porção protéica. Estes resultados são diferentes dos obtidos por Moussa et al. (2002), com 85% de lípidos e 15% de proteínas, e por Anton et al. (2003), que alcançaram valores de 87% de lípidos e 13% de proteínas. Estes autores, no entanto, não deixaram explícito se essas análises foram realizadas em amostras recém-extraídas ou obtidas após passagem pela coluna cromatográfica. A purificação pela filtração em gel separa as proteínas contidas na amostra, permitindo a retirada de possíveis contaminantes, o que pode ter sido a razão da diferença destes resultados com o encontrado neste trabalho. Outra hipótese para explicar as diferenças encontradas pode estar relacionada com a matéria-prima utilizada. Por ser um

produto biológico, o ovo pode apresentar diferenças na sua constituição de acordo com a dieta empregada na granja, tempo de produção e características genéticas das aves (Romanoff e Romanoff, 1963).

Após o descongelamento, os resultados obtidos para motilidade total, progressiva e vigor dos espermatozóides congelados em meios com lipoproteínas de baixa densidade natural foram similares aos do tratamento controle. O coeficiente de variação observado para esses parâmetros se apresentou dentro do esperado estatisticamente para respostas animais, que geralmente oscilam entre 20 e 30% (Sampaio, 1998).

Este resultado é semelhante ao encontrado por Juliani et al. (2004), que obtiveram semelhança entre os tratamentos controle e aqueles contendo lipoproteínas de baixa densidade em diferentes concentrações, no congelamento do sêmen equino. Varela Júnior (2005), congelando o sêmen canino com lipoproteínas de baixa densidade nas concentrações de 6, 8 e 10% em meio Tris-glicose, obteve melhores resultados nestes tratamentos, quando comparados ao meio controle com 20% de gema do ovo. Outros trabalhos também encontraram resultados satisfatórios na utilização das lipoproteínas de baixa densidade no congelamento do sêmen em diferentes espécies, como suínos (Jiang et al., 2007a) e bovinos (Amirat et al., 2004), porém em diferentes concentrações.

A determinação da concentração de 8% de lipoproteínas de baixa densidade a ser testada foi baseada no trabalho de Moussa et al. (2002) em bovinos. Congelando o sêmen em meios comerciais, com 20% de gema do ovo, e meio Tris-cítrico contendo 2,5, 5, 10, 15 e 20% de lipoproteínas de baixa densidade, Moussa et al. (2002) encontraram valores de motilidade espermática superiores ao do tratamento controle nos tratamentos contendo de 5 a 15% de lipoproteínas, sendo o de 5% com melhor valor (54,8%). Posteriormente, estes mesmos autores testaram as concentrações de 5 a 10% de lipoproteínas de baixa densidade, obtendo melhores resultados com as lipoproteínas a 8%.

A porcentagem de espermatozóides morfológicamente normais foi similar entre os tratamentos com lipoproteínas de baixa densidade natural e o controle, os quais apresentaram baixa ocorrência de anormalidades acrossomais. Varela Júnior (2005) obteve maior porcentagem de espermatozóides normais nos tratamentos com lipoproteínas de baixa densidade, independente da concentração testada, quando comparados ao tratamento controle. No entanto, este autor não apresentou as patologias espermáticas observadas.

As lipoproteínas de baixa densidade na forma natural foram tão eficientes quanto o tratamento controle na preservação da integridade funcional da membrana espermática, avaliada pelo teste hiposmótico, independente da concentração utilizada ($p > 0,05$). Jiang et al. (2007a) obtiveram maior sucesso no teste hiposmótico com os meios contendo 8 e 9% de lipoproteínas de baixa densidade, quando comparados ao meio controle Tris-glicose. Amirat et al. (2004) não encontraram diferença significativa entre a porcentagem de espermatozóides bovinos reativos ao teste hiposmótico nos meios Optidyl[®] (46,4%) e Tryladil[®] (47,3%) contendo 8% de lipoproteínas de baixa densidade, provando que a lipoproteína não introduziu mais danos à membrana durante o processo de congelamento.

Essas lipoproteínas também foram capazes de preservar a integridade estrutural da membrana plasmática e acrossomal do espermatozóide, avaliadas pelo teste de fluorescência com CFDA/IP. Jiang et al. (2007b), avaliando a capacidade de preservação da integridade do DNA espermático, observaram que as lipoproteínas de baixa densidade, na concentração de 9%, são eficazes neste processo, porém ainda não se sabe seu mecanismo. Avaliando a integridade acrossomal pelo método FITC-PNA, Jiang et al. (2007a) observaram maior preservação do acrossoma pelos meios contendo as lipoproteínas, independente da concentração, assim como para a atividade

mitocondrial, utilizando o fluorocromo Rhodamina123.

Estes resultados da integridade de membrana, tanto funcional quanto estrutural, correlacionaram-se positivamente com os resultados obtidos para os parâmetros de motilidade espermática avaliados. A correlação positiva entre a motilidade e a presença de espermatozoides íntegros, marcados pelo CFDA, também foi observada por Oliveira (2003), porém em menor intensidade ($r=0,53$). A motilidade e o vigor espermático são dependentes da condição da membrana plasmática do espermatozoide, além de dependerem de outros fatores, como o fornecimento de energia pela célula através da funcionalidade mitocondrial (Bueno et al., 2001a).

Os resultados positivos obtidos nas avaliações espermáticas realizadas no presente trabalho, utilizando as lipoproteínas de baixa densidade na forma natural em substituição à gema do ovo total, bem como os resultados obtidos por diversos autores, principalmente quando as lipoproteínas superaram o tratamento controle, refletem o papel importante desempenhado por estas substâncias na preservação espermática durante o congelamento, independente da espécie animal.

A gema do ovo é reconhecidamente importante na manutenção da capacidade fecundante do sêmen diluído e resfriado e na prevenção de danos celulares que ocorrem durante o congelamento e descongelamento, sendo creditado às lipoproteínas de baixa densidade a responsabilidade por esses efeitos. As lipoproteínas de baixa densidade caracterizam-se por possuir uma estrutura esférica, onde no centro são encontrados triglicérides e colesterol, rodeados por apoproteínas e fosfolípidos, que tornam as lipoproteínas hidrossolúveis (Jolivet et al., 2006).

Várias hipóteses são elaboradas no intuito de elucidar o mecanismo de ação dessas lipoproteínas. Especula-se que as lipoproteínas de baixa densidade promovem a proteção ao espermatozoide pela estabilização

da membrana, ao serem incorporadas na membrana espermática (Foulkes, 1977), porém existem controvérsias a respeito. Outra hipótese sugere que fosfolípidos, presentes nas lipoproteínas de baixa densidade, formam um filme protetor na superfície espermática (Quin et al., 1980) ou são incorporados à membrana espermática, em substituição aos fosfolípidos de membrana perdidos durante o congelamento. Porém, ainda não há a confirmação destas hipóteses, o que aponta para a necessidade de estudos mais específicos sobre sua ação (Bergeron e Manjunath, 2006).

Sabe-se que, durante o processo de congelamento, as lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo são as estruturas da gema que sofrem o processo de gelação. Este processo ocorre em temperaturas abaixo de -6°C , sendo seu primeiro estágio a ruptura da estrutura molecular das lipoproteínas, favorecida pela desidratação causada pelo congelamento. As interações lípidos-proteínas são desfeitas, o que favorece as ligações entre proteínas. Com isso, os triglicérides e os fosfolípidos são liberados no meio, enquanto as apoproteínas formam um gel, que pode rodear a superfície dos espermatozoides, formando um filme protetor que os isolam dos cristais de gelo gerados pelo congelamento (Moussa et al., 2002; Jiang et al., 2007a).

Com relação às lipoproteínas de baixa densidade liofilizadas, os resultados foram inferiores ao esperado, principalmente quando se compara os mesmos com os obtidos pelas lipoproteínas na forma natural. O tratamento contendo 9,64mg de lipoproteínas liofilizadas apresentou porcentagens de espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras e reatividade positiva ao teste hiposmótico similares aos meios contendo lipoproteínas de baixa densidade natural e gema ($p>0,05$), assim como para os parâmetros de motilidade avaliados. Este resultado porém não foi observado para os tratamentos com 19,28mg e 24,1mg de lipoproteínas liofilizadas, que não apresentaram espermatozoides móveis e obtiveram valores para espermatozoides morfológicamente normais, reativos ao teste

hiposmótico e com membranas espermáticas íntegras inferiores aos dos demais tratamentos.

Entre as causas prováveis do insucesso com a forma liofilizada, poder-se-ia levantar as seguintes hipóteses: problemas na estocagem das lipoproteínas de baixa densidade na forma liofilizada, na reorganização das moléculas após a ressuspensão ou no solvente utilizado para ressuspensão.

Em estudos avaliando os métodos de estocagem de lipoproteínas oriundas do sangue, Eldestein et al. (2001) verificaram que as lipoproteínas de baixa densidade podem ser estruturalmente preservadas a baixas temperaturas (-20°C), sem alterar seu padrão eletroforético, assim como as lipoproteínas liofilizadas na presença de criopreservantes, como glicerol. Durante a fase laboratorial de padronização da extração das lipoproteínas de baixa densidade, foram feitas eletroforeses com SDS-PAGE das lipoproteínas recém-extraídas, congeladas a -20°C e liofilizadas. Não foi observada variação no padrão eletroforético das mesmas após dois meses de estocagem a -20°C . Obara et al. (2006) citam que a água pode funcionar como um meio para várias reações, influenciando significativamente os processos de oxidação lipídica e do colesterol. Esta oxidação, no entanto, não é observada no ovo quando liofilizado. Zinellu et al. (2004) citam que a liofilização da lipoproteína de baixa densidade do sangue está menos propensa à oxidação que aquelas estocadas íntegras a 4°C . Não foram encontrados trabalhos estudando métodos de estocagem das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de galinha.

O processo de liofilização retira praticamente toda a água da molécula, principalmente das proteínas, deixando-a em um nível de hidratação menor que 2%. Watson (1976) citado por Watson (1981b) cita que a água é essencial para a organização molecular das lipoproteínas de baixa densidade. Talvez no momento da ressuspensão não tenha ocorrido uma reorganização adequada da estrutura química das lipoproteínas, principalmente daquelas dependentes da

formação de pontes de hidrogênio. Porém, a liofilização é considerada um dos métodos mais seguros para estocagem de fármacos, como antibióticos, sendo também liofilizados hormônios hipofisários e esteróides. A grande característica da liofilização é manter estável e viável as substâncias por um longo período (Boyer, 1986).

Jiang et al. (2007a) citam que a desidratação causada pelo processo de congelamento pode estimular a ruptura da estrutura lipoprotéica. Talvez isso aconteça também nas lipoproteínas durante o processo de liofilização, podendo causar uma alteração na sua estrutura, desestabilizando-as ou inativando-as, apesar de se ter observado motilidade e presença de integridade de membrana em espermatozóides congelados com 9,64mg de lipoproteínas de baixa densidade liofilizada.

Com relação ao solvente utilizado, vários testes foram feitos antes do congelamento do sêmen, visando obter um meio adequado para a reconstituição das lipoproteínas de baixa densidade. Para isso, foram utilizados três critérios: capacidade de solubilização das lipoproteínas, homogenização da solução e a formação de precipitados após a centrifugação da solução. Dentre os 12 meios testados, o tampão fosfato adicionado ao detergente Tween 20 a 1,0% foi um dos mais eficientes na dissolução das lipoproteínas de baixa densidade. Testes preliminares com sêmen congelado em meios contendo a lipoproteína de baixa densidade liofilizada, ressuspensa em diferentes solventes, apresentaram motilidade espermática em três deles. Como o tampão fosfato está próximo à composição das soluções fisiológicas, este foi o critério de seleção final. As lipoproteínas liofilizadas foram ressuspensas na concentração de 3mg/mL, sendo que, quanto maior a quantidade de lipoproteínas utilizadas, maior o volume deste tampão, o que coincidiu com os tratamentos que não apresentaram espermatozóides móveis.

Keyhani e Storey (1973), citados por Jones (1997), observaram que

espermatozoides epididimários de coelhos, quando tratados com tampão fosfato, mantiveram intacta a membrana mitocondrial e sua atividade metabólica, porém apresentaram danos graves na membrana plasmática dos espermatozoides. O aparecimento de lesões na membrana foi observado nos espermatozoides congelados principalmente nos tratamentos com 19,28 e 24,1mg de lipoproteínas liofilizadas, que foram ressuspensas nos volumes de 6,42 e 8mL de tampão fosfato, respectivamente. Os espermatozoides destes tratamentos apresentaram menor porcentagem de espermatozoides íntegros, morfológicamente normais e reativos ao teste hiposmótico, além de alta porcentagem de defeitos de acrossoma ($p < 0,05$). A forte correlação positiva entre os parâmetros de motilidade espermática e os testes de integridade funcional e estrutural de membrana mostram que a redução nestes últimos pode explicar a ausência de motilidade espermática encontrada nestes tratamentos.

Jones (1997) observou atividade mitocondrial em espermatozoides epididimários suínos incubados em meio tampão fosfato a 4°C por até 10 dias, o que poderia explicar a presença de espermatozoides móveis pré-resfriamento e sugerir que os efeitos deletérios do tampão fosfato poderiam atuar de acordo com a temperatura, sendo o congelamento favorável à ação indesejada, e com o tempo de incubação neste meio. Porém, não foi possível explicar a queda da motilidade progressiva que ocorreu com o tratamento contendo 9,64mg de lipoproteínas liofilizadas, antes do resfriamento.

A presença do detergente Tween 20 a 1% também pode ter influenciado nos resultados. Os detergentes têm sido utilizados em meios de congelamento de várias espécies, inclusive na canina. O duodecil sulfato sódico (SDS) é o mais utilizado, sendo um detergente aniônico do grupo alquil, solúvel em água, que age desnaturando proteínas de membrana. Em altas concentrações, ele pode solubilizar completamente as membranas biológicas. No entanto, seu mecanismo de ação no

congelamento de sêmen ainda não é conhecido, sendo sugerido que ele atue no meio extracelular, solubilizando as lipoproteínas da gema do ovo e aumentando seu potencial protetor (Peña, 1997; Cunha, 2002). A adição de 1% (v/v) de SDS no meio diluidor tem apresentado resultados satisfatórios no congelamento do sêmen canino (Rota et al., 1997; Peña e Linde-Forsberg, 2000a).

Enquanto o SDS é considerado um detergente forte, o Tween 20 é um detergente intermediário, de característica não-iônica, muito utilizado na solubilização de membranas celulares em testes de imunodiagnósticos. Ele pode preservar a estrutura biológica e a atividade da membrana, apresentando uma atividade solubilizante ou dissociante menos eficiente que o SDS (Findlay, 1990). Testando detergentes não iônicos na solubilização da membrana plasmática de eritrócitos humanos, Grant e Hjertén (1977) obtiveram menor quantidade de proteínas e fosfolípidos solubilizados destas células com Tween 20, ao compará-lo com outros detergentes não-iônicos.

Não foram encontrados trabalhos utilizando este detergente em meios de congelamento, porém, baseando-se na concentração de SDS utilizada no meio de congelamento para o sêmen canino, pode-se sugerir que a concentração de Tween 20 a 1% (v/v), calculada em relação ao volume do solvente das lipoproteínas liofilizadas, foi baixa, não sendo este o fator desencadeador das alterações de membrana. Talvez a presença do Tween 20 tenha exercido algum efeito deletério sobre os espermatozoides caninos, como a desnaturação da estrutura das proteínas de membrana ou dissociando suas cadeias polipeptídicas, o que pode ter causado as lesões de membrana, observadas nas avaliações espermáticas. São necessários maiores estudos a fim de se aprimorar a técnica de liofilização das lipoproteínas de baixa densidade, bem como o método de ressuspensão.

Analisando o teste de termorresistência, os tratamentos contendo lipoproteínas de baixa

densidade não exerceram efeito negativo sobre os espermatozoides caninos incubados a 37°C, principalmente quando utilizadas na forma natural, ao compará-las com o tratamento controle. Não foi observada diferença entre estes tratamentos nos tempos de avaliação após o descongelamento ($p>0,05$). Também não houve diferença na taxa de queda da motilidade progressiva entre os tempos avaliados ($p>0,05$), sendo observada motilidade menor que 5% aos 90 minutos de avaliação. Os estudos citados no presente trabalho, que substituíram a gema de ovo total por lipoproteínas de baixa densidade, não avaliaram o tempo de longevidade de suas amostras, independente da espécie.

Segundo Peña Martínez (2004), é característica do sêmen canino apresentar baixa longevidade espermática pós-descongelamento. Vários métodos têm sido estudados com o objetivo de aumentar a viabilidade espermática pós-descongelamento, como o uso de detergentes que possuem a fração ativa composta por SDS, como Orvus Es Paste ou Equex STM, porém ainda não se sabe seu mecanismo (Peña e Linde-Forsberg, 2000a).

Nöthling et al. (2005) citam que a diluição do sêmen descongelado em diferentes meios, como solução salina, meio Talp ou até plasma seminal (Nizanski, 2006), pode aumentar a longevidade espermática e a taxa de concepção nas inseminações artificiais intravaginais. Fatores que podem influenciar a qualidade do sêmen congelado é o método de descongelamento e o uso de meios de descongelamento, sendo principalmente utilizado o tampão Tris (Schäfer-Somi et al., 2006).

Como a composição do meio diluidor contribui para a manutenção da viabilidade espermática após o seu descongelamento, o meio Tris-cítrico-frutose utilizado no presente experimento, bem como o glicerol e a gema do ovo, são considerados componentes que garantem uma melhor taxa de motilidade pós-descongelamento (Nöthling et al., 2007). Neste sentido, a substituição da gema do ovo total pelas lipoproteínas de baixa densidade

pode aumentar ainda mais esta taxa, já que a retirada da gema dos meios implica na retirada de substâncias consideradas tóxicas ao espermatozoide. Neste experimento, portanto, a lipoproteína de baixa densidade na forma natural não exerceu efeito deletério sobre a preservação da longevidade espermática pós-descongelamento.

Deve-se considerar, no entanto, um fator crucial no momento da comparação dos nossos resultados com outros trabalhos. Todos os autores citados utilizaram as lipoproteínas de baixa densidade considerando a proporção peso/volume (p/v) ou volume/volume (v/v). No presente trabalho, para calcular a quantidade de lipoproteína a ser testada, utilizou-se como parâmetro a concentração protéica presente na gema do ovo total e na lipoproteína natural e liofilizada, todas em função da proporção de lipoproteínas de baixa densidade presentes na matéria seca da gema do ovo total, obtida pelo método de Lowry, de acordo com Moussa et al. (2002). A quantidade de proteínas presente na molécula de lipoproteínas de baixa densidade é baixa, quando comparada à presença de lípidos, o que faz com que o volume utilizado no presente experimento seja menor que o utilizado por esses autores, que, em contrapartida, forneceram maior quantidade de lípidos e proteínas. Ainda é necessário testar novas quantidades protéicas das lipoproteínas para se estabelecer a quantidade adequada ao processo de criopreservação espermática.

As vantagens existentes em se calcular o volume de lipoproteínas de baixa densidade a ser adicionado a partir de sua concentração protéica, são de permitir o uso racional das lipoproteínas extraídas, o que proporciona a produção de maior quantidade dos meios diluidores usando lipoproteínas de baixa densidade oriundas de uma única extração, evitar efeito tóxico das lipoproteínas de baixa densidade quando utilizadas em excesso e padronizar a concentração protéica ótima, capaz de garantir a proteção espermática durante o processo de congelamento. As proteínas presentes nas moléculas de lipoproteínas de baixa densidade se tornam

peça chave em todo esse processo, porque acredita-se que, apesar da porção lipídica da lipoproteína de baixa densidade ser a responsável pela formação da capa protetora sobre os espermatozóides, a ligação existente entre ela e a membrana espermática se faz por ligação protéica.

Watson (1981b), estudando o papel dos lípidos e das proteínas na preservação do espermatozóide ovino ao resfriamento, relatou que a perda de proteínas pela lipoproteína de baixa densidade pode acarretar um comprometimento da proteção espermática, por impedir a formação do filme protetor sobre a membrana espermática. As ligações protéicas são muito fortes, capazes de manter a ligação entre a lipoproteína de baixa densidade e a membrana espermática mesmo após vários processos de lavagem (Cookson et al., 1984).

As características da lipoproteína de baixa densidade de alta solubilidade, capacidade de formação e estabilização de emulsões estão intimamente relacionadas à formação de um filme entre o óleo e a água dos alimentos. Elas são influenciadas por vários fatores que influenciam as propriedades emulsificantes como flexibilidade molecular, solubilidade e hidrofobicidade (Anton et al., 2003). Este poder emulsificante se deve à

ruptura da molécula de lipoproteína de baixa densidade, liberando apoproteínas e fosfolípidos, sendo as apoproteínas as estruturas mais importantes neste processo (Martinet et al., 2003).

4.5 – Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, concluiu-se que as lipoproteínas de baixa densidade na forma natural foram tão eficientes quanto à gema do ovo na preservação da motilidade e da integridade de membrana dos espermatozóides caninos congelados, na quantidade de 9,64, 19,28 e 24,1mg. Os resultados negativos obtidos para as lipoproteínas de baixa densidade na forma liofilizada evidenciam a necessidade de estudos sobre seu método de liofilização e ressuspensão.

A determinação do volume de lipoproteínas de baixa densidade a ser adicionado aos meios de congelamento, baseada em sua concentração protéica, é um método racional e eficiente, tanto no melhor aproveitamento das lipoproteínas extraídas, quanto na preservação dos espermatozóides congelados.

Capítulo 5: Experimento IV

Avaliação da eficácia da associação de diferentes crioprotetores às lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo sobre a viabilidade de espermatozóides caninos congelados

(Evaluation of efficacy of the association of different cryoprotectants to low-density lipoprotein of hen's egg yolk on canine spermatozoa viability post-thaw)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de crioprotetores no congelamento do sêmen canino, quando associados às lipoproteínas de baixa densidade (LBD) da gema do ovo de galinha. Foram utilizados 4 *pools* de sêmen de oito cães, formados pela mistura do ejaculado de dois cães em cada, que foram analisados quanto à motilidade total (MT), progressiva (MP) e vigor (V), sendo coletadas amostras para morfologia espermática (M) e teste hiposmótico (HO). Posteriormente, o *pool* foi dividido em quatro alíquotas e centrifugado a 755xg/7min, sendo os *pellets* ressuspensos em meio Tris-citríco contendo D1: 20% de gema e 5% de glicerol (controle); D2: LBD a 1,25% e glicerol a 5%; D3: dimetil formamida e D4: etileno glicol, ambos a 5%. Ajustada a concentração a 100×10^6 espermatozóides/mL, as alíquotas de sêmen foram envasadas em palhetas de 0,5mL, sendo processadas em máquina computadorizada, nas curvas de $-0,5^\circ\text{C}/\text{min}$, da temperatura ambiente até 5°C , e $-20^\circ\text{C}/\text{min}$, de 5°C até -120°C . Posteriormente, as palhetas foram imersas e estocadas em nitrogênio líquido. O descongelamento foi feito a 37°C por 30seg, sendo realizadas avaliações de MT, MP, V, M e testes HO e de fluorescência (CFDA/IP), além do teste de termorresistência. Os resultados foram avaliados pelos testes de Kruskal-Wallis e ANOVA, comparando-se as médias pelo teste de Duncan a 5%. Não foi encontrada diferença entre os tratamentos quanto a MT, MP e V, nos tempos T0 e T30 ($p > 0,05$) e morfologia. D4 e D2 apresentaram superioridade nos resultados sobre D1 e D3 no teste HO (D4: $75,0 \pm 6,0$; D2: $64 \pm 6,9$; D1: $46,2 \pm 13,5$ e D3: $48,8 \pm 14,4\%$) e sobre D1 no

teste de fluorescência ($p < 0,05$). Pode-se concluir que o glicerol e o etileno glicol a 5%, em associação à LBD a 1,25%, foram mais eficientes na preservação dos espermatozóides caninos congelados.

Palavras-chave: Congelamento, sêmen canino, lipoproteínas de baixa densidade, crioprotetores.

ABSTRACT

The aim of the present research was to evaluate the effect of cryoprotectants on frozen canine semen associated to low-density lipoprotein (LDL) of hen's egg yolk. Were formed four pools of canine semen, an ejaculate of two dogs for each pool, that were analysed on total motility (MT), progressive motility (PM) and vigor (V), and fresh spermatozoa samples were collected to evaluate morphology (M) and submit them to hypoosmotic test (HOST). The pool were divided into four treatments and centrifuged at 755xg/7min. The pellets were rediluted in tris-citric extender content D1: 20% egg yolk and 5% glycerol (control); D2: 1,25% LDL and 5% glycerol; D3: 5% dimethyl formamide and D4: 5% ethylene glycol. Sperm concentration was adjusted to 100×10^6 spermatozoa/mL, and samples were frozen in 0.5mL straws using a computerized system. Cooling rate was $-0.5^\circ\text{C}/\text{min}$, from room temperature to 5°C and $-20^\circ\text{C}/\text{min}$, from 5 to -120°C . Immediately post-thaw ($37^\circ\text{C}/30\text{sec}$), the samples were analysed on TM, PM, V, HOST, M and submitted to a thermo resistance and CFDA/PI test. Results were evaluated by analysis of variance and Kruskal-Wallis test and Duncan test was used to compare means ($p < 0.05$). No

statistic difference was observed among treatments for TM, PM, V on time zero post-thaw and 30min latter, and by M ($p>0.05$). D4 and D2 showed better results than D1 and D3 for HOST (D4: 75 ± 6 ; D2: 64 ± 6.9 ; D1: 46.2 ± 13.5 ; D3: $48.8\pm 14.4\%$) and than D1 for CFDA/PI test ($p<0.05$). These results suggest that ethylene glycol associated to 1.25% LDL was slightly better in preserving sperm canine viability post thaw evaluated in vitro than other treatments tested.

Key-words: Freezing, canine semen, low-density lipoprotein, cryoprotectants.

5.1 – Introdução

As lipoproteínas de baixa densidade são consideradas as responsáveis pela proteção que a gema de ovo oferece aos espermatozoides durante o congelamento, sendo testadas nos meios diluidores em substituição à gema de ovo total.

Trabalhos recentes relatam melhora na motilidade e na habilidade fecundante de espermatozoides bovinos congelados com as lipoproteínas de baixa densidade, em associação ao glicerol (Moussa et al., 2002; Amirat et al., 2004). Na espécie suína, Jiang et al. (2007a) obtiveram resultado positivo para a motilidade espermática após o descongelamento, em meio Tris-glicose com 9% de lipoproteínas de baixa densidade e 3% de glicerol. Estes resultados foram similares ao relatado por Varela Júnior (2005) em cães, congelando em meio Tris-glicose contendo 6, 8 e 10% de lipoproteínas e 5% de glicerol, tanto sobre a motilidade espermática, quanto sobre a viabilidade das células.

O glicerol é o crioprotetor mais utilizado no congelamento do sêmen canino. Vários estudos foram realizados para descobrir qual a proporção ideal desse crioprotetor a ser adicionada nos meios de congelamento. Os resultados encontrados são variados, indicando uma faixa aceitável de 2 a 8%, sendo esta variação dependente do meio diluidor, da associação com outro crioprotetor e do

protocolo de congelamento utilizado (Rota et al., 1998; Silva et al., 2000).

Apesar do glicerol apresentar propriedades crioprotetoras importantes, ele pode induzir alterações na organização e na viscosidade do citoplasma espermático e na permeabilidade e estabilidade da membrana espermática, através de modificações na organização protéica e fosfolipídica da membrana (Holt, 2000b; Martins-Bessa et al., 2006).

Outros crioprotetores têm sido testados em diversas espécies (Gonzalez, 2004; Squires et al., 2004), inclusive na canina, tais como o etileno glicol e a dimetil formamida (Vannucchi et al., 1999; Zimmermann et al., 2007), como possíveis alternativas para a substituição do glicerol.

O etileno glicol tem apresentado bons resultados em roedores (Carrascosa et al., 2001), porém testes em cães ainda são escassos e apresentam resultados contraditórios (Martins-Bessa et al., 2006). Cavalcanti et al. (2002) obtiveram baixa motilidade pós-descongelamento ao usar o etileno glicol, quando comparado ao glicerol na mesma concentração, enquanto que Soares et al. (2002) encontraram resultados similares quanto à motilidade espermática usando etileno glicol a 0,25, 0,5 e 1,0M e glicerol a 0,8M. Rota et al. (2006), usando 5% de etileno glicol e glicerol com Equex em meio Tris-cítrico, obtiveram resultados positivos para o etileno glicol, considerando os parâmetros de motilidade e integridade de membrana, determinado pelo teste hiposmótico.

A dimetil formamida é muito estudada no congelamento de sêmen da espécie equina, apresentando resultados satisfatórios (Alvarenga et al., 2005). Juliani et al. (2004), congelando sêmen equino em meio lactose-EDTA contendo diferentes concentrações de lipoproteínas de baixa densidade e diferentes crioprotetores a 5%, conseguiram melhores resultados de motilidade nos meios com dimetil formamida associada a 10 ou 20% de lipoproteínas de baixa densidade, que com glicerol.

Na espécie canina, são escassos os trabalhos com este crioprotetor. Oliveira et al. (2005) não obtiveram melhora na motilidade do sêmen canino congelado com INRA 82 e 5% de dimetil formamida, comparando-o com o glicerol na mesma concentração. O mesmo foi observado por Zimmermann et al. (2007), que conseguiu maior motilidade pós-descongelamento em meio Tris-cítrico contendo 6% de glicerol, seguido do meio contendo 7% de dimetil formamida.

Como não foram encontrados trabalhos testando o etileno glicol e a dimetil formamida em associação com as lipoproteínas de baixa densidade no congelamento do sêmen canino, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos destas combinações sobre a motilidade e a integridade funcional e estrutural da membrana espermática de cães.

5.2 – Material e métodos

5.2.1 – Extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo

A técnica da extração das lipoproteínas de baixa densidade foi realizada segundo Moussa et al. (2002), descrita detalhadamente no Capítulo 2. A concentração protéica da gema do ovo total e das lipoproteínas de baixa densidade recém-extraídas foi obtida pelo método de Lowry (Capítulo 2).

5.2.2 – Congelamento do sêmen canino

Animais

Foram utilizados oito cães como doadores de sêmen, selecionados após avaliações clínicas e andrológicas prévias, sendo cinco da raça Labrador e três da raça Shar-pei, com idade entre três e cinco anos, oriundos de criatório comercial. Todos os animais foram mantidos no seu local de origem durante o período experimental, recebendo alimentação e água de acordo com a rotina local.

Antes do início do experimento, os animais foram submetidos ao esgotamento das

reservas extra-gonádicas, por meio de coletas de sêmen diárias por sete dias consecutivos, sendo iniciada a coleta experimental três dias após o término do esgotamento. As coletas foram realizadas por meio de manipulação digital do pênis sem a presença de fêmea em estro, segundo a técnica descrita por Lindforsberg (1991). A primeira e a segunda fração do ejaculado, identificadas pela coloração, foram coletadas utilizando-se funil de plástico acoplado a tubo de centrífuga de plástico graduado, previamente aquecido a 37°C em banho-maria.

Avaliação macroscópica e microscópica do sêmen

Foi coletado sêmen de dois cães por congelamento, para a formação do *pool* de sêmen. Após a coleta de cada cão, o ejaculado foi avaliado macroscopicamente, quanto ao volume, cor e odor, e microscopicamente, quanto a motilidade espermática total, progressiva e vigor.

Posteriormente, estes ejaculados foram misturados em um tubo de centrífuga graduado, sendo analisados novamente quanto a avaliação microscópica. Foram coletadas amostras para a avaliação da integridade funcional da membrana plasmática, realizado pelo teste hiposmótico (HO), e morfologia espermática. O detalhamento dos procedimentos para a realização de cada técnica está descrito no Capítulo 3. Somente ejaculados com motilidade progressiva mínima de 80%, vigor ≥ 4 e morfologia espermática $\geq 80\%$ foram submetidos ao congelamento.

Meios diluidores para centrifugação e congelamento

Neste trabalho, o meio diluidor utilizado na centrifugação foi o Glicose-EDTA e no congelamento o Tris-cítrico (Anexo 11). O tratamento controle apresentou 20% (v/v) de gema do ovo total em sua constituição. Nos outros tratamentos, este componente foi substituído pelas lipoproteínas de baixa densidade, na quantidade de 8,92mg de

proteínas em volume de 1,25mL, que corresponde a 8% do conteúdo da gema do ovo total a ser substituída, como descrito no Experimento III do Capítulo 4.

Foram testados os crioprotetores permeantes glicerol, dimetil formamida e etileno glicol a 5%, associados à 1,25% (v/v) de lipoproteínas de baixa densidade. A osmolaridade^a e o pH^b dos meios foram mensurados para controle (Anexo 11).

Processamento do sêmen para congelamento

A seqüência dos procedimentos realizados para o congelamento e descongelamento de sêmen canino está resumida no Anexo 12.

Imediatamente após a avaliação microscópica, o *pool* de sêmen foi dividido em quatro alíquotas de igual volume, colocadas em tubos de centrifuga graduado de 15mL, sendo diluídas com meio de centrifugação Glicose-EDTA, na proporção 1:3. As alíquotas foram centrifugadas a 755xg/7min. Os sobrenadantes foram descartados, sendo os *pellets* ressuspensos com o meio diluidor a ser testado, até completar 1mL. Logo em seguida, retirou-se 10µL de sêmen para determinação da concentração espermática, na diluição de 1:100 em formol salina, utilizando câmara de Neubauer. A diluição final nos meios de congelamento foi ajustada de forma a obter 100 milhões de espermatozoides/mL.

As alíquotas do *pool* de sêmen foram novamente avaliadas quanto aos parâmetros de motilidade espermática, sendo posteriormente envasadas em palhetas de 0,5mL, vedadas com massa de modelar atóxica e imediatamente colocadas na máquina de congelamento programada^c. A curva de resfriamento foi de -0,5°C/min, da temperatura ambiente até 5°C, sendo as palhetas mantidas nesta temperatura por um período de equilíbrio de uma hora. Posteriormente, iniciou-se a curva de

congelamento de -20°C/min, de 5°C até -120°C, quando as palhetas foram imersas no nitrogênio líquido, chegando a -196°C. Estas foram armazenadas em botijão de nitrogênio até seu descongelamento. Foram testados quatro tratamentos:

- D1: Tris-cítrico, 5% glicerol e 20% de gema de ovo total (controle);
- D2: Tris-cítrico, 5% glicerol e 1,25% de lipoproteínas de baixa densidade (LBD);
- D3: Tris-cítrico, 5% dimetil formamida e 1,25% de LBD;
- D4: Tris-cítrico, 5% etileno glicol e 1,25% de LBD.

Descongelamento e avaliação espermática

O sêmen foi descongelado em banheira, na temperatura de 37°C por 30seg. Posteriormente, os tratamentos foram avaliados quanto ao teste de termorresistência, sendo analisada a motilidade espermática total, progressiva e vigor nos tempos T0, T30 e T60. Foram coletadas amostras de cada tratamento para análise de morfologia espermática, avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática e acrossomal dos espermatozoides, utilizando o teste de fluorescência com os fluorocromos CFDA e IP, avaliação da integridade funcional da membrana espermática (HO), no tempo T0, como descrito no Capítulo 3.

5.2.3 – Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, bloqueando o *pool* de sêmen. Para as análises não-paramétricas, as amostras independentes foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Realizou-se a análise de variância (ANOVA) para os resultados da morfologia espermática, teste hiposmótico e fluorescência, sendo as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5%. Realizou-se a correlação entre os parâmetros espermáticos pelo Coeficiente de Pearson a 5%. As análises foram feitas no programa estatístico Instat.

^a Micro Osmometre™, modelo 5004, Natick MA – USA;

^b pHmetro: DMPH-2, Digimed;

^c Modelo TK3000 - Tetakon.

5.3 – Resultados

Os parâmetros espermáticos dos cães e *pools* espermáticos utilizados estão resumidos na tabela 5.1. O volume maior do sêmen no segundo *pool* é devido à coleta de parte da terceira fração do sêmen de um dos cães, que foi liberada junto com a segunda fração. A média dos *pools* para a concentração espermática, o número de espermatozoides

reativos ao teste hiposmótico e de espermatozoides com morfologia normal foi de $307,5 \pm 20,3$ espermatozoides/mL, $85 \pm 2,5\%$ e $84 \pm 1,2\%$, respectivamente.

Antes de envasar o sêmen, após a centrifugação e a rediluição, cada tratamento foi avaliado quanto a motilidade total, progressiva e vigor, não sendo observada diferença entre os tratamentos ($p > 0,05$). As médias estão apresentadas na tabela 5.2.

Tabela 5.1 – Volume total (mL) do *pool* de sêmen, referente ao ejaculado de dois cães, e motilidade total (MT), progressiva (MP) e vigor (V) dos espermatozoides no sêmen fresco.

<i>Pool</i> de sêmen	Volume total*	MT (%)	MP (%)	V (1-5)
1	5,0	85	80	4
2	11,5	90	85	5
3	4,5	85	80	5
4	3,5	85	80	4

* Volume referente à 1ª e 2ª frações espermáticas.

Tabela 5.2 – Média de espermatozoides com motilidade total (MT), progressiva (MP) e vigor (V) nos *pools* de sêmen canino diluídos em meio Tris-gema com 5% de glicerol (controle) e Tris-1,25% de lipoproteínas de baixa densidade com diferentes crioprotetores (N = média quatro *pools*/ tratamento) ($p > 0,05$).

Tratamentos	MT (%)	MP (%)	V (1-5)
D1	$78,8 \pm 4,8$	$73,7 \pm 4,8$	4 ± 0
D2	$81,2 \pm 7,5$	$76 \pm 7,5$	$4,5 \pm 0,6$
D3	$83,7 \pm 4,8$	$78,8 \pm 4,8$	$4,7 \pm 0,5$
D4	$76,2 \pm 2,5$	$71,3 \pm 2,5$	$4,2 \pm 0,5$

Média±desvio-padrão; D1: Tris-gema com 5% de glicerol; D2: Tris-1,25% (v/v) lipoproteínas de baixa densidade (LBD) e 5% de glicerol; D3: Tris-1,25% (v/v) LBD com 5% de dimetil formamida; D4: Tris-1,25% (v/v) LBD com 5% de etileno glicol.

Ao descongelar o sêmen, as médias obtidas para motilidade total, progressiva e vigor não apresentaram diferença entre os tratamentos ($p > 0,05$), assim como após 30 minutos de incubação a 37°C (Tab. 5.3). A

queda da motilidade total, progressiva e vigor foi grande até os 30 minutos de incubação, sendo que o tratamento contendo etileno glicol apresentou menor perda ($p > 0,05$) (Fig. 5.1).

Tabela 5.3 – Motilidade total (MT), progressiva (MP) e vigor (V) de espermatozoides caninos congelados em meio Tris-cítrico contendo gema de ovo a 20% com 5% de glicerol (controle) e 1,25% (v/v) de lipoproteínas de baixa densidade, em substituição a gema, com diferentes crioprotetores, obtida após descongelamento ($p > 0,05$) (N = média quatro *pools*/ tratamento).

Tratamentos	MT (%)	MP (%)	V (1-5)
D1	$33,5 \pm 26,8$	$22,5 \pm 23,9$	$2 \pm 1,4$
D2	$66,2 \pm 7,5$	$58,7 \pm 4,8$	$3,7 \pm 0,5$
D3	$42,5 \pm 20,2$	$38,7 \pm 19,7$	4 ± 0
D4	$65 \pm 5,8$	$60 \pm 5,8$	$3,7 \pm 0,5$

Média±desvio-padrão; D1: Tris-cítrico-gema com 5% de glicerol; D2: Tris-1,25% (v/v) lipoproteínas de baixa densidade (LBD) e 5% de glicerol; D3: Tris-1,25% (v/v) LBD com 5% de dimetil formamida; D4: Tris-1,25% (v/v) LBD com 5% de etileno glicol.

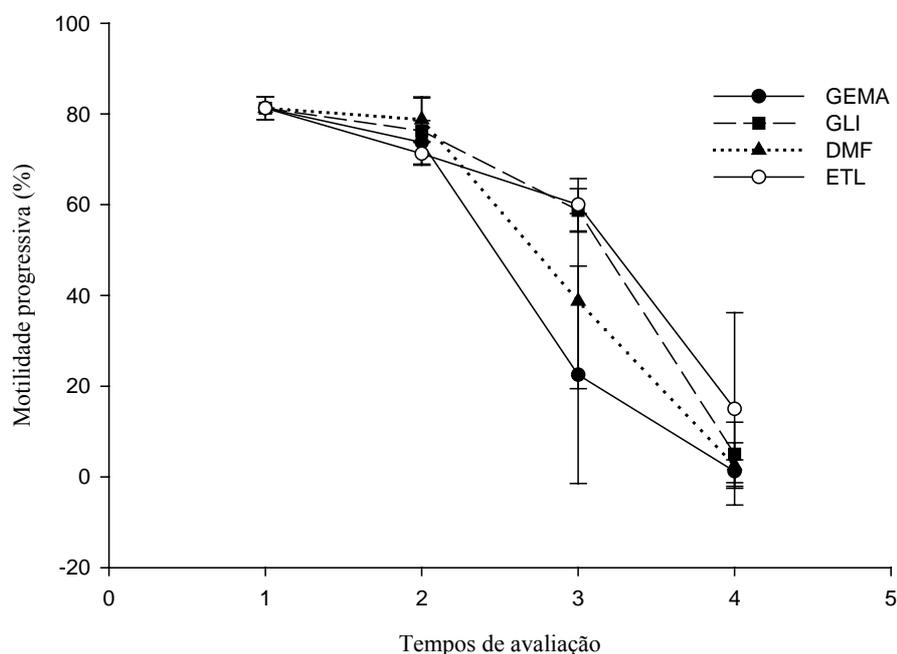


Figura 5.1 – Média de espermatozoides caninos com motilidade progressiva (MP) no sêmen fresco (1), sêmen diluído (2) e no sêmen descongelado nos tempos 0 (3) e 30 (4), utilizando meios contendo 20% de gema e 5% de glicerol (GEMA) e 1,25% (v/v) de lipoproteínas de baixa densidade, em substituição a gema de ovo total, com glicerol (GLI), dimetil formamida (DMF) e etileno glicol (ETL) a 5% (N = média quatro *pools*/tratamento) ($p>0,05$).

Não houve diferença entre os tratamentos quanto à ocorrência de espermatozoides morfologicamente normais ($p>0,05$) (Tab.5.4) e quanto às médias dos defeitos de cabeça (média geral $1,7\pm 1,7\%$), acrossoma ($7,9\pm 5,3\%$), peça intermediária ($5,3\pm 2,7\%$), peça principal e distal ($12\pm 3,2\%$) e a presença de gota citoplasmática proximal ($2,2\pm 2,5\%$) e distal ($0,1\pm 0,2\%$) ($p>0,05$).

Com relação ao teste de integridade funcional da membrana espermática, os tratamentos D2 e D4 apresentaram maiores médias de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico, quando comparados aos tratamentos D1 e D3 (Tab.5.4).

Os meios contendo lipoproteínas de baixa densidade associadas ao glicerol (D2) e ao etileno glicol (D4) apresentaram maior porcentagem média de espermatozoides com

integridade estrutural da membrana plasmática e acrossomal dos espermatozoides, quando comparados ao tratamento D1 ($p<0,05$). Não houve diferença entre os tratamentos quanto à quantidade de espermatozoides com a membrana plasmática lesada e semi-lesada ($p>0,05$) (Tab.5.5). O coeficiente de variação da categoria espermatozoides íntegros foi de 53%, 11%, 15% e 14%, respectivamente para os tratamentos D1, D2, D3 e D4.

Foi obtida correlação positiva entre os parâmetros de motilidade total, progressiva e vigor, com o teste hiposmótico ($r = 0,41$; $r = 53$; $r = 21$, respectivamente), com o teste de fluorescência ($r = 0,28$; $r = 0,51$; $r = 0,47$, respectivamente) e com a morfologia espermática normal ($r = 0,22$; $r = 0,28$).

Tabela 5.4 – Espermatozoides caninos morfologicamente normais (Normais) e reativos ao teste hiposmótico (HO) obtidos após o descongelamento, em meio Tris-gema com 5% de glicerol (controle) e 1,25% (v/v) de lipoproteínas de baixa densidade, em substituição a gema, com diferentes crioprotetores (N = média quatro *pools*/ tratamento).

Tratamentos	Normais (%)	CV (%)	HO (%)	CV (%)
D1	74,7±6,2 ^a	5	46,2±13,5 ^b	30
D2	71,2±5,7 ^a	9	64±6,9 ^a	11
D3	66±3,6 ^a	17	48,8±14,4 ^b	29
D4	71,2±3,9 ^a	10	75±6 ^a	8

Média±desvio-padrão; CV = Coeficiente de variação; ^{a,b} - Letras diferentes na mesma coluna são diferentes (p<0,05) pelo Teste de Duncan a 5%; D1: Tris-gema com 5% de glicerol; D2: Tris-1,25% (v/v) lipoproteínas de baixa densidade (LBD) e 5% de glicerol; D3: Tris-1,25% (v/v) LBD com 5% de dimetil formamida; D4: Tris-1,25% (v/v) LBD com 5% de etileno glicol.

Tabela 5.5 – Porcentagem média de espermatozoides caninos lesados, semi-lesados e íntegros após o descongelamento, avaliados pelo teste de fluorescência com CFDA e IP, em meio Tris-gema com 5% de glicerol (controle) e 1,25% (v/v) de lipoproteínas de baixa densidade, em substituição a gema, com diferentes crioprotetores (N = média quatro *pools*/ tratamento).

Tratamentos	Lesados	Semi-lesados	Íntegros
D1	31,5±12,9 ^a	30,5±31,4 ^b	38±20,4 ^b
D2	27±2,9 ^a	19,7±6,9 ^a	53,2±6,2 ^a
D3	16,2±21,7 ^a	37,5±18,5 ^b	46,2±6,9 ^{ab}
D4	22,2±12,6 ^a	20,5±14,6 ^a	57,2±8 ^a

Média±desvio-padrão; ^{a,b} - Letras diferentes na mesma coluna são diferentes (p<0,05) pelo Teste de Duncan a 5%; D1: Tris-gema com 5% de glicerol; D2: Tris-1,25% (v/v) lipoproteínas de baixa densidade (LBD) e 5% de glicerol; D3: Tris-1,25% (v/v) LBD com 5% de dimetil formamida; D4: Tris-1,25% (v/v) LBD com 5% de etileno glicol.

5.4 – Discussão

A amostra experimental foi constituída por *pools* de sêmen, para que fosse obtido maior número de palhetas por tratamento. O ejaculado canino contém relativamente menor número de espermatozoides que outras espécies domésticas, o que limita o teste de muitos tratamentos em uma única amostra (Eilts, 2005). Isto passa a ser um complicador, quando se deseja realizar testes de fertilização *in vivo*, onde há a necessidade de grande número de doses inseminantes.

Vários estudos utilizam o *pool* de ejaculados de diferentes machos (Hay et al., 1997; Hermansson e Linde-Forsberg, 2002; Okano et al., 2004) e de diferentes raças, dentro do mesmo estudo (Peña e Linde-Forsberg, 2000a; Yu et al., 2002; Nöthling et al., 2005). Existe uma dificuldade em se padronizar os reprodutores a serem utilizados

em experimentos quanto à raça e idade. Sabe-se que alguns machos apresentam maior sobrevivência espermática que outros, devido à variabilidade individual, e que o sêmen de algumas raças se destaca quanto à quantidade de espermatozoides viáveis pós-descongelamento que outras (Batista et al., 2006). Para minimizar essa dificuldade, características do sêmen fresco similares aos quesitos motilidade, concentração e morfologia espermáticas são utilizadas como critérios de seleção para reduzir variações expressivas entre raças.

Antes do resfriamento, as amostras diluídas apresentaram valores de motilidade total próximos ao do sêmen fresco, sendo este resultado semelhante ao obtido por Bueno et al. (2001b). Quanto à motilidade progressiva, o tratamento contendo etileno glicol apresentou menor média que a dimetil formamida, apesar de não haver diferença

entre eles ($p > 0,05$). Neste momento está ocorrendo à fase de equilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular. Como a motilidade espermática é mais sensível a mudanças na osmolaridade que a integridade de membrana (Songsasen et al., 2002), é comum observar uma redução no número de células progressivamente móveis, até que o equilíbrio osmótico seja alcançado. O fato da motilidade total não ter variado suporta esta teoria, mostrando que não houve morte celular ou efeito tóxico do crioprotetor.

Após o descongelamento, não foi observada diferença entre os tratamentos quanto à motilidade espermática total, progressiva e vigor, bem como após 30 minutos de incubação ($p > 0,05$). Os três crioprotetores testados, associados às lipoproteínas de baixa densidade, foram capazes de reequilibrar o ambiente osmótico, após a diluição, e atuar na proteção dos espermatozoides durante o congelamento.

O resultado obtido entre o etileno glicol e o glicerol foi semelhante ao observado por Soares et al. (2002) e Rota et al. (2006), e diferente do observado por Cavalcanti et al. (2002) e Martins-Bessa et al. (2006), mostrando que ainda há controvérsias sobre a possível superioridade do etileno glicol sobre o glicerol no congelamento do espermatozoide canino.

A estrutura química do etileno glicol e do glicerol é muito similar, pois ambos são compostos alcoólicos. O glicerol contém três grupos hidroxilas (-OH) funcionais, que podem aceitar íons hidrogênio da água em seis sítios diferentes, enquanto que o etilenoglicol tem a possibilidade de aceitar íons em quatro sítios de ligação (Keith, 1998). Estas ligações mudam a orientação da molécula de água nos cristais de gelo, criando um ambiente menos nocivo para as células espermáticas, ao limitar a formação e o crescimento dos cristais. Estas ligações também promovem uma estabilização da conformação das proteínas quaternárias da membrana contra a desidratação (Medeiros, 2003).

Como a capacidade dos crioprotetores em proteger as células espermáticas depende,

dentre outros fatores, da habilidade deste em formar pontes de hidrogênio, a dimetil formamida apresenta uma desvantagem, pois tem a capacidade de se ligar ao hidrogênio da água em apenas três sítios de ligação, a metade da capacidade do glicerol. No sêmen equino, a dimetil formamida tem apresentado resultados superiores ao do glicerol na preservação da viabilidade espermática (Gomes et al., 2002; Juliani et al., 2007), principalmente quando utilizada sem a associação com outro crioprotetor (Vidament et al., 2002; Squires et al., 2004).

Utilizando as lipoproteínas de baixa densidade em substituição à gema do ovo total, Juliani et al. (2004) não observaram diferença entre a motilidade dos espermatozoides equinos congelados com os crioprotetores glicerol ou dimetil formamida. Este resultado foi semelhante ao obtido no presente trabalho. Oliveira et al. (2004) e Zimmermann et al. (2007) também não obtiveram superioridade da dimetil formamida na preservação da motilidade dos espermatozoides caninos, quando comparada ao glicerol, em meios contendo gema do ovo a 20%. São poucos os trabalhos testando a dimetil formamida como agente crioprotetor no congelamento do sêmen canino.

Outros fatores que influenciam a capacidade protetora do crioprotetor são seu grau de permeabilidade celular, seu peso e estrutura molecular. Modificações na estrutura molecular alteram o grau de permeabilidade, podendo causar efeitos tóxicos à célula espermática (Keith, 1998).

Apesar de não ter havido diferença entre os tratamentos na manutenção da morfologia espermática normal, o etileno glicol e o glicerol, associados às lipoproteínas de baixa densidade, foram mais eficientes na preservação da integridade estrutural e funcional da membrana espermática, quando comparados com o tratamento controle e com a dimetil formamida e o tratamento controle, respectivamente.

Quanto aos efeitos do etileno glicol e glicerol no congelamento do sêmen canino, Rota et al. (2006) não observaram diferença

quanto ao teste hiposmótico, e Soares et al. (2002) obtiveram resultados semelhantes entre eles quanto a porcentagem de anormalidades espermáticas encontradas.

Já para a dimetil formamida e o glicerol, quando associados às lipoproteínas de baixa densidade, os resultados encontrados quanto a integridade funcional da membrana foi similar ao relatado por Zimmermann et al. (2007). De acordo com Keith (1998), para a dimetil formamida conferir proteção semelhante ao do glicerol, a concentração utilizada tem que ser maior, o que pode conferir maior ou menor dano por efeito tóxico, de acordo com a espécie. As amidas possuem menor viscosidade em relação ao glicerol e maior permeabilidade de membrana, o que diminui a possibilidade de danos celulares por estresse osmótico causado pelo crioprotetor (Medeiros, 2003). Porém, no presente trabalho não foi possível observar vantagens na utilização da dimetil formamida no sêmen canino, tanto ao compará-la com o glicerol quanto ao etileno glicol.

Somente Oliveira (2003) comparou dimetil formamida e etileno glicol no congelamento do sêmen canino, utilizando meio Lactose-gema. A autora obteve resultados favoráveis ao uso da dimetil formamida a 5%, quando comparada com o meio Tris-cítrico contendo 5% de etileno glicol, e semelhantes ao Lactose-gema contendo o etileno glicol em igual concentração.

O etileno glicol tem menor peso molecular (62) quando comparado ao glicerol (92) e à dimetil formamida (73), o que contribui para sua baixa toxicidade e alta permeabilidade celular. Além disso, este crioprotetor apresenta baixa condutividade hidráulica, o que diminui os efeitos do estresse osmótico durante o resfriamento e congelamento. No caso dos cães, a resposta ao choque osmótico é mediada por canais de potássio, que por sua vez parecem ser afetados pelo etileno glicol, talvez por ativar mecanismos de fluxo de íons e de moléculas orgânicas, o que pode contribuir na manutenção da funcionalidade da membrana

espermática (Alvarenga et al., 2005; Rota et al., 2006).

Porém, os efeitos do etileno glicol parecem ser espécie-específico, dependendo da característica da estrutura e dos componentes presentes na membrana espermática (Thirumala et al., 2003; Martins-Bessa et al., 2006). O etileno glicol apresenta resultados negativos no congelamento do sêmen humano (Alvarez e Storey, 1993), similares ao glicerol em eqüinos (Mantovani et al., 2002) e satisfatórios em bovinos (Guthrié et al., 2001) e em cães no presente trabalho, que apresentou correlação positiva entre a integridade estrutural e funcional da membrana com os parâmetros de motilidade espermática.

Avaliando-se os resultados obtidos para os meios contendo glicerol, a semelhança entre os valores obtidos para a motilidade espermática foi diferente da observada por Varela Júnior (2005) e Amirat et al. (2005), que obtiveram valores superiores para os tratamentos contendo lipoproteínas de baixa densidade que o meio controle, com 20% de gema e 5% de glicerol e 20% de gema e 6,4% de glicerol, respectivamente.

Neste caso, o papel das lipoproteínas de baixa densidade na proteção dos espermatozoides se mostrou mais evidente, devido a neutralidade do efeito do glicerol entre os tratamentos. A ruptura da estrutura molecular da lipoproteína de baixa densidade, devido a desidratação causada pelo congelamento, aumenta a interação entre proteínas e lípides (Moussa et al., 2002), formando um agregado de apoproteínas que protegem a célula espermática da crioinjúria. Este fato é comprovado pelos valores obtidos para a integridade de membrana nos tratamentos com gema e glicerol (controle) e lipoproteínas de baixa densidade associadas ao glicerol.

O meio Tris-cítrico-gema apresentou a menor motilidade entre os *pools* e obteve valores inferiores aos observados por outros autores (Santos et al., 2001; Varela Júnior, 2005; Rota et al., 2006). Todos os meios diluidores foram feitos com rigoroso controle

de qualidade, em câmara de fluxo laminar, utilizando vidrarias estéreis, mesmos reagentes e água MilliQ. O meio Tris-cítrico-gema foi o único que sofreu centrifugação a 10.000xg por 60min, antes do armazenamento a -20°C.

A baixa longevidade espermática obtida neste experimento foi semelhante ao encontrado por Rota et al. (2006), ao comparar meios Tris contendo 5% de etileno glicol e glicerol, tanto pelo método subjetivo e quanto pelo programa CASA.

As propriedades inerentes ao etileno glicol apresentam um efeito positivo sobre a preservação da integridade da membrana espermática, que por sua vez influencia na motilidade espermática e vigor. Este efeito é importante quando se compara o etileno glicol e o glicerol, que pode apresentar efeito tóxico ao causar um estresse osmótico, devido a sua passagem lenta para o meio intracelular (Alvarenga et al., 2005). No presente trabalho não foi observado efeito tóxico do glicerol sobre a célula espermática canina, principalmente quando este foi associado às lipoproteínas de baixa densidade (Medeiros, 2003; Martins-Bessa et al., 2006).

Este resultado sugere novamente a influência da presença da lipoproteína de baixa densidade, que se mostra eficiente na preservação da integridade espermática quando associada ao uso do etileno glicol e do

glicerol, nas condições experimentais estudadas. Enquanto a lipoproteína de baixa densidade forma o filme protetor ao redor do espermatozóide, protegendo sua membrana plasmática contra os efeitos da baixa temperatura, e controla a osmolaridade no meio extracelular, os crioprotetores atuam no meio intracelular, diminuindo o ponto crioscópico da água e controlando o processo de desidratação. Entretanto, a tendência do etileno glicol em mostrar maior número de espermatozóides normais se deveu, provavelmente, a sua facilidade em atravessar a membrana espermática, em função do seu maior coeficiente de permeabilidade celular (Vannucchi et al., 1999).

5.5 – Conclusões

Considerando-se os resultados obtidos, pode-se concluir que o glicerol e o etileno glicol, na concentração de 5%, foram capazes de preservar os espermatozóides caninos em meios contendo lipoproteínas de baixa densidade. O etileno glicol é uma alternativa para a substituição do glicerol, enquanto que a dimetil formamida não foi eficaz na preservação da integridade estrutural e funcional da membrana espermática, quando associado às lipoproteínas de baixa densidade.

Capítulo 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os objetivos específicos propostos e os resultados obtidos, pode-se concluir que as lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de galinha podem substituir a gema do ovo total no congelamento do sêmen canino. Este fato permite um avanço importante para a biotecnologia da reprodução, ao considerar que a gema do ovo é um produto biológico que apresenta variações na sua composição, possui substâncias que podem atuar negativamente sobre o espermatozóide, além de ser um risco potencial de contaminação do sêmen, ao carrear patógenos.

O uso das lipoproteínas de baixa densidade na forma natural, extraídas utilizando-se solução saturada de sulfato de amônio a 50%, foi eficaz na preservação do

sêmen canino criopreservado, nas quantidades de 9,64, 19,3 e 24,1mg. O glicerol e o etileno glicol, quando associados às lipoproteínas de baixa densidade na forma natural, apresentaram resultados satisfatórios quanto a viabilidade espermática do sêmen canino após o descongelamento.

Os achados indicam que poder-se-á substituir a gema de ovo total por apenas lipoproteínas de baixa densidade oriundas da gema de ovo total. No entanto, maiores estudos sobre as lipoproteínas de baixa densidade e sua utilização na forma liofilizada devem ser realizados, para aprimorar a sua padronização com o intuito de evoluir para a produção de meios diluidores quimicamente e sanitariamente controlados, permitindo uma comercialização mais segura de gametas.

Capítulo 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁLAMO, D.; BATISTA, M.; GONZÁLEZ, F. et al. Cryopreservation of semen in the dog: use of ultra-freezers of -152°C as a viable alternative to liquid nitrogen. *Theriogenology*, v. 63, p. 73-82, 2005.
- ALUKO, R.E; MINE, Y. Characterization of oil-in-water emulsions stabilized by hen's egg yolk granule. *Food Hydrocolloids*, v. 12, p. 203-210, 1998.
- ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. et al. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Animal Reproduction Science*, v. 89, p. 105-113, 2005.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: glycerol and other polyols as sole cryoprotectant. *Journal of Andrology*, v. 14, p. 199-209, 1993.
- 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.
- AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (Eds). *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 769-789.
- AMIRAT, L.; TAINURIER, D.; JEANNEAU, L. et al. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, v. 61, p. 895-907, 2004.
- AMIRAT, L.; ANTON, M.; TAINURIER, D. et al. 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.
- ANTON, M.; GANDEMER, G. Composition, solubility and emulsifying properties of granules and plasma of egg yolk. *Journal of Food Science*, v. 62, n. 3, p. 484-487, 1997.
- ANTON, M.; GANDEMER, G. Effect of pH on interface composition and on quality of oil-water emulsions made with hen egg yolk. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 12, p. 351-358, 1999.
- ANTON, M.; MARTINET, V.; DALGALARRONDO, M. et al. Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chemistry*, v. 83, n. 2, p. 175-183, 2003.
- APB - AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH. *Protein Purification Handbook*. Sweden: Amersham Pharmacia Biotech, 1999. 103p.
- AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stores stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. 89, p. 65-75, 2005.
- BATISTA, M.; ÁLAMO, D.; GONZÁLEZ, M.G. et al. Influence of the freezing technique (Nitrogen liquid vs ultrafreezes of -152°C) and male-to-male variation over the semen quality in Canarian Matiff breed dogs. *Reproduction in Domestic Animal*, v. 41, p. 423-428, 2006.
- BAUDOT, A.; ODAGESCU, V. Thermal properties of ethylene glycol aqueous solutions. *Cryobiology*, v. 48, p. 283-294, 2004.

- BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. *Bioquímica*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 1059p.
- 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, A.; CRÊTE, M.; BRINDLE, Y. et al. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biology of Reproduction*, v. 70, p. 708-717, 2004.
- BOUCHARD, G.F.; MORRIS, J.K.; SIKES, J.D. et al. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology*, v. 34, n. 1, p. 147-157, 1990.
- BOYER, R.F. *Modern Experimental Biochemistry*. Califórnia: Addison-Wesley, 1986. 584p.
- BUENO, R.; COSTA, E.P.; GUIMARÃES, J.D. et al. Qualidade espermática do sêmen criopreservado de cães. I – Efeito do meio diluidor. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 53, n. 3, p. 364-371, 2001a.
- BUENO, R.; COSTA, E.P.; GUIMARÃES, J.D. et al. Qualidade espermática do sêmen criopreservado de cães. II – Efeito do protocolo de resfriamento. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 53, n. 3, p. 372-379, 2001b.
- BURLEY, R.W.; SLEIGH, R.W. Hydrophobic chromatography of proteins in urea solutions. *Biochemistry Journal*, v. 209, p. 143-150, 1983.
- BURLEY, R.W.; EVANS, A.J.; PEARSON, J.A. Molecular aspects of the synthesis and deposition of hen's egg yolk with special reference to low-density lipoprotein. *Poultry Science*, v. 72, p. 850-855, 1993.
- CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Métodos de avaliação do sêmen canino congelado. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 29, n. 3/4, p. 179-187, 2005.
- CARRASCOSA, R.E.; MARTINI, A.C.; PONZIO, M.F. et al. Storage of *Chinchilla lanigera* semen at 4°C for 24 or 72 h with two different cryoprotectants. *Cryobiology*, v. 42, p. 301-306, 2001.
- CARROLL, R.M.; RUDEL, L.L. Lipoprotein separation and low density lipoprotein molecular weight determination using high performance gel-filtration chromatography. *Journal of Lipid Research*, v. 24, p. 200-207, 1983.
- CARVAJAL, G.; CUELLO, C.; RUIZ, M. et al. Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. *Journal of Andrology*, v. 25, n. 3, p. 389-395, 2004.
- CASSANI, P.; BECONI, M.T.; O'FLAHERTY, C. Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen. *Animal Reproduction Science*, v. 86, p. 163-173, 2005.
- CAUSERET, D.; MATRINGE, E.; LORIENT, D. Ionic strength and pH effects on composition and microstructure of yolk granules. *Journal of Food Science*, v. 56, n. 6, p. 1532-1536, 1991.
- CAVALCANTI, M.C.O.; MOURA, C.S.; GUERRA, M.M.P. et al. Ação crioprotetora do glicerol e etileno glicol no congelamento do sêmen do cão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 26, p. 174-176, 2002.
- CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. *Manual para exame andrológico e*

avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P. ANDRADE, A.F.C. et al. Simultaneous evaluation of the plasmatic, acrosomal and mitochondrial membranes in equine spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15, 2004. Brasil. *Proceedings...* Porto Seguro: Brasil. 2004. p. 511.

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

CHIRINÉA, V.H.; MARTINS, M.I.M.; SOUZA, F.F. et al. Efeito da suplementação de diferentes açúcares no meio de congelamento de sêmen de cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 27, n. 3, p. 361-363, 2003.

COCHRAN, J.D.; AMANN, R.P.; FROMAN, D.P. et al. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology*, v. 22, n. 1, p. 25-38, 1984.

CONCANNON, P.W.; BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: KIRK. *Current Veterinary Therapy-small animal practice*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1989. p. 1247-1259.

COOKSON, A.D.; THOMAS, A.N.; FOULKES, J.A. Immunochemical investigation of the interaction of egg-yolk lipoproteins with bovine spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 70, n. 2, p. 599-604, 1984.

CORDLE, S.R.; CLEGG, R.A.; YEAMAN, S.J. Purification and characterization of bovine lipoproteins: resolution of high density and

low density lipoproteins using heparin-Sepharose chromatography. *Journal of Lipid Research*, v. 26, p. 721-725, 1985.

CROSS, N.L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biology of Reproduction*, v. 41, n. 4, p. 635-641, 1989.

CUNHA, I.C.N. *Criopreservação do sêmen de cães*. 2002. 144f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

CUNHA, I.C.N.; LOPES, M.D. Efeitos da centrifugação sobre a qualidade do sêmen canino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 23, n. 3, p. 306-308, 1999.

DE LEEUW, F.E.; DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.G. et al. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds of bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, v. 30, p. 32-40, 1993.

DE LOS REYES, M. Congelación de semen. In: GOBELLO, C. (Ed). *Temas de reproducción de caninos y felinos por autores latinoamericanos*. Buenos Aires: Latina, 2004. p. 17-26.

DEMIANOWICZ, W.; STRZEZEK, J. The effect of lipoprotein fraction from egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. *Reproduction on Domestic Animal*, v. 31, p. 279-280, 1995.

DI SANTIS, G.W. *Estudo morfológico, morfométrico e imunoistoquímico de próstatas caninas normais e hiperplásicas*. 2003. 87f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

- DORADO, J.; RODRÍGUEZ, I.; HIDALGO, M. Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology*, v. 68, p. 168-177, 2007.
- DYER-HURDON, J.N.; NNANNA, I.A. Cholesterol content and functionality of plasma and granules fractionated from egg yolk. *Journal of Food Science*, v. 58, n. 6, p. 1277-1281, 1993.
- ECOT, P.; VIDAMENT, M.; de MORNAC, A. et al. Freezing of stallion semen: interactions among cooling treatments, semen extenders and stallions. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 56, p. 141-150, 2000. Suppl.
- EILTS, B.E. Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. *Theriogenology*, v. 64, n. 3, p. 692-697, 2005.
- ELDESTAIN, C.; HINMAN, J.; MARCOVINA, S. et al. Properties of human free apolipoprotein(a) and lipoprotein (a) after either freezing or lyophilization in the presence and absence of cryopreservatives. *Analytical Biochemistry*, v. 288, p. 201-208, 2001.
- ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 47, p. 243-255, 1993. Suppl.
- ENGLAND, G.C.W.; ALLEN, W.E. Factors affecting the viability of canine spermatozoa. II. Effects of seminal plasma and blood. *Theriogenology*, v. 37, n. 2, p. 373-381, 1992.
- ENGLAND, G.; LOFSTEDT, R. Canine reproduction seminar. USA: Atlantic veterinary College, 2000. 64p.
- EVANS, A.J.; BURLEY, R.W. Proteolysis of apoprotein B during the transfer of very low density lipoprotein from hen's blood to egg yolk. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 262, n. 2, p. 501-504, 1987.
- EVANS, R.J.; BANDEMER, S.L.; DAVIDSON, J.A. et al. 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.
- EVANS, R.J.; BAUER, D.H.; VAGHEFI, S.B. et al. Influence of feeding cottonseed oil to laying hens on the low density lipoproteins of their eggs. *Journal of Nutrition*, v. 99, p. 485-490, 1969.
- EVANS, R.W.; SETCHELL, B.P. Association of exogenous phospholipids with spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 53, n. 2, p. 357-362, 1978.
- FARSTAD, W. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*, v. 53, n. 1, p. 175-186, 2000.
- FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. *Canine and feline endocrinology and reproduction*. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. 487p.
- FINDLAY, J.B.C. Purification of membrane proteins. In: HARRIS, E.L.V.; ANGAL, S. (Eds). *Protein purification application: a practical approach*. Oxford: IRL, 1990. Cap. 4, p. 59-82.
- 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, n. 2, p. 277-284, 1977.
- FOULKES, J.A.; STEWART, D.L. Fertility of dairy cattle after artificial insemination with semen frozen in a lipoprotein diluent. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 51, n. 1, p. 175-177, 1977.
- FOULKES, J.A.; SWEASEY, D.; GOODEY, R.G. Fertility of bull spermatozoa in egg-yolk diluents of varied lipid fatty acid composition.

- Journal of Reproduction and Fertility*, v. 60, n. 1, p. 165-169, 1980.
- GARCIA, S.M.L.; FERNÁNDEZ, C.G. *Embriologia*. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. 416p.
- GHOSHI, S.; COUPLAND, J.N. Factors affecting the freeze-thaw stability of emulsions. *Food Hydrocolloids*, v. 22, p. 105-111, 2008.
- GILMORE, J.A; LIU, J.; PETER, A.T. et al. Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Biology of Reproduction*, v. 58, p. 28-36, 1998.
- GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F.; MEDEIROS, A.S.L. et al. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology*, v. 58, n. 1, p. 277-279, 2002.
- GONZALEZ, R.A.F. *Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozôide bovino*. 2004. 94f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga.
- GORNALL, D.A.; KUKSIS, A. Alterations in lipid composition of plasma lipoproteins during deposition of egg yolk. *Journal of Lipid Research*, v. 14, p. 197-205, 1973.
- GRAHAM, J.K.; FOOTE, R.H. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*, v. 24, p. 42-52, 1987.
- GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, v. 64, n. 3, p. 492-504, 2005.
- GRANT, D.A.W.; HJERTÉN, S. Some observations on the choice of detergent for solubilization of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry Journal*, v. 164, p. 465-468, 1977.
- GRAVANCE, C.G.; GARNER, D.L.; BAUMBER, J. et al. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology*, v. 53, n. 8, p. 1691-1703, 2000.
- GUTHRIE, H.D.; LIU, J.; CRITSER, J.K. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v. 67, n. 6, p. 1811-1816, 2002.
- HANADA, A.; NAGASE, H. Cryopreservation effects of some amides on rabbit spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 60, n. 1, p. 247-252, 1980.
- HARRIS, E.L.V. Concentration of the extract. In: HARRIS, E.L.V.; ANGAL, S. (Eds). *Protein Purification Methods: a practical approach*. New York: IRL, 1992. p. 125-161.
- 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.
- HAY, M.A.; KING, W.A.; GARTLEY, C.J. et al. Canine spermatozoa - cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology*, v. 48, n. 8, p. 1329-1342, 1997.
- HERMANSSON, U.; LINDE-FORSBERG, C. Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. In: EUROPEAN VETERINARY SOCIETY FOR SMALL ANIMAL REPRODUCTION, 3, 2002, Liège. *Proceedings...* Bélgica: L'Université de Liège, 2002. p. 107-108.
- HILLYARD, L.A; WHITE, H.M.; ABRAHAM, S. Microcomplement fixation and

- particle size of chicken lipoproteins. *Journal of Lipid Research*, v. 21, p. 913-920, 1980.
- HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, v. 53, n. 1, p. 47-58, 2000a.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, n. 1-3, p. 3-22, 2000b.
- HORI, T.; ODAKA, S.; OBA, H. et al. Effects of liquid nitrogen vapor sensitization conditions on the quality of frozen-thawed dog spermatozoa. *Journal of Veterinary Medicine and Science*, v. 68, n. 10, p. 1055-1061, 2006.
- ITOH, T.; ABE, Y.; ADACHI, S. Comparative studies on the α e β -Phosvitin from hen's egg yolk. *Journal of Food Science*, v. 48, n. 5-6, p. 1755-1757, 1983.
- JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEM, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M. et al. 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. 47, n. 1, p. 219-228, 1984.
- JIANG, Z.; LI, Q.; LI, W. et al. Effect of low-density lipoprotein on DNA integrity of freezing-thawing boar sperm by neutral comet assay. *Animal Reproduction Science*, v. 99, p. 401-407, 2007a.
- JIANG, Z.; LI, Q.; HU, J. et al. Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low-density lipoprotein in diluents. *Cryobiology*, v. 54, p. 301-304, 2007b.
- JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. *Canine and feline theriogenology*. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. 569p.
- JOLIVET, P.; BOULARD, C.; BEAUMAL, V. et al. Protein components of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 4424-4429, 2006.
- JONES, A.R. Metabolic activity of hypotonically treated mature boar spermatozoa. *Reproduction and Fertility Development*, v. 9, n. 6, p. 583-586, 1997.
- JULIANI, G.; HENRY, M.; MELO, M.I.V. Freezing of equine semen in extenders with low density lipoproteins. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15, 2004. Porto Seguro. *Proceedings...* Porto Seguro: BCAR. 2004. p. 498.
- JULIANI, G.; PEREZ OSORIO, J.; LAGARES, M.A. et al. Efeito da adição fracionada da dimetil formamida na criopreservação da célula espermática equina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17, 2007. Curitiba. *Anais...* Curitiba: Brasil. 2007. p. 167.
- KEITH, S.L. Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa, 1998. 116f. Dissertação (Master of Science) – Escola de Veterinária, Universidade Estadual do Colorado, Colorado.
- KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction*, v. 49, p. 1202-1207, 1993.
- KUKSIS, A. Yolk lipids. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1124, n. 3, p. 205-222, 1992.
- KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*, v. 39, n. 6, p. 1279-1289, 1993.

- KUTZLER, M.A. Semen collection in the dog. *Theriogenology*, v. 64, n. 3, p. 747-754, 2005.
- LE DENMAT, M.; ANTÓN, M.; BEAUMAL, V. Characterisation of emulsion properties and of interface composition in O/W emulsions prepared with hen egg yolk, plasma and granules. *Food Hydrocolloids*, v 14, p. 539-549, 2000.
- LINDE-FORSBERG, C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Veterinary Clinics of North America – Small Animal Science*, v. 21, n. 3, 1991.
- LINDE-FORSBERG, C.; STROM HOLST, B.; GOVETTE, G. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology*, v. 52, p. 11-23, 1999.
- 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.
- MACDONALD, B.J.; FOULKES, J.A. A spectrofluorometric investigation, using 1-anilino-naphthalene-8-sulphonate, of the interaction between washed bovine spermatozoa and seminal plasma or egg-yolk lipoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 63, n. 2, p. 407-414, 1981.
- 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.
- MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A. et al. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biology of Reproduction*, v. 67, p. 1250-1258, 2002.
- MANTOVANI, R., ROTA, A.; FALOMO, M.E. et al. Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: semen quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test. *Reproduction and Nutrition Development*, v. 42, p. 217-226, 2002.
- MARGOLIS, S. Separation and size determination of human serum lipoproteins by agarose gel filtration. *Journal of Lipid Research*, v. 8, p. 501-507, 1967.
- MARTIN, J.C.; KLUG, E. GUNZEL, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 27, p. 47-51, 1979. suppl.
- MARTINET, V.; SAULNIER, P.; BEAUMAL, V. et al. Surface properties of hen egg yolk low-density lipoproteins spread at the air-water interface. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, v. 31, n 1-4, p. 185-194, 2003.
- MARTINS-BESSA, A.; ROCHA, A.; MAYENCO-AGUIRRE, A. Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders. *Theriogenology*, v. 66, p. 2047-2055, 2006.
- MC BEE, L.E.; COTTERILL, O.J. Ion-exchange chromatography and electrophoresis of egg yolk proteins. *Journal of Food Science*, v. 44, p. 656-667, 1979.
- MEDEIROS, A.S.L. *Utilização de diferentes tipos de amidas como agentes crioprotetores para espermatozoides de garanhões*. 2003, 96f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, v. 57, n. 2, p. 327-344, 2002.

- MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A. et al. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v. 57, p. 1695-1706, 2002.
- NILSSON, L.; OSMARK, P.; FERNANDEZ, C. et al. Competitive adsorption of water soluble plasma proteins from egg yolk at the oil/water interface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 6881-6887, 2006.
- NIZÁNSKI, W. Intravaginal insemination of bitches with fresh and frozen-thawed semen with addition of prostatic fluid: use of an infusion pipette and the Osiris catheter. *Theriogenology*, v. 66, p. 470-483, 2006.
- NÖTHLING, J.O.; SHUTTLEWORTH, R. The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. *Theriogenology*, v. 63, p. 1469-1480, 2005.
- NÖTHLING, J.O.; SHUTTLEWORTH, R.; HAAS, K. et al. Homologous prostatic fluid added to frozen-thawed spermatozoa prior to intravaginal insemination of bitches resulted in better fertility than albumin-free TALP. *Theriogenology*, v. 64, p. 975-991, 2005.
- NÖTHLING, J.O.; DOLIESLAGER, S.M.J.; FILLEKES, R. et al. Thawing dog spermatozoa in just-boiled water: Submersion time and effect on sperm quality compared to thawing in water at 70°C. *Theriogenology*, v. 68, p. 530-537, 2007.
- OBARA, A.; OBIEDZINSKI, M.; KOLCZAK, T. The effect of water activity on cholesterol oxidation in spray- and freeze-dried egg powders. *Food Chemistry*, v. 95, p. 173-179, 2006.
- OKANO, T.; MURASE, T.; ASANO, M. et al. Effects of final dilution rate, sperm concentration and times for cooling and glycerol equilibration on post-thaw characteristics of canine spermatozoa. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 66, n. 11, p. 1359-1364, 2004.
- OKAZAKI, M.; HARA, I. Lipoprotein separations by high performance gel permeation chromatography. In: HANCOCK, W.S. *Handbook of HPLC for the separation of amino acids, peptides, and proteins*. Florida: CRC, 1989. v. 2, p. 393-403.
- OLAR, T.T.; BOWEN, R.A.; PICKETT, B.W. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology*, v. 31, n. 2, p. 451-461, 1989.
- OLIVEIRA, E.C.S. *Efeito de diferentes diluidores sobre a criopreservação do sêmen canino*. 2003. 61f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- OLIVEIRA, E.C.S.; JULIANI, G.C.; HENRY, M. et al. Viabilidade *in vitro* do sêmen canino submetido a congelamento com diferentes diluidores e crioprotetores. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 27, n. 3, p. 363-365, 2003.
- OLIVEIRA, E.C.S.; JULIANI, G.C.; MARQUES JR., A.P. et al. Morphological and structural evaluation of dog spermatozoa cryopreserved in different extenders In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CANINE AND FELINE REPRODUCTION, 5, 2004, Embú das Artes. *Proceedings...* Embú das Artes: BCAR, 2004. p. 233-234.
- OLIVEIRA, E.C.S.; JULIANI, G.C.; HENRY, M. Comparação entre os diluidores INRA82 e Tris associados aos crioprotetores glicerol e dimetilformamida na preservação de sêmen canino utilizando técnica de congelamento computadorizada. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO

- ANIMAL, 16, 2005, Goiânia. *Anais...Goiás: CBRA*, 2005. p. 1.
- OLIVEIRA, J.V.L.; BARRETO, C.S.; FILHO, A.L.R. Avaliação de sêmen canino pós-descongelamento utilizando-se tris-gema e lactose-gema em quatro diferentes períodos de equilíbrio. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 23, n. 3, p. 308-309, 1999.
- PACE, M.M.; GRAHAM, E.F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *Journal of Animal Science*, v. 39, n. 6, p. 1144-1149, 1974.
- PAGL, R.; AURICH, J.E.; MÜLLER-SCHLÖSSER, F. et al. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5°C. *Theriogenology*, v. 66, p. 1115-1122, 2006.
- PALMER, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: *Proceedings of the 10 International Congress on Animal Reproduction Artificial Insemination*, v. 3, p. 377-378, 1984. Abstract.
- PARINAUD, J.; LE LANNOU, D.; VIEITEZ, G. et al. Enhancement of motility by treating spermatozoa with an antioxidant solution (Sperm-Fit®) following ejaculation. *Human Reproduction*, v. 12, n. 11, p. 2434-2436, 1997.
- PARKS, J.E. Hypothermia and mammalian gametes. In: KAROW, A.M.; CRISTSER, J.K. (Eds). *Reproductive tissue banking*, scientific principles. London: Academic, 1997. p. 229-261.
- 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 lipoprotein on sperm cholesterol and phospholipids. *Biology of Reproduction*, v. 24, p. 393-398, 1981.
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v. 38, p. 209-222, 1992.
- PASSOT, S.; FONSECA, F.; ALARCON-LORCA, M. et al. Physical characterisation of formulations for the development of two stable freeze-dried proteins during both dried and liquid storage. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 60, p. 335-348, 2005.
- PEÑA, A.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, v. 54, p. 859-875, 2000a.
- PEÑA, A.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology*, v. 54, p. 703-718, 2000b.
- PEÑA, A.; JOHANNISSON, A.; LINDE-FORSBERG, C. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology*, v. 52, n. 6, p. 965-980, 1999.
- PEÑA, A.I. *Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelación-descongelación*. 1997. 310f. Tese (Doutorado em Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo.
- PEÑA, A.I.; BARRIO, F.; QUINTELA, L.A. et al. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. *Theriogenology*, v. 50, n. 1, p. 163-174, 1998.
- PEÑA, A.I.; LÓPEZ-LUGILDE, L.; BARRIO, M. et al. Studies on the intracellular Ca²⁺ concentration of frozen-thawed dog spermatozoa: influence of Equex from different sources, two thawing diluents and

post-thaw incubation in capacitating conditions. *Reproduction on Domestic Animal*, v. 38, p. 27-35, 2003.

PEÑA, F.J.; NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I.; MORÁN, J.M. Semen technologies in dog breeding: an update. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 41, p. 21-29, 2006. suppl.2.

PEÑA MARTÍNEZ, A.I. *Flow cytometry in the assessment of fresh and frozen-thawed dog semen, and the effects of different cryopreservation methods on post-thaw sperm survival and longevity*. 2000. 45f. Tese (Doutorado) - Universidade de Ciências Agrônomas da Suécia, Uppsala.

PEÑA MARTÍNEZ, A.I. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science*, v. 82-83, p. 209-224, 2004.

PONGLOWHAPAN, S.; ESSÉN-GUSTAVSSON, B.; LINDE FORSBERG, C. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology*, v. 62, p. 1498-1517, 2004.

QUINN, P.J.; CHOW, P.Y.W.; 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.

REISINGER, R.E.; ATKINSON, D. Phospholipid/cholesteryl ester microemulsions containing unesterified cholesterol: model systems for low-density lipoproteins. *Journal of Lipid Research*, v. 31, p. 849-858, 1990.

RICKER, J.V.; LINFOR, J.J.; DELFINO, W.J. et al. Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. *Biology of Reproduction*, v. 74, p. 359-365, 2006.

RIGAU, T.; FARRÉ, M.; BALLESTER, J. et al. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*, v. 56, n. 5, p. 801-815, 2001.

RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; MAES, D. et al. Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 57, n. 6, p. 1669-1681, 2002.

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

RODRIGUEZ-GIL, J.E. Mammalian sperm energy resources management and survival during conservation in refrigeration. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 41, p. 11-20, 2006. suppl 2.

ROMANOFF, A.L.; ROMANOFF, A.J. *The avian egg*. New York: John Wiley & Sons, 1963.

ROTA, A.; STROM, B.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*, v. 44, n. 6, p. 885-900, 1995.

ROTA, A.; STROM, B.; LINDE-FORSBERG, C. et al. Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. *Theriogenology*, v. 47, n. 5, p. 1093-1101, 1997.

ROTA, A.; LINDE-FORSBERG, C.; VANNOZZI, J. et al. Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing/ thawing rates. *Reproduction in Domestic Animal*, v. 33, n. 5, p. 355-361, 1998.

ROTA, A.; FURZI, C.; PANZANI, D. et al. Studies on motility and fertility of cooled

- stallion spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animal*, v. 39, p. 103-109, 2004.
- ROTA, A.; MILANI, C.; CABIANCA, G. et al. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology*, v. 65, p. 1848-1858, 2006.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada a experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221 p.
- SANTOS, S.E.C.; VANNUCCHI, C.I.; SATZINGER, S. et al. Comparison of five extenders for canine semen freezing. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 36, n. 5, 1999.
- SANTOS, S.E.C.; VANNUCCHI, C.I.; SATZINGER, S. et al. Comparação de dois crioprotetores na congelação de sêmen de cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 25, n. 3, p. 472-473, 2001.
- SANTOS JÚNIOR, A.R.; CARVALHO, H.F. Biomembranas. In: CARVALHO, H.F.; RECCO-PIMENTEL, S.M. *A célula 2001*. São Paulo: Manole, 2001. p. 39-56.
- SCHÄFER-SOMI, S.; AURICH, C. Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. *Animal Reproduction Science*, v.102, p. 1-13, 2007.
- SCHÄFER-SOMI, S.; KLUGER, S.; KNAPP, E. et al. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology*, v. 66, p. 173-182, 2006.
- SILVA, A.R. *Criopreservação do sêmen canino diluído em Tris: avaliação morfológica, funcional e de suas interações com oócitos homólogos*. 2005. 146f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.
- SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M. Congelação de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de tris e água de coco. *Ciência Rural*, v. 30, n. 6, p. 1021-1025, 2000.
- SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M. Principais aspectos ligados à aplicação da inseminação artificial na espécie canina. *Revista portuguesa de ciências veterinárias*, v. 98, n. 546, p. 53-60, 2003.
- SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.; SILVA, L.D.M. et al. Prognostic value of canine frozen-thawed semen parameters on in vitro sperm-oocyte interactions. *Theriogenology*, v. 66, p. 456-462, 2006.
- SILVA, L.D.M.; VERSTEGEN, J.P. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, v. 44, p. 571-579, 1995.
- SILVA, L.D.M.; SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S. Inseminação artificial em cães. In: GONSALVES, P.B.D; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. (Eds). *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. São Paulo: Varela, 2002. Cap. 5, p. 69-95.
- SIRVENTE, H.; BEAUMAL, V.; GAILLARD, C. et al. Structuring and functionalization of dispersios containing egg yolk, plasma and granules induced by mechanical treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 9537-9544, 2007.
- SNOECK, P.P.N. *Aspectos da criopreservação de sêmen equino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade*. 2003. 112f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária,

Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SOARES, M.P.; ROSSI, C.A.R.; MEZZALIRA, A. et al. Etileno glicol na criopreservação de sêmen canino. *Ciência Rural*, v. 32, n. 4, p. 649-655, 2002.
SONGSASEN, N.; YU, I.; MURTON, S. et al. Osmotic sensitivity of canine spermatozoa. *Cryobiology*, v. 44, p. 79-90, 2002.

SOUSA, R.C.S.; COIMBRA, J.S.R.; ROJAS, E.E.G. et al. Effect of pH and salt concentration on the solubility and density of egg yolk and plasma egg yolk. *LWT*, v. 40, p. 1253-1258, 2007.

SQUIRES, E.L.; KEITH, S.L.; GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 62, p. 1056-1065, 2004.

STORNELLI, M.A.; STORNELLI, M.C.; ARAUZ, M.S. et al. Comparison of different concentrations of equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa. In: EUROPEAN VETERINARY SOCIETY FOR SMALL ANIMAL REPRODUCTION, 3, 2002, Liège. *Proceedings...Bélgica: L'Université de Liège*, 2002. p. 174-175.

STROM, B.; ROTA, A.; LINDEFORSBERG, C. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology*, v. 48, n. 1, p. 247-256, 1997.

TANG, X.; NAIL, S.L.; PIKAL, M.J. Evaluation of manometric temperature measurement, a process analytical technology tool for freeze-drying: part I, product temperature measurement. *AAPS Pharmaceutical Science Technology*, v. 7, n. 1, p. E1-E9, 2006.

TARTAGLIONE, C.M.; RITTA, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of

frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v. 62, p. 1245-1252, 2004.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biology of Reproduction*, v. 59, p. 768-776, 1998.
THIRUMALA, S.; FERRER, M.S.; AL-JARRAH, A. et al. Cryopreservation of canine spermatozoa: theoretical prediction of optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents. *Cryobiology*, v. 47, p. 109-124, 2003.

USUI, S.; NAKAMURA, M.; JITSUKATA, K. et al. Assessment of between-instrument variations in a HPLC method for serum lipoproteins and its traceability to reference methods for total cholesterol and HDL-Cholesterol. *Clinical Chemistry*, v. 46, n. 1, p. 63-72, 2000.

VANNUCCHI, C.I.; SANTOS, S.E.C.; VISINTIN, J.A. In vitro viability of canine spermatozoa frozen in tris-fructose-citric acid extender with ethylene glycol. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 36, n. 4, p. 205-211, 1999.

VARELA JÚNIOR, A.S. *Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre a qualidade do sêmen canino submetido a criopreservação*. 2005. 18f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

VARELA JUNIOR, A.S.; LUCIA JR., T.; CORRÊA, M.N. et al. Effect of low-density lipoproteins from hen egg yolk on the quality of canine semen cooled at 5°C. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15, 2004. Porto Seguro. *Proceedings...* Porto Seguro: BCAR. 2004. p. 514.

VIDAMENT, M.; YVON, J.M.; COUTY, I. et al. Advances in cryopreservation of stallion

- semen in modified INRA 82. *Animal Reproduction Science*, v. 68, n. 3-4, p. 201-218, 2001.
- VIDAMENT, M.; DAIRE, C.; YVON, J.M. et al. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. *Theriogenology*, v. 58, p. 249-251, 2002.
- VIEIRA, O.V.; LARANJINHA, J.A.N.; MADEIRA, V.M.C. et al. Rapid isolation of low density lipoproteins in a concentrated fraction free from water-soluble plasma antioxidants. *Journal of Lipid Research*, v. 37, p. 2715-2721, 1996.
- VISHWANATH, R.; SHANNON, P.; CURSON, B. Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilizing ability of bull sperm. *Animal Reproduction Science*, v. 29, n. 3-4, p. 185-194, 1992.
- WATERHOUSE, K.E.; HOFMO, P.O.; TVERDAL, A. et al. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction*, v. 131, p. 887-894, 2006.
- WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm membranes. In: CLARKE, A.; MORRIS, G.J. (Eds). *Effects of low temperatures on biological membranes*. London: Academic Press, p. 189-218, 1981a.
- WATSON, P.F. The roles of lipid and protein in the production of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 62, n. 2, p. 483-492, 1981b.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction and fertility developmental*, v. 7, p. 871-891, 1995.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science*, v. 60-61, p. 481-492, 2000.
- YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, v. 54, n., p. 579-585, 2000.
- YU, I.; SONGSASEN, N.; GODKE, R.A. et al. Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. *Cryobiology*, v. 44, p. 62-78, 2002.
- ZIMMERMANN, M.; SANTOS, T.E.; FIDELIS, A.A.G. et al. Uso de dimetil-formamida e água de côco na criopreservação de sêmen canino. *Bioscience Journal*, v. 23, n. 1, p. 96-100, 2007.
- ZINELLU, A.; SOTGIA, S.; GALISTU, F. et al. Applications on the monitoring of oxidative modification of LDL by capillary electrophoresis: a comparison with spectrophotometer assay. *Talanta*, v. 64, p. 428-434, 2004.
- ZÚCCARI, C.E.S.N. *Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina*. 1998. 121f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Capítulo 8 – ANEXOS

EXPERIMENTO I

Anexo 1 - RELATÓRIO EXTRAÇÃO LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE

Data da extração: _____

Obtenção da gema, retirando a clara com papel filtro e sugando a gema com seringa, colocando-a no béquer.

(Seringa, saco de lixo, papel filtro, béquer, esponsorff, bastão)

Coletar amostra 1E: _____

Coletar gema para MS: _____

Volume da gema: _____

Diluir com sol. salina 0,17M _____

Misturar com bastão de vidro. Tampar béquer com barra magnética. (Barra magnética papel alumínio, béquer).

Homogenizar com agitador magnético por 1h a 4°C. Hora: _____

Encher tubos de centrifuga com volumes iguais. Centrifugar a 11400xg, por 45 minutos a 4°C. Hora: _____

Coletar amostra grânulo- 2E: _____

Obter o sobrenadante, encher outros tubos de centrifuga com volumes iguais. Centrifugar a 11400xg, por 45 min. a 4°C. Hora: _____

Coletar amostra do plasma - 3E: _____

Descartar grânulo. Medir pH, adicionando NaOH para 8,7. pH inicial: _____ NaOH 0,1N, pHmetro, pipeta/ponteira).

Volume do plasma: _____

Calcular quantidade do sulfato de amônio a ser adicionada: _____

Com bureta, adicionar calmamente o sulfato, no agitador magnético a 4°C.

Agitar mais 1 hora a 4°C.

Hora: _____

Centrifugação por 45 minutos, a 4°C, por 11400xg.

Hora; _____

Preparar membrana de diálise, utilizando luvas de procedimento, béquer de 5L, água bidestilada, grampos e esparadrapo, papel alumínio.

Obter o plasma pós centrifugação, colocá-lo num béquer e despejar dentro da membrana de diálise. Colocar no agitador magnético a 4°C.

Início: _____

Primeira troca: _____

Segunda troca: _____

Terceira troca: _____

Centrifugação a 10.000, 45min., 4°C.

Hora: _____

Coletar amostras LDL densa (4E) e líquida (5E).

Anexo 2 - PROTOCOLO DE OBTENÇÃO DA MATÉRIA SECA (MS)

Material necessário:

- Balança de precisão;
- Estufa de secagem;
- Dessecador;
- Pesa-filtro com tampa;
- Colher;
- Papel, caneta e caneta de retroprojektor;
- Pipeta/ ponteira de 5 mL.

Como colocar material dentro da estufa:

- Pesa-filtro com tampa entreaberta;
- Bandeja metálica.

Observações:

- Homogeneizar bem a LDL;
- Identificar o pesa-filtro e a tampa correspondente.

PROCEDIMENTO:

1. Pesar o pesa-filtro com tampa e vazio (pesar a tampa do lado do pesa-filtro);
2. Pesa quantidade do material dentro do pesa-filtro;
3. Colocar o pesa-filtro com tampa e com material e pesar o conjunto;
4. Colocar o pesa-filtro na estufa, com tampa entreaberta por 24 horas a 104°C;
5. Após o tempo, tampar o pesa-filtro e coloca-lo imediatamente dentro do dessecador;
6. Deixar esfriar o conjunto por 1 hora;
7. Pesar novamente o pesa-filtro + tampa + material.
8. Repetir o procedimento novamente.

Anexo 3 - DOSAGEM DE PROTEÍNA

(Método de Lowry, 1951)

PREPARO DAS SOLUÇÕES:

Soluções de estoque:

Tartarato de sódio e potássio a 4%:

Tartarato de sódio e potássio4g
Água destilada 100mL

Sulfato de cobre a 2%:

Sulfato de cobre2g
Água destilada 100mL

NaOH 0,1M

Hidróxido de sódio (NaOH)4g
Água destilada 1000mL

Carbonato de sódio a 3%:

Carbonato de sódio (Na₂CO₃) 3g
NaOH 0,1M 100mL
(preparar na hora)

Soluções de trabalho (preparar na hora)

Reagente de cobre:

Tartarato de sódio e potássio a 4% 2mL
Sulfato de cobre a 2% 2mL
Carbonato de sódio a 3% 100mL

Reagente de fenol

Folin 1 volume
Água destilada 2 volumes

PROCEDIMENTO:

1. Pipetar a amostra contendo a proteína (máximo de 200mg contidos em no máximo 0,1mL), se possível em duplicata.

BSA – padrão: 1mg/mL em água destilada

Tubos	BSA (mg)	Padrão BSA (µL)	Água (µL)	Tubos	Amostra	Amostra (µL)	Água (µL)
1	0	-	100	1	0:100	1	99
2	10	10	90	2	0:75	1,3	98,7
3	20	20	80	3	0:50	2	98
4	30	30	70	4	0:30	3,3	96,7
5	50	50	50	5	0:20	5	95
6	75	75	25	6	0:10	10	90
7	100	100	-	7	100	100	0

* Lembrar que o volume final precisa ser de 100 µL.

- 3 Adicionar 1mL do reagente de cobre, agitando imediata e vigorosamente, em todos os tubos;
- 4 Repousar por 10 minutos;
- 5 Adicionar 0,1mL (100 µl) do reagente de fenol, agitando imediata e vigorosamente, em todos os tubos;

- 6 Repousar por 10 minutos;
- 7 Ler a absorvância a 660nm.

Anexo 4 - MINI-ELETROFORESE (BIORAD)

PREPARO DAS SOLUÇÕES:

Solução A:

Acrilamida 29,2g
Bisacrilamida..... 0,8g
Água destilada 100mL

Filtrar e armazenar em frasco escuro a 4°C. Máximo 30 dias.

Solução B: TRIS- HCl 1,5 M, pH 8,8

TRIS 18,15g - Ajustar o pH 8,8 (HCl)

Água destilada 100mL - Armazenar a 4°C.

Solução C: TRIS – HCl 0,5 M, pH 6,8.

TRIS 6g - Ajustar pH 6,8 (HCl).

Água destilada 100mL - Armazenar a 4°C.

Duodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%.

SDS 10g - Ajustar pH para 6,8 (HCl)

Água destilada 100mL - Armazenar a temperatura ambiente.

Tampão da amostra:

Sem redução 2x concentrado:

Solução C 1mL

Glicerol 0,8mL

SDS 10% 1,6mL

Água destilada 0,4mL

Azul de bromofenol 0,2% 0,2mL

Armazenar a temperatura ambiente.

Com redução 2x concentrado:

Substituir a água destilada por beta-mercaptoetanol.

Tampão de corrida 5x concentrado:

TRIS 4,5g

Glicina 21,6g

SDS 1,5g

Água destilada q.s 300mL

Armazenar a 4°C.

Uso: tampão 5x concentrado 60mL
Água destilada 240mL.

Persulfato de amônio (PSA) a 10%: preparar na hora do uso:
PSA 10mg/0,1mL.

GÉIS DE POLIACRILAMIDA:

	Gel de separação 12,5%		Gel de concentração 4%
Solução A	4,17 ml	Solução A	1,3 ml
Solução B	2,5 ml	Solução C	2,5 ml
SDS a 10%	0,1 ml	SDS a 10%	0,1 ml
Água destilada	3,16 ml	Água destilada	6,1 ml
PSA a 10%	70 µL	PSA a 10%	70 µL
TEMED	7 µL	TEMED	14 µL

- Aplicar o gel de separação e deixar polimerizando por 30min dentro da estufa a 37°C, coberto com água destilada;
- Aplicar o gel de aplicação e deixar polimerizando por 30min na estufa a 37°C.

Anexo 5 - COLORAÇÃO DO GEL DE ELETROFORESE PELO AZUL DE COOMASSIE

PREPARO DAS SOLUÇÕES:

1 – Corante:

Coomassie brilhante blue r-250 1,25g
Metanol 225mL
Ácido acético glacial 45mL
Água destilada 225mL

Corar por 30 minutos em shaker.

2 – Descorante:

Etanol 45mL
Ácido acético glacial 90mL
Água destilada 850mL

Para descoloração rápida acrescentar 50mL/ L de acetato de etila.

Anexo 6 - COLORAÇÃO DO GEL DE ELETROFORESE PELA PRATA

PREPARO DAS SOLUÇÕES:

Dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$)

$K_2Cr_2O_7$	100mg
Água destilada	100mL
HNO_3	28 μ L

Nitrato de prata ($AgNO_3$)

$AgNO_3$	200mg
Água destilada	100mL

Carbonato de sódio (Na_2CO_3)

Na_2CO_3	3g
Água destilada	100mL

Solução fixadora

Metanol	30mL
Ácido acético	10mL
Água destilada	60mL

PROCEDIMENTOS:

1. Fixar o gel por 5min em metanol 30%;
2. Lavar o gel com água destilada por 5 minutos;
3. Colocar o $K_2Cr_2O_7$ e deixar agitando por 5 minutos;
4. Lavar o gel com água destilada por 5 min.;
5. Colocar o $AgNO_3$ e deixar agitando por 20 minutos;
6. Enxágüe rápido com água destilada;
7. Colocar a solução de carbonato de sódio e esperar o aparecimento da cor cinza;
8. Fazer uma troca da solução e deixar corar;
9. Parar a reação com solução descorante;
10. Secar o gel.

EXPERIMENTO II

Anexo 7 – COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DILUIDORES DO SÊMEN CANINO

- Meios de centrifugação

Meio Glicose-EDTA

Reagentes	Quantidade
Glicose	6g
EDTA dissódico	0,37g
Citrato de sódio desidratado	0,375g
Bicarbonato de sódio	0,12g
Estreptomicina	0,05g
Penicilina G potássica	50UI
Água deionizada, destilada e autoclavada qsp	100mL
pH	6,7
Osmolaridade (mOsm/L)	429

Fonte: Martin et al., 1979.

Meio Tris-cítrico

Reagentes	Quantidade
Tris (T-hidroximetilaminometano)	3,025g
Ácido cítrico	1,7g
Frutose	1,25g
Estreptomicina	0,1g
Água deionizada, destilada e autoclavada - qsp	100mL
pH	6,6
Osmolaridade (mOsm/L)	304

Fonte: Oliveira, 2003.

- Meios de congelamento

Meio lactose-gema-EDTA

Reagentes	Quantidade
Solução de lactose 11%	50mL
Solução glicose- EDTA	25mL
Gema de ovo (v/v)	20mL
Equex	0,5mL
Glicerol	5%
pH	6,7
Osmolaridade (mOsm/L)	1214

Fonte: Martin et al. (1979; modificado).

Meio Tris-cítrico

Reagentes	Quantidade
Tris (T-hidroximetilaminometano)	3,025g
Ácido cítrico	1,7g
Frutose	1,25g
Estreptomicina	0,1g
Gema de ovo (v/v)	20mL
Glicerol	5%
Água deionizada, destilada e autoclavada – qsp	100mL
pH	6,78
Osmolaridade (mOsm/L)	885

Fonte: Oliveira, 2003.

Meio diluidor INRA-82, modificado por Palmer (1984).

Reagentes	Quantidade
Glicose anidra	25g
Lactose H ₂ O	1,5g
Raffinose 5H ₂ O	1,5g
Citrato de sódio 2 H ₂ O	0,25g
Citrato de potássio H ₂ O	0,41g
Hepes	4,76g
Água q.s.p.	0,5L
Leite desnatado UHT	0,5L
Sulfato de gentamicina	50mg
Penicilina G	50.000UI
Glicerol	5%
Gema de ovo	2%
pH	6,8
mOsm/L	1125

- Solução hiposmótica a 60 mOsm/L

Reagente	Quantidade
Frutose	1,0836g
Água destilada – qsp	100 mL

Fonte: Kumi-Diaka, 1993.

Anexo 8 – COLORAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA CFDA/IP

PREPARO DAS SOLUÇÕES:

Soluções estoque:

Diacetato de carboxifluoresceína (CFDA):

CFDA 2,3mg

DMSO 5mL.

Preparar no escuro, armazenar a –20°C

Iodeto de propídio (IP):

IP 2mg
Solução fisiológica estéril 4mL.
Preparar e armazenar no escuro, congelando a -20°C .

Solução de citrato de sódio a 3%:

Citrato de sódio 3g
Solução fisiológica estéril 100mL.
Armazenar em geladeira a 4°C por até 7dias.

Formalina a 40%:

Formol 40% 100 μl
Solução fisiológica estéril 7,9mL.
Armazenar em geladeira a 4°C por até 7dias.

Solução trabalho:

20 μl de CFDA
10 μl de IP
10 μl de formalina a 40%
960 μl de citrato de sódio
Colocar 40 μl de solução trabalho em *eppendorf* vedado e adicionar 10 μl de sêmen.
Incubar por 8min em banho-maria a 37°C .

EXPERIMENTO III

Anexo 9 – FORMULAÇÕES DOS MEIOS DILUIDORES PARA O CONGELAMENTO DO SÊMEN CANINO

- Meios de centrifugação

Meio Glicose-EDTA

Reagentes	Quantidade
Glicose	6g
EDTA dissódico	0,37g
Citrato de sódio desidratado	0,375g
Bicarbonato de sódio	0,12g
Estreptomicina	0,05g
Penicilina G potássica	50UI
Água deionizada, destilada e autoclavada qsp	100mL
pH	6,7
Osmolaridade (mOsm/L)	429

Fonte: Martin et al., 1979.

- Meios de congelamento

Meio Tris-cítrico (controle)

Reagentes	Quantidade
Tris (T-hidroximetilaminometano)	3,025g
Ácido cítrico	1,7g
Frutose	1,25g
Estreptomicina	0,1g
Gema de ovo (v/v)	20mL
Glicerol	5%
Água deionizada, destilada e autoclavada – qsp	100mL

Fonte: Oliveira, 2003.

Meio Tris-cítrico com lipoproteínas de baixa densidade natural (LBD)

Reagentes	Quantidade
Tris (T-hidroximetilaminometano)	3,025g
Ácido cítrico	1,7g
Frutose	1,25g
Estreptomicina	0,1g
LBD natural (9,64mg)	1,12mL
LBD natural (19,28mg)	2,24mL
LBD natural (24,1mg)	2,8mL
Glicerol	5%
Água deionizada, destilada e autoclavada – qsp	100mL

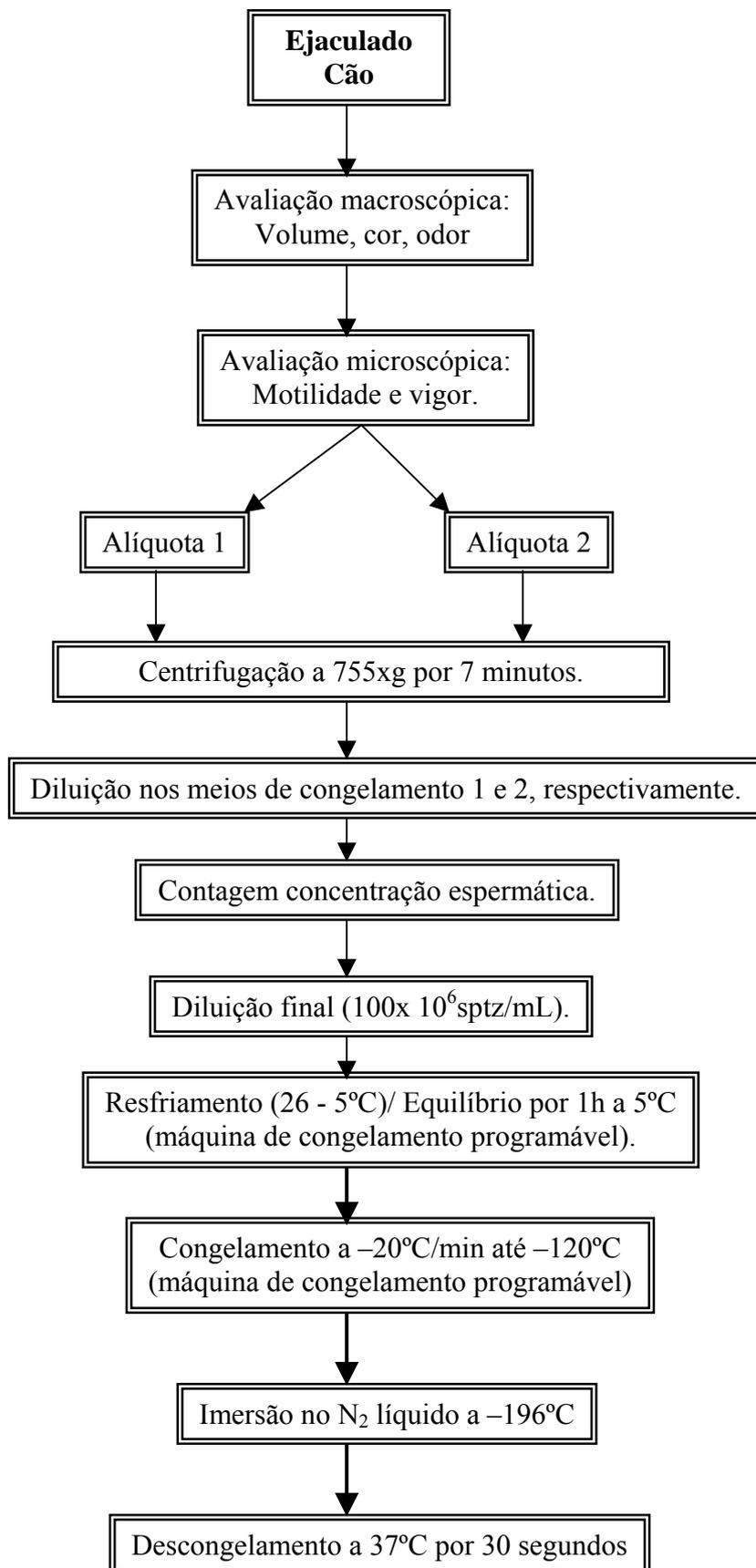
Meio Tris-cítrico com lipoproteínas de baixa densidade liofilizada (LBD)

Reagentes	Quantidade
Tris (T-hidroximetilaminometano)	3,025g
Ácido cítrico	1,7g
Frutose	1,25g
Estreptomicina	0,1g
LBD liofilizada (9,64mg)	3,21mL
LBD liofilizada (19,28mg)	6,42mL
LBD liofilizada (24,1mg)	8mL
Glicerol	5%
Água deionizada, destilada e autoclavada – qsp	100mL

- Osmolaridade e pH dos meios

Meios diluidores	pH	Osmolaridade
Glicose-EDTA (centrifugação)	6,83	420
Tris-cítrico-gema	6,97	1151
Tris-cítrico 9,64mg de LBD natural	6,89	1090
Tris-cítrico 19,28 mg de LBD natural	6,98	1091
Tris-cítrico 24,10 mg de LBD natural	7,02	1105
Tris-cítrico 9,64mg de LBD liofilizada	6,94	1091
Tris-cítrico 19,28 mg de LBD liofilizada	6,96	1092
Tris-cítrico 24,10 mg de LBD liofilizada	6,96	1104

Anexo 10 – FLUXOGRAMA DO CONGELAMENTO DO SÊMEN CANINO



EXPERIMENTO IV

Anexo 11 – FORMULAÇÕES DOS MEIOS DILUIDORES PARA CONGELAMENTO DO SÊMEN CANINO

- Meios de congelamento

Meio Tris-cítrico (controle)

Reagentes	Quantidade
Tris (T-hidroximetilaminometano)	3,025g
Ácido cítrico	1,7g
Frutose	1,25g
Estreptomicina	0,1g
Gema de ovo (v/v)	20mL
Glicerol	5%
Água deionizada, destilada e autoclavada – qsp	100mL

Fonte: Oliveira, 2003.

Meio Tris-cítrico com lipoproteínas de baixa densidade (LBD)

Reagentes	Quantidade
Tris (T-hidroximetilaminometano)	3,025g
Ácido cítrico	1,7g
Frutose	1,25g
Estreptomicina	0,1g
LBD (v/v)	1,25mL
Glicerol, dimetilformamida, etilenoglicol	5%
Água deionizada, destilada e autoclavada – qsp	100mL

- Osmolaridade e pH dos meios

Meios diluidores	pH	Osmolaridade
Glicose-EDTA (centrifugação)	6,8	420
Tris-cítrico-gema 5% glicerol	7,0	1286
Tris-cítrico 9,64mg de LBD 5% glicerol	7,0	1109
Tris-cítrico 9,64mg de LBD 5% dimetil formamida	7,0	1094
Tris-cítrico 9,64mg de LBD 5% etileno glicol	6,9	1402

Anexo 12 – FLUXOGRAMA DO CONGELAMENTO DE SÊMEN CANINO

