

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura é uma atividade econômica em contínua expansão no Brasil. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) permitem observar que, entre os anos de 1975 e 2003, o rebanho ovino brasileiro chegou a crescer até 455% em algumas regiões brasileiras. Isto mostra aumento da importância da atividade e, conseqüentemente, sua contribuição para a composição do produto interno bruto (PIB) do agronegócio brasileiro.

A atividade apresenta potencial de exploração econômica, uma vez que, mesmo com todo o crescimento apontado pelo IBGE, o fornecimento interno de carne ovina ainda está aquém da real demanda. A produtividade dos rebanhos, a precocidade do animal ao abate e a qualidade do produto final são entraves para o crescimento mais acelerado no Brasil (Diesel, 2007). Sem levar em conta as importações, a oferta *per capita* de carne ovina foi de 615,6g em 2005, enquanto o consumo *per capita* foi de 800,0g (IBGE, 2005), o que ressalta o déficit no abastecimento do mercado interno.

Nesse contexto, a intensificação do manejo reprodutivo e o melhoramento genético constituem etapas fundamentais para a expansão da atividade de forma competitiva, sendo os programas de reprodução assistida e o uso de biotecnologias ferramentas otimizadoras do processo (Bicudo *et al.*, 2003).

Dentre as biotecnologias da reprodução, a inseminação artificial com sêmen recém coletado e diluído (IA) é a mais simples e difundida, permitindo rápida difusão do material genético dentro do rebanho. Aliada à IA, o congelamento de sêmen possibilita, ainda, o armazenamento e o intercâmbio deste material entre propriedades, bem como a maximização da utilização do reprodutor pelo fato de este fecundar um número muito maior de fêmeas que em regime de monta

natural. A IA utilizando tanto o sêmen fresco quanto o congelado auxilia também no controle de doenças contagiosas dentro do rebanho.

O congelamento de sêmen torna possível ainda o armazenamento de material para programas de IA fora da estação reprodutiva fisiológica, uma vez que diversas raças de ovinos são estacionais e o volume e a qualidade do sêmen tendem a cair fora da estação (Amir e Volcani, 1965; Thimonier, 1981). A composição do plasma seminal de ovinos também sofre influência das estações do ano, levando à diminuição da congelabilidade espermática fora da estação reprodutiva (Domínguez, *et al.*, 2008).

Apesar das vantagens, ainda existem limitações quanto ao uso do sêmen ovino criopreservado, devido à sua baixa fertilidade quando comparado ao sêmen fresco (Salamon e Maxwell, 1995; Salamon e Maxwell, 2000; Anel *et al.*, 2006).

Durante o processo de congelamento, ocorrem diversas lesões à estrutura espermática, principalmente desestabilização das membranas celulares. Tais danos são, muitas vezes, irreversíveis, o que diminui a viabilidade dos gametas (Holt, 2000). Dessa forma, a expansão da IA utilizando sêmen ovino congelado fica comprometida, principalmente quando a via de deposição é vaginal ou cervical.

A transposição cervical na ovelha, para deposição intrauterina do sêmen, é particularmente difícil, devido à diversidade de formas anatômicas que podem existir (Halbert *et al.*, 1990; Kershaw *et al.*, 2005; Anel *et al.*, 2006). Em ovelhas da raça Santa Inês, por exemplo, foi relatada a ocorrência de 100% de formações de fundo de saco nos dois primeiros anéis cervicais, o que acaba por funcionar como uma barreira adicional à transposição da cérvix (Cruz Jr., 2006).

A tração da cérvix com deposição intrauterina do sêmen é uma prática que tem sido adotada, porém, quando utilizada para IA com sêmen fresco, não traz aumento na taxa de concepção em relação à deposição no óstio cervical caudal (Silva *et al.*, 2005). Além disso, espermatozoides criopreservados têm menor habilidade de penetrar no muco cervical, e, por isso, as taxas de prenhez após IA vaginal profunda ou cervical, usando sêmen descongelado, estão em torno de 25% (Maxwell, *et al.*, 1999; Mortimer e Maxwell, 2004).

Visando minimizar esta restrição, técnicas de IA por laparoscopia, com deposição intrauterina do sêmen, têm sido amplamente estudadas e aprimoradas (Anel *et al.*, 2006). Porém, por se tratar de uma técnica cirúrgica, requer equipamentos caros e mão de obra especializada e, assim, sua implementação em um rebanho dependerá do sistema de produção adotado e, conseqüentemente, da relação custo-benefício proporcionada. Estudos demonstram que as taxas de fertilidade por IA laparoscópica com sêmen congelado estão em torno de 40% a 60% (Maxwell *et al.*, 1999; Anel *et al.*, 2006), indicando que ainda é necessária a busca pelo aperfeiçoamento das técnicas de preservação espermática e IA em ovinos (Salamon e Maxwell, 2000).

Muitas pesquisas na área de criopreservação de sêmen têm sido realizadas com a finalidade de superar os entraves ligados à viabilidade espermática após o descongelamento (D'Alessandro *et al.*, 2000; Gil *et al.*, 2002; Gil *et al.*, 2003; Marco-Jiménez, 2004; Purdy, 2006; Fukui *et al.*, 2007; Graaf *et al.*, 2007; Paulenz *et al.*, 2007; Graaf *et al.*, 2008; Nordstoga *et al.*, 2008). Taxas de resfriamento e congelamento de sêmen e composição de meios diluidores são focos de pesquisa. Apesar de todo o trabalho realizado nos últimos 60 anos, os constituintes básicos de um meio diluidor continuam sendo os

mesmos. Gema de ovo ou leite e glicerol continuam sendo indispensáveis para a boa preservação das células espermáticas da maioria das espécies (Bergeron e Manjunath, 2006).

No entanto, existem grandes variações quanto à qualidade dos ovos, principalmente devido ao tempo e forma de armazenagem (Bousseau *et al.*, 1998). Também já foi comprovado que a gema de ovo possui fatores que inibem a respiração celular, o que diminui a motilidade espermática após o descongelamento (Kampschmidt *et al.*, 1953; Pace e Graham, 1974; Watson e Martin, 1975).

Acredita-se que o efeito crioprotetor da gema de ovo é conferido pela sua fração lipoproteica de baixa densidade (LBD), e, assim, muitos estudos têm sido conduzidos na tentativa de elucidar os reais mecanismos de ação dessas lipoproteínas (Manjunath *et al.*, 2002; Bergeron *et al.*, 2004; Bergeron e Manjunath 2006), bem como sua aplicabilidade para o congelamento de sêmen de diversas espécies (Manjunath *et al.*, 2002; Moussa *et al.*, 2002; Amirat *et al.*, 2004; Juliani *et al.*, 2004; Amirat, *et al.*, 2005; Jiang, 2007; Bencharif *et al.*, 2008; Varela Jr. *et al.*, 2008; Ahmad *et al.*, 2008; Neves, 2008).

Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a eficácia da substituição da gema de ovo por diferentes concentrações de lipoproteínas de baixa densidade, *in natura* e liofilizada, na criopreservação de espermatozoides ovinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Membranas celulares

Todas as membranas biológicas, independentemente de sua função, possuem estrutura geral semelhante: moléculas de fosfolípídeos, glicolípídeos, colesterol, e

proteínas que formam um fino filme, estabilizadas por interações não-covalentes (Alberts *et al.*, 2002). A conformação das membranas é em forma de bicamada, ficando a fração hidrofílica dos fosfolípidos disposta externamente e a hidrofóbica voltada para o interior. Toda essa estrutura é dinâmica e fluida, onde os fosfolípidos podem se mover lateralmente, rotacionar e, raramente, passar do lado interno para o externo da membrana ou vice-versa. As proteínas são classificadas como transmembranas (ou integrais) e periféricas, estando distribuídas por toda a membrana (Zafian, 1984; Alberts *et al.*, 2002).

Os lípidos correspondem a cerca de 50% da massa total de todas as membranas celulares (Alberts *et al.*, 2002), sendo 70% compostos por fosfolípidos, 25% por lípidos neutros e 5% por glicolípidos. No espermatozoide, o conteúdo total de colesterol, o lípido neutro encontrado em maior abundância, apresenta grande variação entre espécies, indivíduos e até entre ejaculados (Flesch e Gadella, 2000). Por atuar restringindo a movimentação dos fosfolípidos, o colesterol estabiliza as membranas e, dessa forma, auxilia na resistência espermática ao choque térmico e à criopreservação. Assim, para a maioria das espécies domésticas, quanto maior a relação colesterol/fosfolípidos, nas células espermáticas, mais resistente será a célula. Espermatozoides de carneiro possuem relação de 0,4-0,5 e são altamente sensíveis, enquanto espermatozoides de humanos possuem relação de 0,9-1,0 e apresentam, comparativamente a outras espécies de animais, alta resistência ao choque térmico (Darin-Bennett e White, 1977).

2.2 Alterações nas membranas celulares decorrentes do resfriamento

Durante o resfriamento, as membranas celulares passam pela fase termotrófica de transição, onde a membrana passa do estado fluido (estado fisiológico) para a forma de

gel (Watson, 1981; Mazur, 1984). Nesta fase, dependendo do grau de saturação de cada classe de fosfolípidos e glicolípidos, a gelificação ocorre em diferentes temperaturas. Se a taxa de resfriamento for alta, esse efeito é exacerbado e categorias dessas moléculas tendem a se agrupar, desarranjando a estrutura da membrana. Como consequência, algumas dessas moléculas perdem a forma de bicamada durante o reaquecimento e formam uma estrutura circular, em monocamada, chamada de hexagonal II. Essa estrutura aumenta a permeabilidade da membrana, levando à perda de conteúdo celular, ATP, ácidos nucleicos, fosfolípidos, várias enzimas metabólicas, potássio, além de aumentar a permeabilidade da membrana aos cátions e à água. Todas essas alterações são conhecidas como choque térmico (Parks e Graham, 1992; Watson, 1995; Parks, 1997; Watson, 2000).

Para minimizar esses efeitos, é preconizado o resfriamento lento do sêmen ovino, principalmente entre 15 e 5°C (Salamon e Maxwell, 1995), já que o resfriamento rápido entre 30 e 15°C aparentemente não afeta sua viabilidade após o descongelamento (Fiser e Fairfull, 1986).

Outra fase crítica de temperatura é durante o congelamento, de -15 a -60°C (Mazur, 1984). Antecedendo esta, entre -5 e -15°C, ocorre formação de cristais de gelo no meio extracelular, porém o conteúdo celular ainda permanece resfriado. Com a formação dos cristais, a concentração dos solutos extracelulares aumenta, e, dessa forma, a célula perde água para o meio externo. Entre -15 e -60°C, a taxa de congelamento irá predizer o grau de desidratação celular. Se a taxa de congelamento for lenta, haverá tempo suficiente para a célula perder água por exosmose e, assim, evitar a cristalização no interior da célula. Ao contrário, altas taxas de congelamento não permitem desidratação suficiente, levando, desse modo, à formação de cristais de gelo

intracelulares. Tais cristais lesam as membranas espermáticas, provocando, muitas vezes, a morte celular (Mazur, 1984). No entanto, Byrne *et al.* (2000) demonstraram que, quando submetidos a uma taxa de congelamento rápida, os espermatozoides possuem maior capacidade de fecundação *in vitro* e maiores taxas de fecundação após inseminação, quando comparados com os congelados de forma lenta.

Pequenos cristais de gelo são termodinamicamente instáveis e, durante o descongelamento, tendem a se fundir, formando cristais de gelo maiores. Esse fenômeno é chamado “recristalização” e, quando ocorre no meio intracelular, dependendo do tamanho e da quantidade de cristais, pode levar a lesões de membrana e morte celular (Mazur, 1984). Daí a importância do método de descongelamento, que deve ser rápido o suficiente para impedir recristalização sem reduzir a viabilidade espermática.

Paulenz *et al.* (2007) trabalharam com duas temperaturas de descongelamento de sêmen de ovinos (a 50°C por 9s e a 35°C por 12s) e não encontraram diferença significativa na fertilidade após a inseminação no fundo de saco vaginal. Nordstoga *et al.* (2008) também não encontraram diferença nas taxas de fertilidade após a inseminação quando descongelaram o sêmen de ovinos a 35°C por 20s ou a 70°C por 9s. Assim, não havendo diferença na fertilidade, a temperatura de descongelamento mais frequentemente utilizada é de 35 a 37°C, por ser fácil de ser atingida a campo e por não haver perigo de morte celular por prolongado tempo de exposição às altas temperaturas.

2.3 Crioprotetores

Foi observado que, desde a formação do primeiro cristal de gelo extracelular até o seu descongelamento e total retorno à sua

condição fisiológica, a célula passa por uma série de fenômenos físico-químicos, cada um dos quais potencialmente letais. O sucesso na criopreservação requer, então, que todos esses eventos sejam evitados ou anulados (Mazur, 1984).

Com a finalidade de evitar tais eventos, substâncias protetoras são adicionadas aos meios diluidores para criopreservação de sêmen e são chamadas de crioprotetores. Estes são classificados como permeantes ou não permeantes. Os crioprotetores permeantes geralmente são solutos que atravessam facilmente as membranas celulares, atuando tanto no meio intra como no extracelular. Nessa categoria estão classificadas substâncias como glicerol, etilenoglicol, propilenoglicol, amidas, dimetilsulfóxido (DMSO) e álcoois poliídricos.

Molínia *et al.* (1994) trabalharam com associações de etilenoglicol, propanodiol, DMSO e glicerol para a criopreservação de espermatozoides de ovinos e constataram que o glicerol, utilizado separadamente e na concentração de 6%, foi o que proporcionou maiores percentuais de motilidade e acrossomas íntegros após o descongelamento. Também foi constatado que o DMSO é ineficaz para a criopreservação de sêmen de ovinos.

Já os crioprotetores não permeantes são macromoléculas que não atravessam as membranas celulares e atuam apenas no meio extracelular, como açúcares (lactose, trealose, rafinose, galactose, sacarose), proteínas do leite e da gema de ovo, albumina, soro e polímeros sintéticos, como a polivinilpirrolidona e a metilcelulose. Esses compostos aumentam a osmolaridade do meio diluidor, facilitando a desidratação celular durante o congelamento (Salamon e Maxwell, 2000).

Outros açúcares, como a glicose e a frutose, são adicionados aos meios diluidores,

aumentando a osmolaridade do meio, porém, por serem capazes de penetrar na célula, acabam por balancear o gradiente osmótico. Além disso, tanto a glicose quanto a frutose são utilizadas como substrato para a produção de ATP pela célula espermática, sendo que a glicose é metabolizada preferencialmente devido à maior afinidade da enzima hexoquinase (enzima responsável pela primeira etapa da glicólise) por esta (Mann, 1964).

O leite é um meio isotônico que contém muitos compostos favoráveis à manutenção da viabilidade espermática, sendo utilizado para o congelamento de espermatozoides de ovinos combinado à frutose ou à gema de ovo. Porém, os resultados de fertilidade obtidos com o seu uso em meios diluidores para criopreservação são inconstantes, e as taxas de prenhez podem variar de 0 a 75% dependendo da composição do diluente, da taxa de diluição e do método de congelamento utilizado (Salamon e Maxwell, 1995).

A gema de ovo preserva a motilidade e a integridade de membranas espermáticas, além de atuar como tampão osmótico conferindo maior resistência às células tanto para meios hipotônicos quanto para hipertônicos (Jones e Martin, 1973). Mesmo sendo parcialmente substituída por outras substâncias, a gema de ovo continua um importante componente para criopreservação de sêmen de ovinos (Salamon e Maxwell, 1995).

Os crioprotetores mais utilizados para o congelamento de sêmen de ovinos são o glicerol e a gema de ovo. Suas particularidades serão descritas a seguir.

2.3.1 Glicerol

Desde os primeiros relatos de sua utilização (Polge *et al.*, 1949; Polge, 1951; Polge e Rowson, 1952), o glicerol é o crioprotetor mais utilizado para a preservação de

espermatozoides de diversas espécies, inclusive ovinos (Salamon e Maxwell, 2000).

Quimicamente é classificado como um álcool e apresenta fórmula molecular $C_3H_8O_3$, sendo 3 grupamentos hidroxila, o que lhe confere alta capacidade de ligação com a água. Dessa forma, impede a formação e o crescimento de cristais de gelo no meio diluidor, além de possuir capacidade de penetrar na célula, regulando o balanço osmótico intra e extracelular. Poucos minutos de contato do glicerol com o espermatozoide (0 a 5 minutos) já são eficazes para promover efeito crioprotetor satisfatório (Salamon e Maxwell, 1995; Salamon e Maxwell, 2000).

O que se tem buscado em relação ao glicerol é o ajuste da sua melhor concentração. Diversos pesquisadores trabalharam com percentuais diferentes de glicerol no meio diluidor. Medina *et al.* (2004) obtiveram melhores resultados com 3%, já Gonzáles *et al.* (1999) 5%, Camara *et al.*, (2002) 6,8%, enquanto Barbas *et al.* (2004) encontraram 8% como concentração ideal. Essas diferenças provavelmente se devem à diferença na composição dos meios diluidores utilizados em cada experimento. Em média, a concentração de glicerol recomendada para ovinos está entre 4% e 6% (Salamon e Maxwell, 2000).

O glicerol possui atividade direta na membrana plasmática, ao contrário dos outros crioprotetores permeantes. Há evidências de que este crioprotetor se ligue diretamente aos fosfolípidos da membrana plasmática, reduzindo sua fluidez e interferindo em sua permeabilidade (Parks e Graham, 1992; Molínia *et al.*, 1994).

Um dos mais importantes fatores que determinam a concentração de glicerol é a curva de congelamento utilizada. Fiser e Fairfull (1986), trabalhando com sêmen de ovinos, encontraram concentrações ótimas

de glicerol entre 4 e 6% para uma taxa de congelamento de -5 a -100°C/min. Resultados semelhantes foram encontrados por Salamon e Maxwell (2000), em que, para as mesmas concentrações de glicerol, a melhor motilidade após o descongelamento foi obtida para as curvas de congelamento entre -10 e -100°C/min. Gil *et al.* (2003) testaram dois protocolos de adição do glicerol, a 5°C e a 15°C, e demonstraram que sua adição a 5°C permite maiores percentuais de integridade de membranas e menor ocorrência de reação acrossômica.

Outros componentes do meio diluidor também influenciam na concentração ótima de glicerol: o conteúdo total de gema de ovo utilizada (Saroff e Mixner, 1955; Pace e Graham, 1974), os sólidos totais do leite (Amann e Almquist, 1957), as concentrações de Tris (Salamon e Visser, 1972), dentre outros componentes.

2.3.2 Gema de Ovo e Lipoproteína de Baixa Densidade (LBD)

Desde a descoberta de suas ações (Phillips, 1939; Phillips e Lardy, 1940), a gema de ovo se tornou um aditivo indispensável para a manutenção do sêmen resfriado e também para sua criopreservação. Phillips e Lardy (1940), em seus primeiros estudos, observaram efeitos benéficos da adição de gema de ovo em meios para preservação do sêmen de bovinos a 5°C.

Dentre os principais efeitos da gema de ovo, estão a proteção contra o choque térmico, a preservação da motilidade espermática, a diminuição da saída de enzimas acrossomais (hialuronidase) e a manutenção da integridade de membranas mitocondriais (Salamon e Maxwell, 2005).

Apesar das vantagens, por ser um produto de origem animal, a gema traz riscos de contaminação para o diluidor de sêmen. Estudos apontam a importância da origem dos ovos utilizados em meios diluidores,

uma vez que, dependendo de sua procedência, podem estar mais ou menos sujeitos à contaminação. Até mesmo os diluidores comerciais, à base de ovo e/ou leite, apresentam algum grau de contaminação microbiana (Bousseau *et al.*, 1998). O uso da gema de ovo em pó, que passa pelo processo de pasteurização, permite redução da contaminação e melhor padronização das amostras. A adição da gema de ovo em pó proporciona motilidade e integridade de acrossoma, após o descongelamento, semelhantes aos da gema fresca (Marco-Jiménez *et al.* 2004).

Outro inconveniente da utilização da gema de ovo em meios diluidores é a dificuldade de padronização das amostras, uma vez que a composição dos ovos pode variar dependendo da alimentação e da genética animal (Amirat *et al.*, 2005). Além disso, tem sido demonstrado que a gema de ovo possui grânulos e outras substâncias (lipoproteínas de alta densidade e minerais) que previnem trocas metabólicas dos espermatozoides ou diminuem sua motilidade (Kampschmidt *et al.*, 1953; Pace e Graham, 1974; Watson e Martin, 1975). Nesse contexto, pode-se imaginar que seria vantajosa a substituição da gema de ovo total apenas pelos componentes responsáveis pela crioproteção.

Em 1953, o efeito protetor da gema de ovo foi atribuído à presença das lipoproteínas. Nesse ano, Kampschmidt *et al.* observaram que não havia diferença estatística na motilidade, após o choque térmico induzido, do sêmen bovino preservado em meio com gema de ovo ou apenas com lipoproteína. Já em 1974, Pace e Graham congelaram sêmen de bovinos com gema de ovo integral e suas frações de alta e baixa densidade. Neste estudo, foi constatado que a fração lipoproteica de baixa densidade conferia a mesma crioproteção ao espermatozoide bovino que a gema integral.

A LBD compõe cerca de dois terços dos sólidos totais da gema do ovo de galinha e está localizada na parte solúvel da gema. Esta lipoproteína é composta por 83 a 89% de lipídeos e 11 a 17% de proteínas. Da fração lipídica, em média, 69% são triglicérides, 26% são fosfolipídios e 5% colesterol (Cook e Martin, 1969).

A fração lipídica da lipoproteína da gema do ovo provavelmente é a que está envolvida na

proteção contra o choque térmico (Watson, 1981). Foulkes (1977) e Graham e Foote (1987) sugeriram que a lipoproteína se adere às membranas celulares, protegendo-as contra o choque térmico.

Hipóteses mais recentes sugerem que a LBD se liga às proteínas do plasma seminal bovino (BSPs), que são produtos secretórios das glândulas vesiculares (Figura 1).

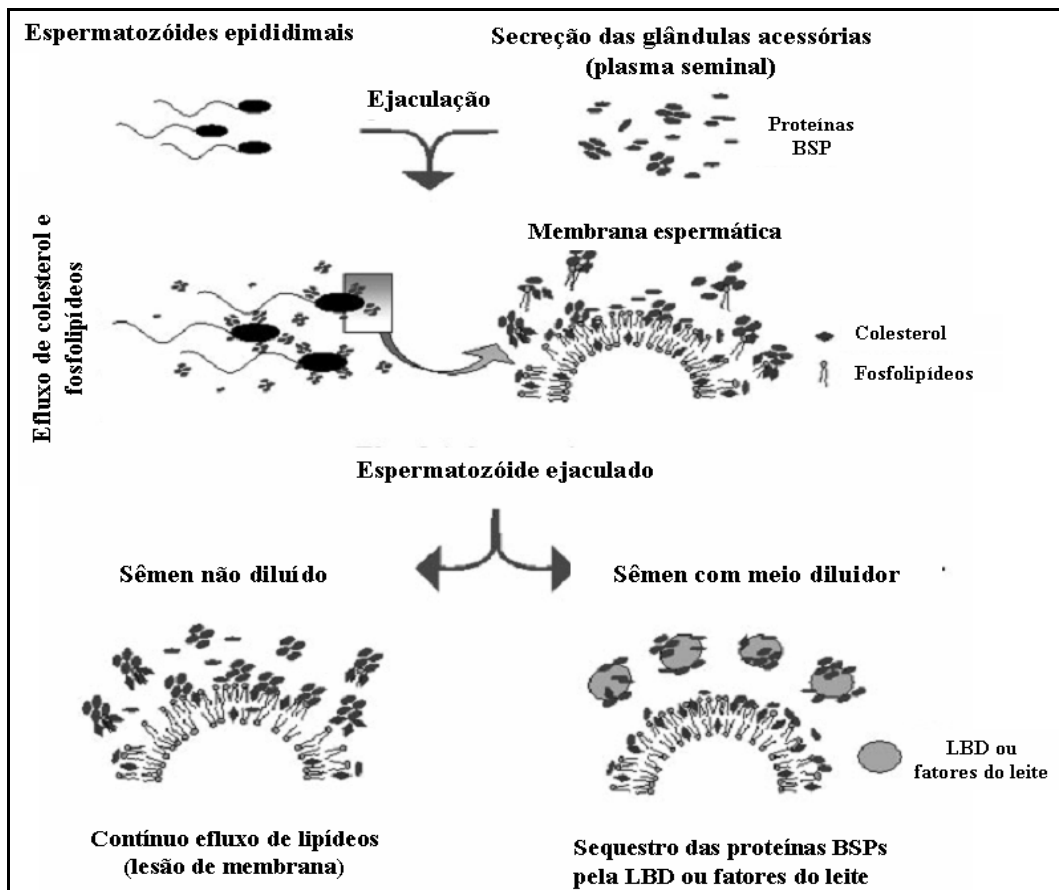


Figura 1: Mecanismo de atuação das lipoproteínas de baixa densidade em sêmen após diluição (adaptado de Manjunath *et al.*, 2002).

As proteínas do plasma seminal bovino geram o efluxo de colesterol da membrana plasmática, causando desestabilização de membranas e induzindo à capacitação espermática. Dessa forma, a LBD evita o efluxo de colesterol, aumentando a estabilidade da membrana e a resistência a baixas temperaturas (Manjunath *et al.*, 2002; Bergeron *et al.*, 2004; Bergeron e Manjunath 2006).

Semelhante ao encontrado para bovinos, foram isoladas, em 2005, as proteínas do plasma seminal de carneiros (RSPs). Ainda não se sabe a real importância dessas proteínas no processo de capacitação, mas é comprovado que as LBDs também se ligam a tais proteínas (Bergeron *et al.*, 2005).

A LBD tem sido amplamente estudada como alternativa ao uso da gema de ovo e tem apresentado resultados animadores em diversas espécies, tanto no que tange à motilidade e integridade de membranas espermáticas, quanto à capacidade de fecundação *in vitro* após a criopreservação (Glover e Watson, 1987; Babiak *et al.*, 1999; Amirat *et al.*, 2004; Juliani *et al.*, 2004; Amirat *et al.*, 2005; Jiang, 2007; Ahmad *et al.*, 2008; Bencharif *et al.*, 2008; Neves, 2008; Silva *et al.*, 2008; Varela Jr. *et al.*, 2008).

Silva *et al.* (2008) trabalharam com LBD, em substituição à gema de ovo, no resfriamento de sêmen de ovinos, usando as concentrações de 5, 10 e 20%. Nesse estudo, não foram observados efeitos benéficos da lipoproteína de baixa densidade sobre a motilidade espermática pós-resfriamento, porém a integridade de membranas foi preservada de forma semelhante ao meio com 16% de gema de ovo.

Varela Jr. *et al.* (2008) utilizaram 6, 8 e 10% de LBD para o resfriamento de sêmen de cão. De 24 a 96h de estocagem a 5°C, todas

as concentrações de lipoproteína de baixa densidade apresentaram melhores resultados ($P < 0,01$) de motilidade e integridade de membrana plasmática do que 20% de gema de ovo. Os pesquisadores também congelaram o sêmen dos mesmos animais com os mesmos meios, apenas acrescidos de 5% de glicerol. Ao descongelamento, verificaram que todas as concentrações de lipoproteína de baixa densidade preservaram a motilidade e a integridade de membrana plasmática em níveis significativamente superiores ($P < 0,01$) que o tratamento com gema de ovo. Porém, em nenhum dos estudos, foi observada variação entre os tratamentos utilizando diferentes concentrações de lipoproteína de baixa densidade.

Bencharif *et al.* (2008) obtiveram 6% de LBD como concentração ótima para congelamento de sêmen de cão, em que a motilidade média após o descongelamento foi de 55,3%, comparada a 27,7% encontrada com o uso do meio diluidor com 20% de gema. A integridade de membrana acrossomal também foi superior para o meio com 6% de LBD, com média de 81,3% de células com membranas íntegras, enquanto os espermatozoides criopreservados em meio com 20% de gema apresentaram apenas 56,6% de integridade de membranas.

Neves (2008) também obteve resultados satisfatórios com a substituição da gema de ovo pela LBD no congelamento de sêmen canino. Em seu estudo, foi observado que a utilização de 8, 16 e 20% de lipoproteínas de baixa densidade no meio diluidor foi capaz de promover, após o descongelamento, resultados similares aos encontrados para os espermatozoides diluídos em meio com 20% de gema. A autora também utilizou as mesmas concentrações de lipoproteínas sob a forma liofilizada e pôde observar que 8% de LBD liofilizada também proporcionou resultados semelhantes ($P > 0,05$) aos obtidos com lipoproteínas frescas ou gema de ovo total.

Para o congelamento de sêmen de suínos, Jiang *et al.* (2007) encontraram 9% de LBD como concentração ideal no meio diluidor. Esta foi capaz de aumentar significativamente ($P<0,05$) a motilidade espermática pós-descongelamento e o percentual de integridade de membrana plasmática. A integridade de acrossoma e a atividade mitocondrial foram preservadas de forma semelhante por todas as concentrações de LBD (6, 7, 8, 9 e 10%) utilizadas, sendo todas superiores ($P<0,05$) ao meio controle com 20% de gema de ovo.

Amirat *et al.* (2005) compararam um meio contendo 8% de LBD com dois diluidores comerciais, um à base de lecitina de soja e outro à base de gema de ovo. Para isso, foram utilizados ejaculados de bovinos, em que uma fração foi mantida a 4°C por 24h e a outra foi criopreservada. Após 4h de incubação, as diferenças entre diluidores já puderam ser notadas. O sêmen diluído em meio com 8% de LBD apresentou os menores percentuais de reação acrossômica e lise de acrossoma, além dos maiores percentuais de células íntegras quando comparadas aos outros dois diluidores ($P<0,05$). O meio diluidor contendo 8% de LBD também foi eficaz para a criopreservação, proporcionando 61,0% de motilidade média após o descongelamento, enquanto o meio comercial, à base de gema de ovo, mostrou 31,8% de motilidade.

Em outro estudo, Amirat *et al.* (2004) compararam o potencial de fecundação *in vitro* do sêmen bovino criopreservado em meio com 8% de LBD com um diluidor comercial à base de gema de ovo. A taxa de clivagem foi significativamente maior com sêmen criopreservado em meio com lipoproteína de baixa densidade do que no meio comercial (63,0% vs 54,8%, $P<0,05$).

Ahmad *et al.* (2008) trabalharam com criopreservação de sêmen de caprinos, em que foi comparado o efeito de um meio diluidor comercial contendo 20% de gema

de ovo com outros diluidores contendo diferentes concentrações de LBD (2, 4, 6, 8 e 10%). Os autores observaram maior motilidade e velocidade progressiva após o descongelamento no sêmen criopreservado em meio com 8% e 10% de lipoproteína quando comparado aos meios com 20% de gema de ovo ou com 2% de lipoproteína ($P<0,05$). Também foi constatado que o meio diluidor contendo 8% de LBD promoveu maior percentual de integridade de membrana acrossomal e reatividade ao teste hiposmótico que o diluidor com gema de ovo ($P<0,05$), sendo, dessa forma, esta concentração sugerida como a ideal para a criopreservação de sêmen de caprinos.

2.4 Técnicas de avaliação espermática

As técnicas de avaliação espermática *in vitro* têm por objetivo demonstrar a estrutura e a funcionalidade de alguns atributos espermáticos, de forma prática e rápida, procurando estimar ao longo do tempo o grau de lesão causada pelo método de preservação ao longo do tempo. Contudo, muitos são os parâmetros correlacionados à fertilidade de uma amostra. Motilidade, morfologia e concentração espermática são os parâmetros tradicionais mais simples a serem avaliados (Barth e Oko, 1989), porém estão longe de predizerem a real qualidade seminal. O potencial fecundante depende, além de um mínimo de espermatozoides móveis por amostra, das características do seu movimento, do percentual de células normais, da integridade de membranas e de sua funcionalidade, da integridade do conteúdo nuclear e da função mitocondrial, mantendo a capacidade de sofrer capacitação, capacidade de se aderir à zona pelúcida e de sofrer reação acrossômica, dentre outros inúmeros atributos.

Assim, diversas técnicas laboratoriais têm sido desenvolvidas com o objetivo de aumentar a precisão em detectar a integridade dos diversos atributos e funções espermáticas (Sanchez-Partida *et al.*, 1999;

Rodriguez-Martinez, 2003; O'Meara *et al.*, 2008). A associação de técnicas tem se mostrado bastante útil e necessária. No entanto, é necessário que as técnicas tenham alta confiabilidade e repetibilidade.

2.4.1 Morfologia espermática

A leitura da morfologia espermática é realizada para se observar alterações na anatomia celular, que podem estar diretamente correlacionadas à baixa fertilidade de um reprodutor (Barth e Oko, 1989). O processo de criopreservação pode levar ao aumento na incidência de defeitos na região da cauda, causando redução na motilidade. Injúrias à região da cabeça e mais especificamente no acrossoma também são relatadas, principalmente em espermatozoides de ovinos, que são considerados sensíveis ao congelamento (Quinn *et al.*, 1969).

Diversas técnicas podem ser adotadas para avaliação da morfologia, com emprego de uma grande variedade de corantes ou pela técnica de preparação úmida. Esta tem a vantagem de evitar interações entre células e reagentes, além de permitir precisa observação da estrutura celular. Para a realização dessa técnica, o sêmen é diluído em solução de formol-salina-tamponada, em solução de glutaraldeído tamponada 0,2% (Barth e Oko, 1989) ou ainda apenas diluído no próprio meio de congelamento. É preparada uma fina gota, entre lâmina e lamínula, que será observada sob microscopia de contraste de fase ou microscopia diferencial de fase (DIC).

2.4.2 Análise computadorizada do sêmen (sistema CASA)

Diversos sistemas de análise computadorizada do sêmen têm sido desenvolvidos nas últimas décadas com o intuito de minimizar as falhas da análise subjetiva e aprofundar os estudos acerca da cinética espermática (Malmgren, 1997;

Tardif *et al.*, 1997; Amann e Katz, 2004). Dentre os parâmetros de avaliação, a velocidade progressiva e os padrões de movimentação celular têm sido correlacionados com testes funcionais, como penetração no muco cervical, penetração em oócitos de hamsters e resultados de fecundação *in vitro* (Centola, 1996; Januskauaskas *et al.*, 1999).

Neste tipo de sistema, os espermatozoides são identificados em imagens sucessivas que permitem estabelecer sua trajetória e diversas velocidades de deslocamento. Existem ajustes diferenciados para cada espécie, o chamado *setup*. É de grande importância a padronização do *setup*, de forma que possam ser feitas comparações de resultados entre laboratórios e centros de pesquisa (Rijsselaere *et al.*, 2003).

Apesar do alto custo, a análise computadorizada do sêmen possibilita rapidez, objetividade e repetibilidade nas avaliações, além de permitir identificar padrões precisos de hiperativação e, quando associada com outras técnicas, torna possível quantificar a produção de ATP (Silva e Gadella, 2006) e a integridade de membranas por sondas fluorescentes (Quintero-Moreno *et al.*, 2003). Dessa forma, tem sido cada vez mais preconizada sua utilização, principalmente para fins de pesquisa (Quintero-Moreno *et al.*, 2003; Amann e Katz, 2004).

Toda a terminologia utilizada para os parâmetros fornecidos pelo sistema CASA foi padronizada na França, em 1988 (Mortimer, 1997).

Dentre os parâmetros avaliados pelo sistema CASA estão: a motilidade total (MT - %), como percentual de células móveis; motilidade progressiva (MP - %), percentual de espermatozoides com movimento progressivo; velocidade curvilínea (VAP - $\mu\text{m/s}$), sendo o comprimento geral da trajetória do espermatozoide/tempo;

velocidade progressiva (VSL - $\mu\text{m/s}$), comprimento da trajetória considerando-a como uma reta entre o ponto inicial e o final/tempo; velocidade curvilínea (VCL - $\mu\text{m/s}$), como distância total entre cada posição do centro da célula durante a captura da imagem/tempo; amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH - μm); frequência de batimentos flagelares (BCF - Hz); retilinearidade (STR - %), relação entre espaço percorrido pelo espermatozoide e sua trajetória real (VSL/VAP x 100) e a linearidade (LIN - %), comparação entre trajetos retos e curvilíneos (VSL/VCL x 100).

2.4.3 Avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal

Diversos métodos de avaliação de integridade de membranas utilizam a associação de sondas fluorescentes (Harrison e Vickers, 1990; Valcárcel *et al.*, 1994; Söderquist *et al.*, 1997; Sukardi *et al.*, 1997; Celeghini *et al.*, 2007; Celeghini *et al.*, 2008; Yániz *et al.*, 2008). Essas sondas funcionam como substratos que, quando ligados a compostos ou regiões específicas da célula, emitem colorações fluorescentes que podem ser observadas sob microscopia de epifluorescência.

O iodeto de propídio (IP) é muito utilizado como marcador de integridade de membrana plasmática. Este é impermeável à membrana, somente a atravessando quando há alteração de permeabilidade ou rompimento, corando o núcleo celular em vermelho. Geralmente é utilizado em combinação com outras sondas, como o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) (Harrison e Vickers, 1990; Valcárcel *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1997; Söderquist *et al.*, 1997) e o conjugado isotiocionato de fluoresceína-*Psium sativum* (FITC-PSA) (Sukardi *et al.*, 1997; Celeghini *et al.*, 2007; Celeghini *et al.*, 2008).

A sonda isotiocionato de fluoresceína-*Psium sativum* é uma aglutinina da ervilha conjugada com um composto fluorescente. Esta aglutinina se liga a glicoconjugados da matriz acrossomal (Cross e Meizel, 1989). Dessa forma, quando a membrana acrossomal externa está lesada, este composto é capaz de penetrar e se ligar à matriz acrossomal, corando o seu conteúdo em verde-amarelado.

Sukardi *et al.* (1997) trabalharam com a associação de iodeto de propídio e isotiocionato de fluoresceína-*Psium sativum* na detecção do *status* acrossomal e da viabilidade de espermatozoides ovinos, após a indução da reação acrossômica com cálcio ionóforo. Foi observado que, além de marcar a integridade da membrana acrossomal, o isotiocionato de fluoresceína-*Psium sativum* permite a observação do *status* da reação acrossômica. Conforme a reação progride, o conteúdo acrossomal é perdido e menos fluorescência é observada. Em espermatozoides em que a reação acrossômica já foi completada, observa-se somente um faixa verde fluorescente na zona equatorial.

Celeghini *et al.* (2006), trabalhando com sêmen de ovinos, utilizaram a associação do iodeto de propídio e o isotiocionato de fluoresceína-*Psium sativum* com um fluorocromo marcador de potencial mitocondrial, o JC-1. Para a padronização deste protocolo, foi realizado o congelamento rápido de espermatozoides sem qualquer crioproteção (*flash frozen*), e estes foram adicionados em diferentes proporções ao sêmen *in natura* (íntegro). Desta forma, foi possível observar a existência de alta correlação entre o percentual de células lesadas e marcadas pelos fluorocromos específicos para cada estrutura espermática.

2.4.4 Teste hiposmótico

O teste hiposmótico avalia a integridade funcional da membrana plasmática espermática. Nesta técnica, o espermatozoide é submetido a um ambiente com osmolaridade inferior à fisiológica. Na tentativa de estabelecer o equilíbrio osmótico, ocorre influxo de água para o compartimento mais concentrado (meio intracelular). Com a passagem da água, a membrana plasmática na região da cauda expande-se até se tornar túrgida e tomar um formato esférico, dobrando ou enrolando a cauda do espermatozoide. Essas alterações na membrana plasmática e cauda são facilmente observadas sob microscopia de contraste de fase em aumento de 400x (Jeyendran *et al.*, 1984).

Para a realização do teste, o tempo de incubação e a osmolaridade da solução são pontos cruciais. As soluções hiposmóticas são preparadas com combinações de açúcares e eletrólitos, que são capazes de provocar a reação nas células e, ao mesmo tempo, manter a integridade da membrana plasmática. Sacarose, frutose e melitose são os açúcares mais utilizados, e o citrato de sódio o eletrólito de escolha. Porém, ainda que com a mesma osmolaridade, soluções preparadas com diferentes combinações e concentrações dessas substâncias causam respostas diferentes nas células (Jeyendran *et al.*, 1984).

A variabilidade entre espécies na resposta espermática ao estresse osmótico é outro fator a ser considerado. Espermatozoides de humanos, caninos, equinos, caprinos e ovinos reagem à soluções com 150, 60, 100, 60, e entre 100 e 150 mOsm, respectivamente (Jeyendran *et al.*, 1984; Kumi-Diaka, 1993; Melo e Henry, 1999; Fukui *et al.*, 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e período

As coletas e a avaliação do sêmen pré-congelamento, o congelamento e as análises pós-criopreservação, o teste hiposmótico e o teste de termorresistência foram conduzidos no Laboratório de Reprodução Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, no período de abril a julho de 2008.

As demais avaliações pós-criopreservação, análise computadorizada do sêmen (CASA), morfologia e a avaliação por sondas fluorescentes foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP-Pirassununga, no período de novembro a dezembro de 2008.

3.2 Animais e coleta de sêmen

Foram utilizados 10 carneiros mestiços, com predominância da raça Santa Inês, com idade variando de dois a três anos e o escore corporal entre 3 e 4 (em escala de 1 a 5). Os animais foram alimentados com feno e sal mineral à vontade, e 200g/animal/dia de ração comercial para ovinos. Todas as coletas de sêmen foram realizadas com vagina artificial previamente aquecida entre 42 e 45°C e utilizando como manequim uma ovelha em cio natural ou induzido. Antes do período experimental, todos os carneiros foram submetidos a exame andrológico, seguindo o sugerido pelo Manual de Andrologia do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Foram utilizados ejaculados que apresentaram no mínimo 70% de motilidade, máximo de 30% de anormalidades espermáticas e no mínimo $1,8 \times 10^9$ espermatozoides por ejaculado. Foram coletados dois ejaculados por doador com intervalo de três dias.

3.3 Avaliação espermática pré-criopreservação

Após a coleta, o sêmen foi mantido em banho-maria a 37 °C e então avaliados o volume e subjetivamente a motilidade, o vigor e o turbilhonamento espermáticos. Também foram coletadas amostras para concentração, morfologia espermática e teste hiposmótico. A concentração espermática foi determinada após de diluição do sêmen em solução de formol-salina tamponada na taxa de 1:400 e posterior contagem em câmara de Neubauer sob microscopia óptica em aumento de 400X.

Para a análise de morfologia espermática, uma amostra do sêmen fresco foi colocada em solução de formol-salina tamponada previamente aquecida a 37°C. A leitura foi realizada pela técnica de preparação úmida, colocando-se uma gota de cada amostra entre lâmina e lamínula, sendo avaliada sob microscopia de contraste de fase (Olympus, BX-41), com aumento de 1000X, após contagem de 100 células por amostra. As alterações dos espermatozoides foram agrupadas em três categorias: defeitos de cabeça, de peça intermediária e de peça principal.

A avaliação da integridade funcional da membrana plasmática foi feita pelo teste hiposmótico (Jeyendran *et al.*, 1984), utilizando-se 10 microlitros do sêmen diluídos em 1000µL de solução de frutose-citrato a 100 mOsm (anexo 1). Esta solução foi incubada a 37°C por 30 minutos, fixada com 50µL de formol-salina tamponada, e foram analisadas 100 células por amostra em microscópio de contraste de fase (Olympus, BX-41) sob aumento de 400x. A porcentagem de células reativas ao HO foi calculada da seguinte forma:

$$\text{HO (\%)} = (\% \text{ de alterações na região da cauda após o teste HO}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda antes do teste HO})$$
 (Melo e Henry, 1999).

3.4 Processamento do sêmen para o congelamento

Após as análises do sêmen, cada ejaculado foi diluído, à temperatura ambiente, nos nove meios diluidores, objetivando obter concentração final de 100×10^6 espermatozoides/mL.

O meio diluidor base foi o Tris-glicose, como sugerido por Salamon e Visser (1972) (anexo 2). Os tratamentos consistiram na substituição da gema de ovo pelas lipoproteínas de baixa densidade nas formas fresca e liofilizada, seguindo diferentes concentrações. A concentração inicial foi baseada na pesquisa de Moussa *et al.* (2002), que obtiveram melhores resultados utilizando 8% p/v de lipoproteínas para a criopreservação de espermatozoides bovinos. A partir daí, optou-se por testar três concentrações maiores: 12, 16 e 20%, sendo o glicerol a 5% o crioprotetor permeante utilizado.

Para o preparo dos meios, foram utilizados ovos frescos de galinha em que uma fração foi destinada ao preparo do meio diluidor controle e a outra destinada à extração das lipoproteínas de baixa densidade. A extração foi realizada segundo o protocolo descrito por Moussa *et al.* (2002), modificado por Neves (2008) (anexo 3). Após a extração, parte da lipoproteína purificada foi destinada ao preparo dos meios constituídos por lipoproteínas naturais e a outra foi submetida ao protocolo de liofilização descrito por Neves (2008) (anexo 4) e, posteriormente, utilizada para a confecção dos meios restantes, totalizando nove diluidores, conforme descrito a seguir.

T1: Tris-glicose, 16% de gema (controle)

T2: Tris-glicose, 8% de LBD natural

T3: Tris-glicose, 12% de LBD natural

T4: Tris-glicose, 16% de LBD natural

T5: Tris-glicose, 20% de LBD natural

T6: Tris-glicose, 8% LBD de liofilizada

T7: Tris-glicose, 12% LBD de liofilizada

T8: Tris-glicose, 16% LBD de liofilizada

T9: Tris-glicose, 20% LBD de liofilizada

Depois da diluição final, as amostras foram cuidadosamente homogeneizadas e envasadas em palhetas de 0,25mL, à temperatura ambiente. As palhetas foram seladas com massa de modelar atóxica.

3.5 Resfriamento, congelamento e descongelamento dos espermatozoides

Para o resfriamento, as palhetas foram acondicionadas, em posição vertical, em recipiente de vidro (16 cm de altura e 7,5 cm de diâmetro), contendo 300 mL de água a 25°C. Este recipiente foi colocado dentro da câmara de resfriamento, mantida a 5°C, durante três horas a três horas e meia até atingir 5°C. Cada recipiente de vidro continha palhetas de todos os tratamentos, de apenas um animal.

As curvas de resfriamento foram monitoradas por termômetro digital de alta precisão (Digi-Sense, Cole Parmer®) com o sensor inserido dentro de uma palheta contendo apenas meio diluidor. A taxa de resfriamento no dia 1 foi de - 0,61°C/min até 14,9°C; dos 14,9 aos 10°C, a taxa foi de - 0,16°C/min. e, a partir daí, a queda na temperatura foi de - 0,028°C/min, até 6,3°C. No dia 2, a taxa de resfriamento foi de - 0,37°C/min até 14,9°C, - 0,12°C/min até 10°C e - 0,02°C/min até 6°C. A curva de resfriamento média dos dois dias de coletas experimentais está ilustrada a seguir (figura 2).

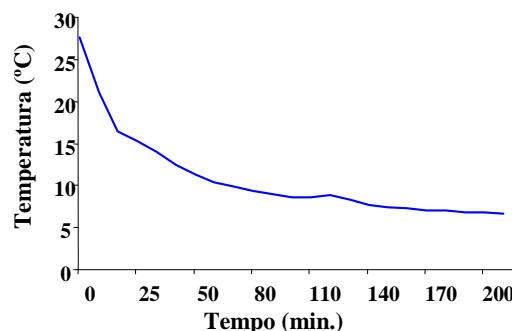


Figura 2: Curva média de resfriamento do sêmen ovino após a diluição nos diferentes meios.

Após o resfriamento, as palhetas foram colocadas em suporte de isopor de 3cm de altura e dentro de uma caixa de isopor contendo 3cm de nitrogênio líquido. As palhetas permaneceram no vapor de nitrogênio durante 15 minutos. Após o congelamento, as palhetas foram imersas e armazenadas em botijão de nitrogênio líquido.

O descongelamento foi realizado em banho-maria a 37°C por 30 segundos, e as amostras para avaliação foram retiradas de um *pool* de três palhetas por tratamento/animal, descongeladas simultaneamente, e homogeneizadas dentro de um tubo de microcentrífuga de 1,5mL.

3.6 Avaliação espermática após o descongelamento

A avaliação da motilidade espermática foi feita por meio de análise computadorizada (CASA). Para isso, uma gota de 3,5µL de cada amostra foi colocada entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 37°C, e acondicionada ao aparelho modelo Ivos-Ultimate da Hamilton Torne Biosciences®. O *setup* foi ajustado de acordo com os padrões de sêmen de ovino fresco (anexo 5), sendo registrados os seguintes parâmetros: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL),

velocidade curvilínea (VCL), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento da cauda (BCF), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN). Para cada parâmetro, foi utilizada a média de três campos para a análise estatística.

A taxa de redução da motilidade foi comparada entre os tratamentos, por meio do cálculo da diferença entre a motilidade do sêmen fresco e a motilidade após a criopreservação. Os valores foram expressos em percentual.

Para a análise da morfologia espermática, optou-se pelo armazenamento em geladeira, por no mínimo 24h, das amostras descongeladas, uma vez que a solução de formol-salina-tamponada causou aglutinação das células, prejudicando a avaliação. A técnica de preparação úmida foi realizada, colocando-se 3µL da amostra entre lâmina e lamínula, e foram contadas 100 células por animal/tratamento em aumento de 1000X, sob microscopia de interferência diferencial de fase (Nikon, modelo 80i).

O teste hiposmótico foi realizado da mesma forma descrita para o sêmen recém-coletado.

A integridade estrutural de membrana plasmática e acrossomal foi avaliada pela metodologia adaptada da técnica descrita por Celeghini *et al.* (2006), usando os fluorocromos iodeto de propídeo e isotiocianato de fluoresceína-*Psium sativum* (anexo 6). Cada amostra foi diluída em meio TALP (anexo 7), preparado no dia, até se obter a concentração de 25×10^6 espermatozoides/mL. Após a diluição, foi retirada uma alíquota de 150µL e colocada em tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, juntamente com 3µL de iodeto de propídeo (0,5mg/mL em DPBS) e 50µL de isotiocianato de fluoresceína-*Psium sativum* (100µg/mL em DPBS). Cada amostra foi incubada a 38,5°C por 8 minutos, ao abrigo da luz, e a leitura realizada sob microscopia

de epifluorescência (Nikon, modelo eclipse 80i), em um filtro triplo (D/F/R, C58420) constituído pelos conjuntos UV-2EC (excitação de 340-380nm e emissão de 435-485), B-2E/C (excitação 465-495 e emissão 515-555) e G-2E/C (excitação 540-525 e emissão 605-655), em aumento de 1000x.

As células foram classificadas em quatro categorias, de acordo com a fluorescência emitida:

- PIAI (membranas plasmática e acrossomal íntegras) – negativas ao iodeto de propídeo (IP) e ao isotiocianato de fluoresceína-*Psium sativum* (FITC-PSA);
- PIAL (membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada) – negativas ao IP e positivas ao FITC-PSA;
- PLAI (membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra) – positivas ao IP e negativas ao FITC-PSA;
- PLAL (membranas plasmática e acrossomal lesadas) – positivas ao IP e ao FITC-PSA.

3.7 Análise estatística

O delineamento estatístico foi o de blocos inteiramente casualizados, sendo cada animal considerado como um bloco. Cada animal teve o sêmen congelado duas vezes e o valor médio dos dois congelamentos, para cada parâmetro avaliado, foi adotado para a análise estatística. Foram calculadas médias e desvios-padrão segundo Sampaio (1998), e a análise de variância (ANOVA) foi realizada com auxílio do programa estatístico SAS (Statistical Analyses System). Os valores foram comparados pelo teste múltiplo de Duncan, considerando-se diferença estatística quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

Nos dois dias de coleta, todos os ejaculados possuíram características dentro dos padrões sugeridos pelo Manual de Andrologia do

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). As médias e os desvios-padrão das características dos ejaculados,

avaliados imediatamente após a coleta, estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Características do ejaculado de ovinos avaliados subjetivamente, imediatamente após a coleta.

Característica	Média ± dp	Amplitude de variação
Volume (mL)	0,86±0,16	0,5-1
Motilidade (%)	74,5±6,86	70-80
Turbilhonamento (0-5)	3,9±0,71	2-5
Vigor (0-5)	3,95±0,22	3-4
Concentração (x10 ⁹ spz/mL)	5,25±2,18	2,82-9,78
Morfologia		
Normais (%)	80,15±14,47	70-92
Defeitos de cabeça (%)	0,45±0,49	0-1,5
Defeitos de PI (%)	10,05±9,11	0,5-28
Defeitos de PP (%)	5,85±3,18	0,5-12

Total de animais coletados = 10, os valores de cada animal correspondem à média de dois ejaculados.
dp – desvio-padrão; PI – peça intermediária; PP – peça principal.

Na tabela 2, estão apresentados os dados de motilidade e cinética de espermatozoides congelados em meios contendo diferentes concentrações de lipoproteína de baixa densidade e avaliados por sistema computadorizado imediatamente após o descongelamento.

As frações criopreservadas nos meios Triglicose e Tris 8, 12, 16 e 20% de LBD fresca apresentaram valores significativamente maiores (P<0,05) para velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL) e velocidade curvilínea (VCL), que as diluídas nos tratamentos contendo LBD liofilizada (P<0,05).

A amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) do espermatozoide foi significativamente maior (P<0,05) no sêmen criopreservado em meio contendo 20% de LBD fresca do que nos criopreservados em meio com 8, 12, 16 e 20% de LBD liofilizada. O percentual de células que mostraram linearidade (LIN) e retilinearidade (STR) foi maior (P<0,05) nas amostras criopreservadas no meio Triglicose-gema e nos meios contendo lipoproteína de baixa densidade fresca do que no sêmen diluído com lipoproteína de baixa densidade liofilizada.

Tabela 2 : Médias e desvios-padrão para motilidade e parâmetros de cinéticos, estimados pelo sistema análise computadorizada, de espermatozoides ovinos congelados/descongelados em meios com diferentes concentrações de lipoproteína de baixa densidade.

Parâmetro	Sêmen descongelado								
	G-G	8%F	12%F	16%F	20%F	8%L	12%L	16%L	20%L
MT (%)	20,9±11,9 ^a	25,0±12,6 ^a	25,3±13,6 ^a	25,5±16,4 ^a	28,0±13,5 ^a	4,5±2,6 ^b	7,3±5,3 ^b	5,3±5,7 ^b	3,8±2,3 ^b
MP (%)	6,6±4,2 ^a	12,6±7,2 ^a	12,7±9,3 ^a	10,8±8,3 ^a	10,6±5,7 ^a	1,4±1,7 ^b	3,0±2,6 ^b	1,6±2,3 ^b	1,2±1,2 ^b
VAP (µm/s)	58,6±6,3 ^{a,b,c,d}	87,3±12,7 ^a	84,9±9,7 ^{a,b}	75,8±8,4 ^{a,b,c}	81,0±5,9 ^{a,b}	53,4±18,9 ^d	70,2±20,1 ^{a,b,c,d}	56,8±27,7 ^{c,d}	63,7±19,0 ^{b,c,d}
VSL (µm/s)	56,1±6,6 ^{a,b,c}	72,2±14,0 ^a	71,5±10,1 ^a	62,3±8,6 ^{a,b}	65,3±6,1 ^{a,b}	38,3±18,1 ^c	51,3±13,9 ^{b,c}	41,7±22,9 ^c	46,2±16,2 ^{b,c}
VCL (µm/s)	121,5±13,5 ^{a,b}	153,3±14,8 ^a	142,2±15,3 ^{a,b}	132,0±11,5 ^{a,b}	140,5±9,2 ^{a,b}	105,7±31,8 ^b	133,3±45,6 ^{a,b}	111,2±42,6 ^b	126,0±37,0 ^{a,b}
ALH (m/s)	6,2±1,2 ^{a,b}	5,9±1,6 ^{a,b}	6,0±0,8 ^{a,b}	5,3±0,9 ^{a,b,c}	6,6±0,7 ^a	2,5±2,4 ^d	3,81±1,8 ^{b,c,d}	3,7±2,5 ^{b,c,d}	3,3±2,0 ^{c,d}
BCF (Hz)	30,2±3,3	34,5±4,3	33,4±3,3	31,8±2,6	29,4±2,0	28,1±8,2	30,5±10,1	27,5±10,1	27,7±8,8
LIN (%)	47,3±7,1 ^a	48,4±8,9 ^a	51,7±6,0 ^a	49,4±5,8 ^a	48,3±5,2 ^a	31,7±10,1 ^b	33,9±5,3 ^b	27,9±12,7 ^b	33,7±9,4 ^b
STR (%)	78,8±5,2 ^a	79,8±7,7 ^a	82,2±4,4 ^a	80,7±4,6 ^a	79,1±4,4 ^a	57,2±15,7 ^b	60,5±12,8 ^b	52,0±17,8 ^b	61,2±13,0 ^b

G-G – Tris-gema; 8%F – Tris-8% de LBD fresca; 12%F – Tris-12% de LBD fresca; 16%F – Tris-16% de LBD fresca; 20%F – Tris-20% de LBD fresca; 8%L – Tris-8% de LBD liofilizada; 12%L – Tris- 12% de LBD liofilizada; 16%L – Tris-16% de LBD liofilizada; 20%L – Tris-20% de LBD liofilizada; MT – motilidade total; MP – motilidade progressiva; VAP – velocidade de trajeto; VSL – velocidade progressiva; VCL – velocidade curvilínea; ALH – amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF – frequência de batimento de cauda; LIN – linearidade; STR – índice retilíneo do movimento espermático.
a,b,c,d: letras diferentes na mesma linha, resultados diferem entre si pelo teste múltiplo de Duncan (P<0,05).

A motilidade espermática reduziu significativamente após a criopreservação, em todos os tratamentos, quando avaliada pela taxa de redução da motilidade (tabela 3), expressa em percentual e representada pela queda na motilidade total em relação ao

sêmen fresco após a criopreservação. A taxa de queda na motilidade foi significativamente maior ($P < 0,05$) para as amostras criopreservadas nos meios contendo diferentes concentrações de LBD liofilizada.

Tabela 3: Taxa de redução da motilidade total espermática de ovinos, após a criopreservação em diluidores contendo diferentes concentrações de lipoproteínas de baixa densidade, nas formas natural e liofilizada.

Diluidores	Taxa de redução da motilidade (%)
G-G	$68,2 \pm 19,9^b$
8%F	$63,9 \pm 16,4^b$
12%F	$63,1 \pm 18,7^b$
16%F	$63,8 \pm 20,5^b$
20%F	$60,7 \pm 15,9^b$
8%L	$91,6 \pm 8,1^a$
12%L	$88,8 \pm 8,5^a$
16%L	$91,4 \pm 9,7^a$
20%L	$94,0 \pm 3,6^a$

G-G – Tris-glicose-gema; 8%F – Tris-8% de lipoproteína de baixa densidade (LBD) fresca; 12%F – Tris-12% de LBD fresca; 16%F – Tris-16% de LBD fresca; 20%F – Tris-20% de LBD fresca; 8%L – Tris-8% de LBD liofilizada; 12%L – Tris- 12% de LBD liofilizada; 16%L – Tris-16% de LBD liofilizada; 20%L – Tris-20% de LBD liofilizada. a,b: letras diferentes na mesma coluna, resultados diferem entre si, pelo teste múltiplo de Duncan ($P < 0,05$).

Na figura 3, estão apresentadas as motilidades total e progressiva, por diluidor após a criopreservação do sêmen nos meios Tris-glicose e Tris com 8, 12, 16 e 20% de LBD natural. Foi possível observar

diferença entre os carneiros quanto à congelabilidade do sêmen. Os animais 1, 2, 8 e 10 foram os que apresentaram as melhores motilidades após o descongelamento.

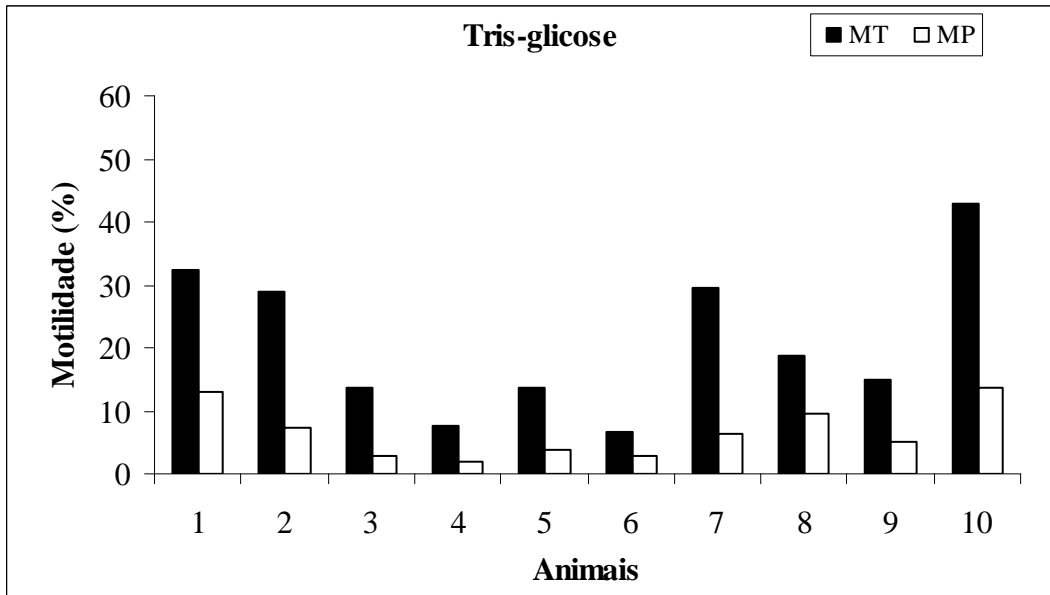


Figura 3: Motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) após descongelamento do sêmen de 10 carneiros diluído no meio Tris-glicose.

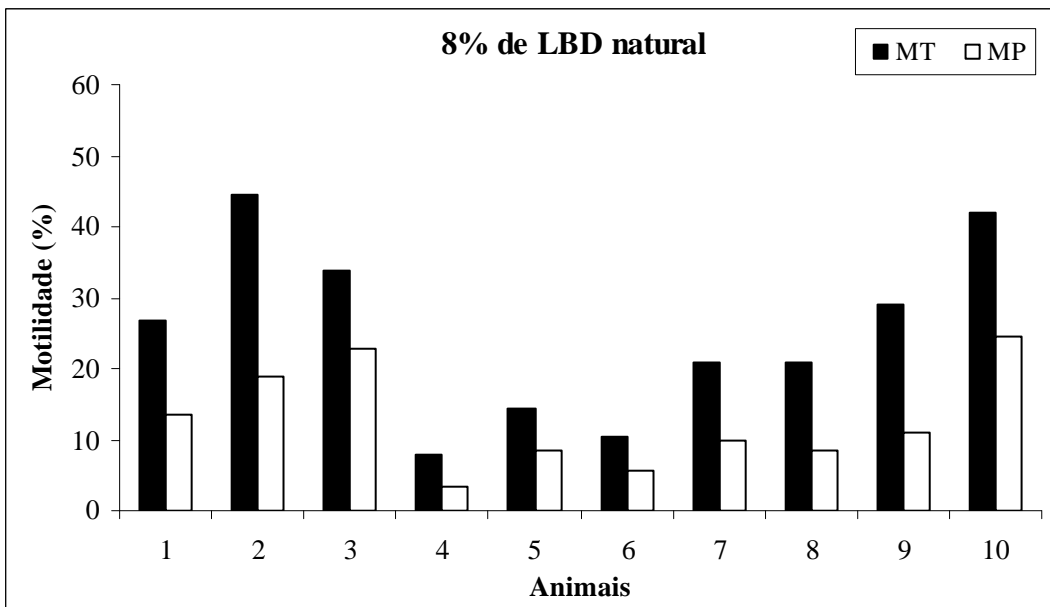


Figura 4: Motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) após descongelamento do sêmen de 10 carneiros diluído no meio Tris com 8% de LBD natural.

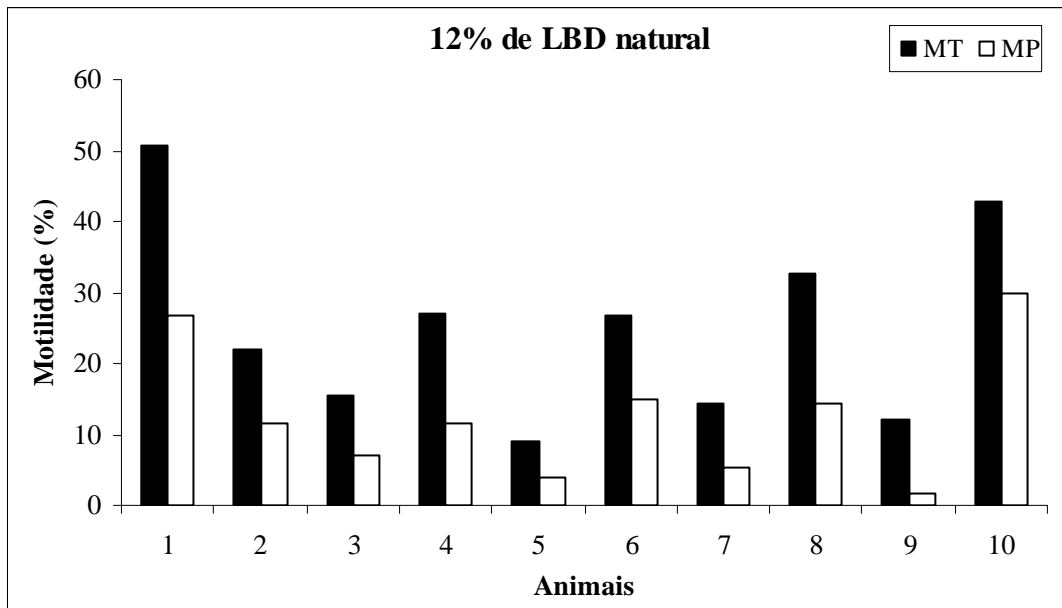


Figura 5: Motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) após descongelamento do sêmen de 10 carneiros diluído no meio Tris com 12% de LBD natural.

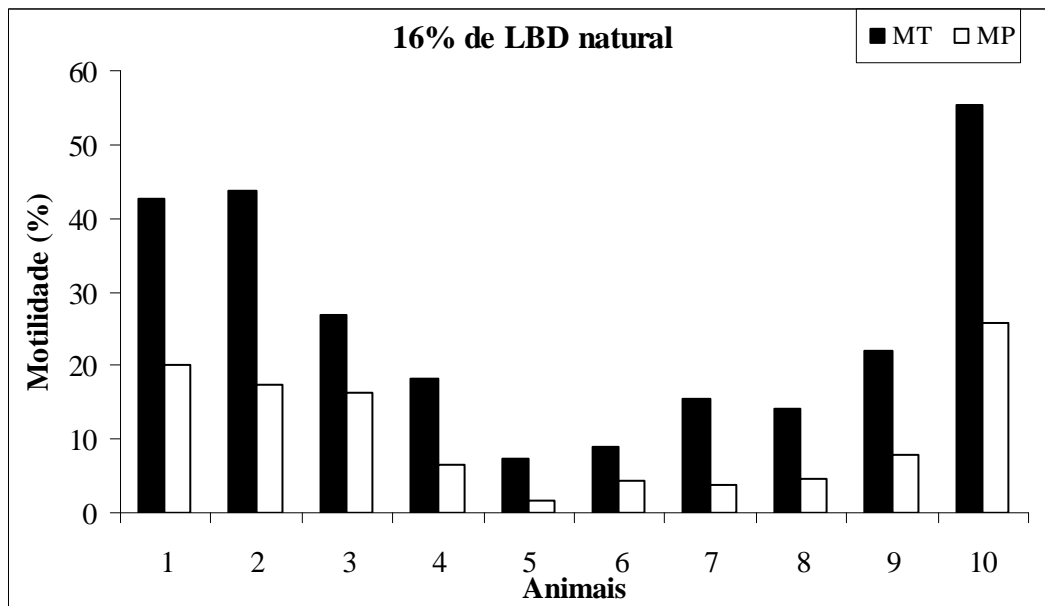


Figura 6: Motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) após descongelamento do sêmen de 10 carneiros diluído no meio Tris com 16% de LBD natural.

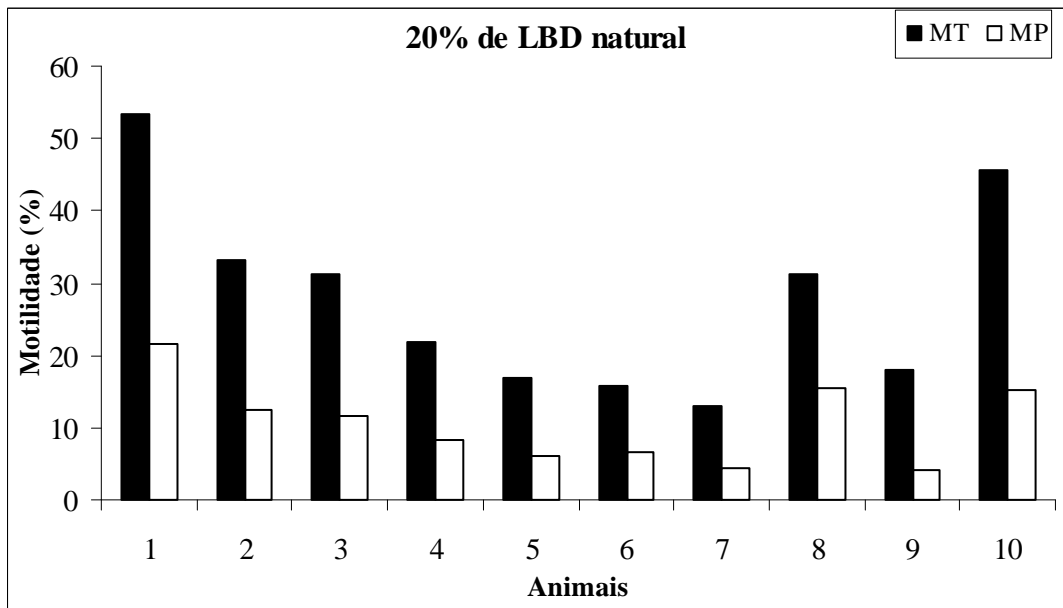


Figura 7: Motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) após descongelamento do sêmen de 10 carneiros diluído no meio Tris com 20% de LBD natural.

As médias de motilidade total durante o teste de termorresistência (TTR) estão apresentadas na figura 8. Do descongelamento (tempo 0) aos 120 minutos pós-incubação, a motilidade média do sêmen criopreservado nos meios Tris-glicose e Tris com 8, 12, 16 e 20% de LBD fresca foi

significativamente superior ($P < 0,05$) à do sêmen diluído nos meios Tris com 8, 12, 16 e 20 de LBD liofilizada (figura 4). Após 120 minutos de incubação, não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$), entre os diluidores, na manutenção da motilidade espermática.

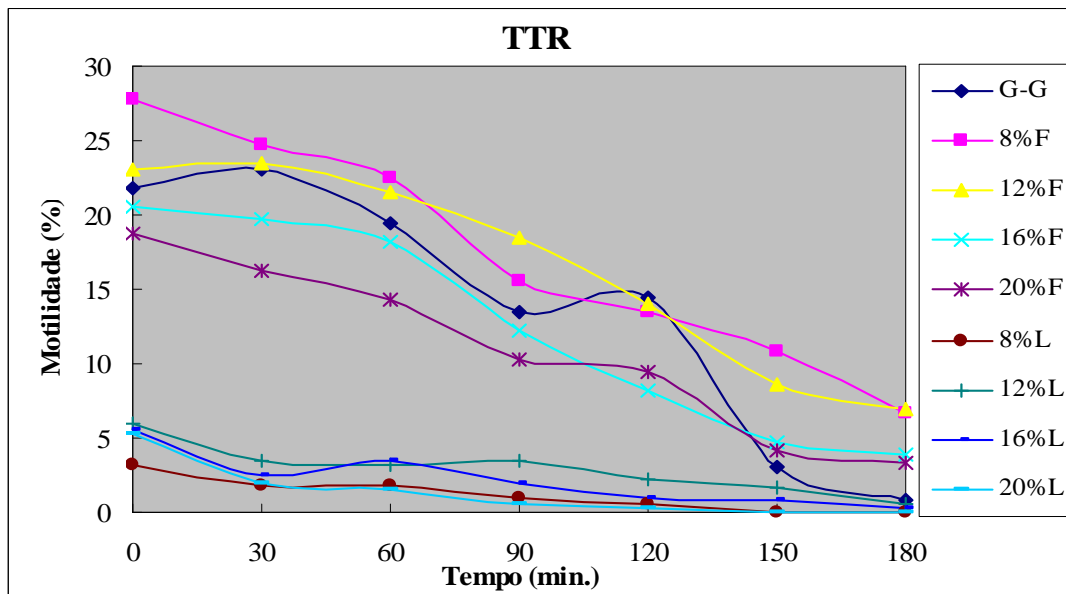


Figura 8: Motilidade total de espermatozoides ovinos congelados/descongelados em diferentes diluidores e submetidos ao teste de termorresistência, durante 180 minutos. G-G – Tris-glicose-gema; 8%F – Tris-8% de lipoproteína de baixa densidade (LBD) fresca; 12%F – Tris-12% de LBD fresca; 16%F – Tris-16% de LBD fresca; 20%F – Tris-20% de LBD fresca; 8%L – Tris-8% de LBD liofilizada; 12%L – Tris-12% de LBD liofilizada; 16%L – Tris-16% de LBD liofilizada; 20%L – Tris-20% de LBD liofilizada.

O processo de criopreservação levou à redução do percentual de espermatozoides classificados como normais, pela técnica de preparação úmida, sendo os meios Tris-glicose, Tris com 12 e 16% de LBD natural os que proporcionaram maior ($P < 0,05$) percentual de espermatozoides normais ($65,2 \pm 21,1\%$, $57,1 \pm 18,6\%$ e $62,0 \pm 21,2\%$, respectivamente) (figura 9). As alterações de acrossoma foram as mais frequentes após o descongelamento, principalmente o

destacamento da região apical. O sêmen diluído em meio à base de gema de ovo e o sêmen em 20% de LBD natural apresentaram menor ($P < 0,05$) percentual de células com defeitos de cabeça, de $21,2 \pm 10,4$ e $20,0 \pm 11,0\%$, respectivamente. Os espermatozoides criopreservados nos meios contendo LBD liofilizada apresentaram maior ($P < 0,05$) percentual de patologias na região da cabeça em relação aos demais tratamentos, em média de 63,2% (figura 9).

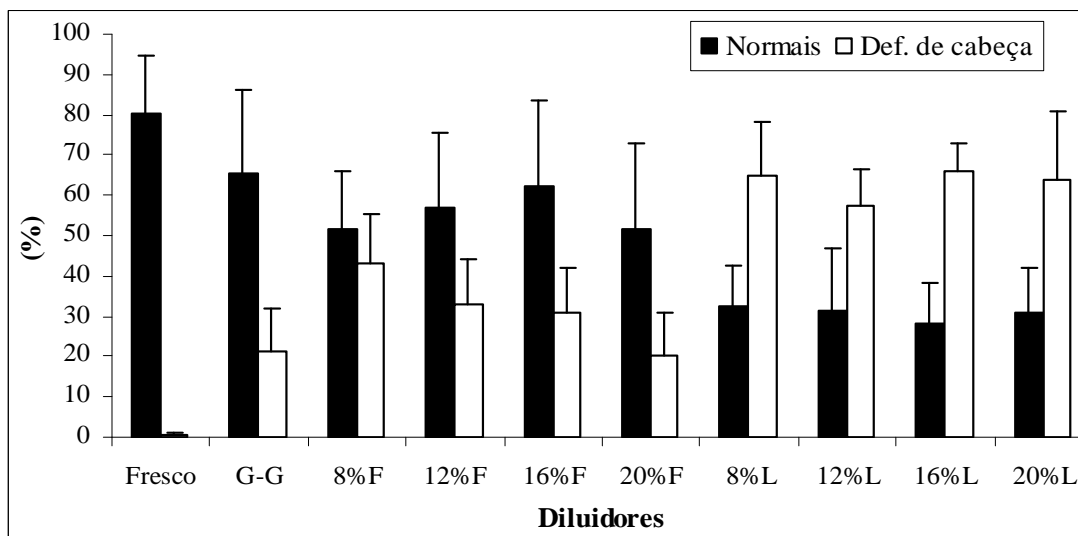


Figura 9: Percentual de células morfologicamente normais e com defeitos na região da cabeça, do sêmen fresco e após criopreservação nos diferentes diluidores. G-G – Tris-glicose-gema; 8%F – Tris-8% de lipoproteína de baixa densidade (LBD) fresca; 12%F – Tris-12% de LBD fresca; 16%F – Tris-16% de LBD fresca; 20%F – Tris-20% de LBD fresca; 8%L – Tris-8% de LBD liofilizada; 12%L – Tris- 12% de LBD liofilizada; 16%L – Tris-16% de LBD liofilizada; 20%L – Tris-20% de LBD liofilizada.

A integridade funcional e estrutural de membranas espermáticas foi avaliada pelo teste hiposmótico e pela associação dos fluorocromos, iodeto de propídio (IP) e isotiocianato de fluoresceína-*psium sativum* (FITC-PSA), respectivamente. O percentual de células reativas ao teste hiposmótico foi de $82,0 \pm 6,0\%$ para o sêmen fresco e, após a criopreservação, houve redução média de $74,4 \pm 10,4\%$ no percentual de células reativas, não sendo observada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os meios diluidores utilizados (tabela 4).

Pela técnica de fluorescência, o percentual médio de células totalmente íntegras (PIAI –

figura 10 - a), após o descongelamento, foi maior nas amostras preservadas nos meios contendo LBD natural (18,1%), porém não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre estes tratamentos e o Tris-glicose, que apresentou em média 13,8% de células íntegras. As amostras diluídas nos meios com LBD liofilizada apresentaram em média 6,2% de integridade de membranas significativamente inferior ($P < 0,05$) aos tratamentos anteriores. O percentual de células com membrana plasmática íntegra e acrossoma lesado (PIAL) não diferiu entre os tratamentos ($P > 0,05$), com média de $0,06 \pm 0,18\%$ para todos os diluidores (tabela 4).

A porcentagem de células com membrana plasmática lesada e acrossoma íntegro (PLAI – figura 10 - b) variou entre os meios diluidores. As amostras de sêmen criopreservado nos meios Tris-glicose e Tris com 8, 12 e 16% de LBD natural apresentaram os maiores valores ($23,6 \pm 5,3$; $22,6 \pm 6,4$; $21,8 \pm 5,5$ e $23,4 \pm 7,4\%$, respectivamente) ($P < 0,05$).

Entretanto, o percentual de células com membranas plasmática e acrossomal lesadas (PLAL – figura 10 - c) foi maior ($P < 0,05$) para o sêmen criopreservado nos meios diluidores contendo 8, 12, 16 e 20% de LBD

liofilizada ($74,0 \pm 10,5$; $73,7 \pm 8,6$; $80,2 \pm 5,9$ e $78,6 \pm 7,3\%$, respectivamente) do que para o sêmen criopreservado nos meios Tris-glicose ($62,6 \pm 10,5\%$) e Tris com 8, 12, 16 e 20% de LBD natural ($57,2 \pm 10,1$; $59,1 \pm 11,0$; $61,6 \pm 13,2$ e $60,3 \pm 10,8\%$, respectivamente) (tabela 4).

Para as demais categorias de classificação de integridade de membranas da região da cabeça, houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as células congeladas com LBD liofilizada em relação àquelas congeladas no meio controle e nos meios com LBD natural (tabela 4).

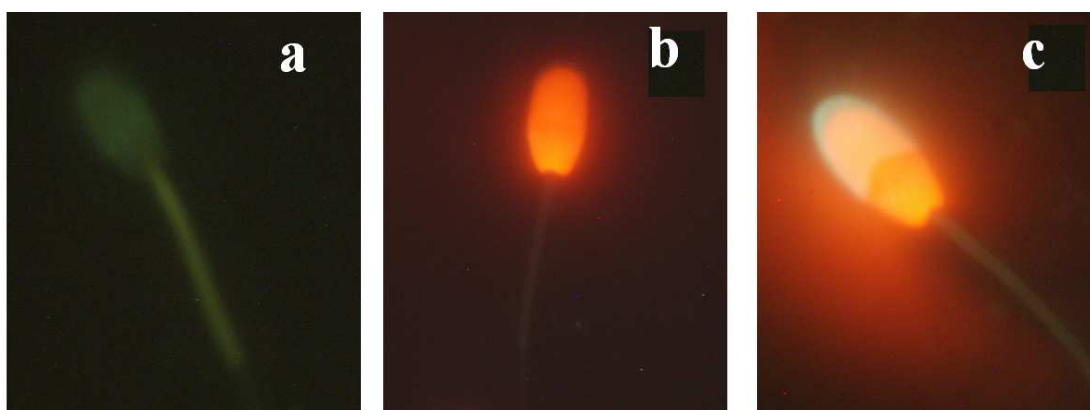


Figura 10: Categorias de integridade de membrana plasmática e acrossomal de espermatozoides ovinos avaliadas por sondas fluorescentes IP e FITC-PSA. a - Membrana plasmática e acrossoma íntegros (PIAI); b - Membrana plasmática lesada e acrossoma íntegro (PLAI); 1c - Membrana plasmática e acrossoma lesados (PLAL); IP – Iodeto de propídio; FITC-PSA - isotiocionato de fluoresceína-*Psium sativum*.

Tabela 4: Médias e desvios-padrão do percentual de espermatozoides ovinos reativos ao teste hiposmótico (HO) e redução da resposta após o descongelamento, e classificação dos espermatozoides por categoria de fluorescência emitida, pela associação das sondas IP e FITC-PSA.

Categoria	Sêmen Fresco	Diluidores								
		G-G	8%F	12%F	16%F	20%F	8%L	12%L	16%L	20%L
Reativos ao HO (%)	82,05±6,01 ^a	23,70±6,95 ^b	25,40±9,79 ^b	26,40±11,92 ^b	19,80±4,25 ^b	21,35±6,16 ^b	16,75±6,81 ^b	20,10±11,03 ^b	17,85±7,17 ^b	18,70±10,55 ^b
PIAI (%)	-	13,80±7,85 ^a	20,20±8,66 ^a	18,87±7,04 ^a	14,97±8,11 ^a	18,39±7,63 ^a	6,55±5,41 ^b	6,77±3,95 ^b	5,85±3,46 ^b	5,50±1,84 ^b
PIAL (%)	-	0,00±0,00	0,02±0,07	0,17±0,40	0,02±0,07	0,06±0,14	0,07±0,23	0,02±0,07	0,07±0,16	0,05±0,10
PLAI (%)	-	23,60±5,35 ^a	22,57±6,44 ^a	21,82±5,48 ^a	23,37±7,44 ^a	21,18±6,32 ^{a,b}	19,40±6,22 ^{a,b,c}	19,49±7,35 ^{a,b,c}	13,86±4,04 ^c	15,80±5,89 ^{b,c}
PLAL (%)	-	62,60±10,49 ^b	57,20±10,09 ^b	59,12±11,01 ^b	61,62±13,17 ^b	60,35±10,85 ^b	73,97±10,47 ^a	73,71±8,63 ^a	80,20±5,95 ^a	78,65±7,26 ^a

G-G – Tris-glicose-gema; 8%F – Tris-8% de LBD fresca; 12%F – Tris-12% de LBD fresca; 16%F – Tris-16% de LBD fresca; 20%F – Tris-20% de LBD fresca; 8%L – Tris-8% de LBD liofilizada; 12%L – Tris- 12% de LBD liofilizada; 16%L – Tris-16% de LBD liofilizada; 20%L – Tris-20% de LBD liofilizada. HO – teste hiposmótico; PIAI – membrana plasmática íntegra e acrossoma íntegro; PIAL – membrana plasmática íntegra e acrossoma lesado; PLAI – membrana plasmática lesada e acrossoma íntegro; PLAL – membrana plasmática lesada e acrossoma lesado; IP – Iodeto de propídio; FITC-PSA - isotiocionato de fluoresceína-*Psium sativum*.

O percentual de células com membrana plasmática íntegra (negativas ao iodeto de propídio) e o percentual de células com

membrana acrossomal íntegra (negativas ao FITC-PSA) estão ilustrados na figura 11.

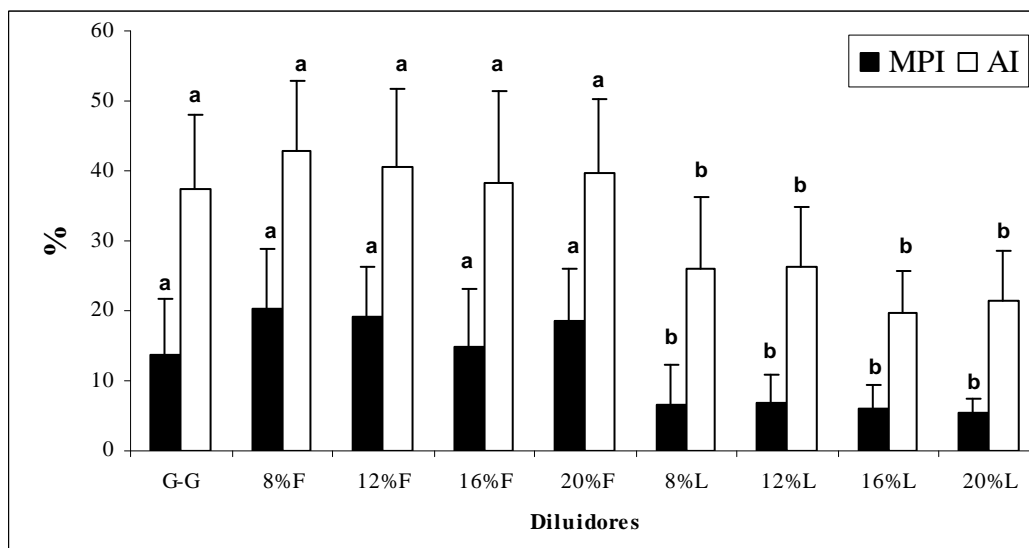


Figura 11: Integridade de membranas plasmática e acrossomal de espermatozoides de ovinos criopreservados em meios com gema de ovo e diferentes concentrações de lipoproteína de baixa densidade (LBD) fresca e liofilizada. G-G – Tris-glicose-gema; 8%F – Tris-8% de LBD fresca; 12%F – Tris-12% de LBD fresca; 16%F – Tris-16% de LBD fresca; 20%F – Tris-20% de LBD fresca; 8%L – Tris-8% de LBD liofilizada; 12%L – Tris- 12% de LBD liofilizada; 16%L – Tris-16% de LBD liofilizada; 20%L – Tris-20% de LBD liofilizada; MPI – membrana plasmática íntegra; AI – acrossoma íntegro.

a,b: letras diferentes sobre barras de mesma cor, resultados diferem entre si pelo teste múltiplo de Duncan ($P < 0,05$).

A integridade de membrana acrossomal (AI) foi influenciada pelo meio diluidor, sendo que os espermatozoides criopreservados nos meios Tris-glicose (37,4%) e contendo diferentes concentrações de LBD natural (média de 40,3%) apresentaram maior percentual de integridade ($P < 0,05$) quando comparados com aqueles criopreservados nos meios com diferentes concentrações de LBD liofilizada (média de 23,31%).

Neste trabalho, observou-se correlação positiva ($r = 0,88$; $P < 0,0001$) entre o percentual de células com integridade de

membrana plasmática e com integridade de membrana acrossomal (tabela 5). Também foi observada correlação positiva entre porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e a motilidade total e progressiva ($r = 0,81$ e $r = 0,78$, respectivamente; $P < 0,0001$). O percentual de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e com membrana acrossomal íntegra teve correlação positiva com a porcentagem de células com movimento rápido ($r = 0,78$ e $r = 0,81$, respectivamente; $P < 0,0001$) e com o percentual de células normais ($r = 0,55$ e $r = 0,52$, respectivamente; $P < 0,0001$).

Tabela 5: Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre os parâmetros espermáticos avaliados do sêmen ovinos após o descongelamento

	VAP	VSL	MPI
ALH	0,77	0,79	-
BCF	0,55	0,45	-
STR	0,79	0,86	-
LIN	0,75	0,85	-
AI	-	-	0,88
MT	-	-	0,81
MP	-	-	0,78
RAPID	-	-	0,78

ALH – amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF – frequência de batimento de cauda; STR – retilinearidade; LIN – linearidade; VAP – velocidade de trajeto; VSL – velocidade progressiva; AI – membrana acrossomal íntegra; MT – motilidade total; MP – motilidade progressiva; RAPI – percentual de células com movimento rápido; MPI – membrana plasmática íntegra. $P < 0,0001$.

5. DISCUSSÃO

Após o descongelamento, a motilidade total e a motilidade progressiva dos espermatozoides criopreservados nos meios contendo LBD natural foram similares a dos diluídos no meio controle Tris-glicose com 16% de gema de ovo total. Porém, os resultados obtidos foram inferiores aos relatados na literatura para sêmen de ovinos (Gil *et al.*, 2003; Maia, 2006; Anel *et al.*, 2006; O’Meara *et al.*, 2008). Provavelmente, essas diferenças estão ligadas à composição dos meios diluidores utilizados nos experimentos, aos protocolos distintos de congelamento e à individualidade dos animais. No entanto, a taxa de redução da motilidade em relação ao sêmen fresco, para os diluidores Tris-glicose (68,2%) e Tris com diferentes concentrações de lipoproteína de baixa densidade natural (62,8%), foi semelhante ao encontrado por Maia (2006), que obteve 63,5% de redução após a criopreservação com o diluidor Tris-gema.

Os meios contendo LBD natural e com gema de ovo integral foram igualmente eficazes na manutenção da motilidade espermática após o descongelamento e a incubação a 37°C por 120 minutos, sendo significativamente superiores ($P < 0,05$) aos diluidores contendo lipoproteínas liofilizadas. De 120 a 180 minutos de incubação, não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre os diluidores para a manutenção da motilidade espermática após o descongelamento.

O mesmo pôde ser observado para a avaliação da cinética espermática. Os meios contendo LBD natural promoveram velocidades de deslocamento espermático semelhantes às encontradas para os espermatozoides criopreservados no meio Tris-glicose (controle). Moussa *et al.* (2002) demonstraram que espermatozoides de bovinos congelados e descongelados em meios diluidores contendo várias concentrações de lipoproteínas de baixa

densidade mostraram velocidades de trajeto, velocidade progressiva e velocidades curvilineares semelhantes às obtidas com o meio contendo 20% de gema de ovo integral. Em estudo recente com sêmen de caprinos, realizado por Ahmad *et al.* (2008), foi encontrado melhoria ($P < 0,05$) na velocidade progressiva dos espermatozoides, após o descongelamento, com a substituição da gema de ovo por 8% de LBD. As demais concentrações de lipoproteína de baixa densidade (2, 4, 6 e 10%), estudadas por estes autores, promoveram velocidades espermáticas similares às encontradas para o sêmen diluído em meio com 20% de gema de ovo.

Observou-se também que a amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) foi maior ($P < 0,05$) nos espermatozoides criopreservados nos meios Tris-glicose e Tris com LBD natural do que nas células preservadas nos meios contendo lipoproteínas liofilizadas. É relatado que, quando os espermatozoides estão diluídos em meios mais viscosos, o movimento da cabeça tende a aumentar (Marco-Jiménez *et al.*, 2004; Mortimer e Maxwell, 2004). Pode-se notar, no presente trabalho, correlação positiva entre a movimentação da cabeça e a velocidade progressiva. Essas duas características estão diretamente correlacionadas à capacidade do espermatozoide de penetração no muco cervical de ovelhas (Aitken *et al.*, 1985; Mortimer *et al.*, 1986). Contudo, ainda não se pode afirmar até que ponto esses dois atributos estão ligados apenas à viscosidade do meio ou se representam, realmente, um atributo qualitativo da célula espermática.

De acordo com a avaliação dos atributos de cinética espermática, foi possível constatar ausência de espermatozoides hiperativados após o descongelamento, segundo os padrões definidos por Mortimer e Maxwell (1999). Estes autores sugeriram que a hiperativação é caracterizada por velocidade curvilinear $\geq 250 \mu\text{m/s}$, velocidade

progressiva $\leq 100 \mu\text{m/s}$, linearidade $\leq 30\%$ e amplitude de deslocamento lateral da cabeça $\geq 9,0 \mu\text{m}$.

A morfologia espermática foi prejudicada pela criopreservação, observando-se o aumento do percentual de patologias celulares, principalmente lesões de acrossoma, sendo o destacamento da região apical a alteração mais frequente. Quinn *et al.* (1969) demonstraram ser essa a região do espermatozoide ovino mais susceptível à crioinjúria. Todas as concentrações utilizadas de LBD natural utilizadas protegeram as membranas acrossomais semelhante ao meio controle contendo gema de ovo integral. Diferentemente, Bencharif *et al.* (2008) e Ahmad *et al.* (2008) obtiveram maior percentual de proteção acrossomal após o descongelamento do sêmen canino e caprino diluído com 6% de LBD, respectivamente.

Salamon e Maxwell (2000) apontam a membrana plasmática do espermatozoide ovino como outra região da célula espermática muito sensível ao congelamento, e, no presente experimento, observou-se que esta foi menos resistente ao congelamento do que a membrana acrossomal. O mesmo foi encontrado por Arruda *et al.* (2005) e Celeghini *et al.* (2008), ao criopreservarem espermatozoides de bovinos, verificando-se maior percentual de células com integridade de membrana acrossomal do que com integridade de membrana plasmática. Por outro lado, D'Alessandro *et al.* (2001), congelando espermatozoides ovinos no meio Tris-glicose, não encontraram diferença no percentual de danos ao acrossoma ou à membrana plasmática. Tais tipos de lesões são comuns durante a criopreservação e podem ocorrer durante o resfriamento, congelamento ou, até mesmo, durante o descongelamento das células (Mazur, 1984; Amman e Pickett, 1987; Salamon e Maxwell, 1995). A resistência celular a essas lesões varia entre espécies, indivíduos

e até mesmo entre ejaculados (Holt e Look, 2004).

Para todos os tratamentos, o percentual de espermatozoides com membranas lesadas foi maior do que o de células móveis. Este achado está de acordo com o relatado por Salamon e Maxwell (2000), que demonstraram, após o descongelamento, que os espermatozoides podem manter sua motilidade, porém com sua estrutura danificada e, conseqüentemente, com a fertilidade comprometida. Ainda assim, notou-se que os diluidores contendo LBD natural foram capazes de proteger as membranas plasmática e acrossomal da mesma forma que o meio Tris-glicose e que estes foram significativamente superiores aos meios com lipoproteínas liofilizadas.

Esses achados confirmam o papel da fração lipoproteica de baixa densidade da gema de ovo na proteção de espermatozoides de mamíferos durante o resfriamento e criopreservação, tal como reportado por diversos autores (Kampschmidt *et al.*, 1953; Pace e Graham, 1974; Foulkes, 1977; Watson, 1981; Graham e Foote, 1987; Moussa *et al.*, 2002; Manjuntah *et al.*, 2002; Bergeron *et al.*, 2004; Bergeron e Manjunath, 2006).

Contudo, o real mecanismo de atuação da LBD, durante a criopreservação, ainda não está completamente elucidado. Sabe-se que, durante o resfriamento, há desorganização das lipoproteínas e, assim, os triglicérides e os fosfolipídeos são liberados no meio, e a fração proteica forma um gel ao redor da célula espermática (Tsutsui, 1988).

Foulkes (1977) e Graham e Foote (1987) sugeriram que, durante o resfriamento, os fosfolipídios se aderem à membrana plasmática, formando um filme protetor. Os autores também comprovaram, por meio de marcadores radioativos, que esses fosfolipídios podem ser incorporados à membrana plasmática, repondo os que são

perdidos pelo efluxo natural e, dessa forma, aumentando a estabilidade da membrana.

Outra hipótese mais recente, indica que as lipoproteínas de baixa densidade se ligam às proteínas do plasma seminal, responsáveis pelo efluxo de colesterol, e aumentam a resistência das membranas às baixas temperaturas (Manjunath *et al.*, 2002; Bergeron *et al.*, 2004; Bergeron e Manjunath, 2006). Ao contrário, alguns pesquisadores afirmam que a fração proteica das lipoproteínas não tem importância para a proteção das células durante a criopreservação (Watson, 1981); outros sugerem que o gel formado por esta fração, ao redor da célula, acaba por proteger os espermatozoides contra os cristais de gelo gerados durante o congelamento (Moussa *et al.*, 2002).

Os resultados obtidos neste estudo permitem inferir que, sob as condições adotadas, a substituição da gema de ovo pela LBD no meio Tris foi capaz de preservar a motilidade, as características da cinética e a integridade de membranas plasmática e acrossomal dos espermatozoides, após o descongelamento. Além disso, essa capacidade foi verificada independentemente da concentração de lipoproteína utilizada no meio diluidor.

Em contraste, a utilização da LBD liofilizada não apresentou bons resultados. A liofilização ou secagem pelo frio (*freeze dry*) é um processo de conservação de produtos biológicos que envolve os dois métodos, o congelamento e a desidratação. Esta técnica é normalmente empregada para a conservação de plasma sanguíneo (fracionado e total), tecidos humanos para transplantes (artérias e ossos), cultivos de bactérias e vírus, para vários alimentos e fármacos, mantendo as substâncias estáveis e viáveis por um longo período de tempo (Boyer, 1986).

No presente estudo, observou-se que, em todos os atributos avaliados, os espermatozoides criopreservados nos meios contendo diferentes concentrações de lipoproteínas liofilizadas apresentaram qualidade inferior aos diluídos nos demais tratamentos. São poucos os relatos de uso de LBD liofilizada para a criopreservação de espermatozoides. Uma pesquisa recente realizada por Neves (2008), utilizando LBD para a criopreservação de sêmen de cão, mostrou resultados igualmente satisfatórios com a utilização de 8% de lipoproteínas liofilizadas ou 20% de gema de ovo integral no meio diluidor. Provavelmente, no estudo aqui realizado, houve problemas na reorganização das moléculas das lipoproteínas de baixa densidade, após a ressuspensão, ou devido ao próprio meio utilizado para ressuspendê-las, que foi adaptado do estudo com sêmen canino. Dessa forma, pesquisas futuras são necessárias para ajustar a técnica de preservação e ressuspensão da lipoproteína de baixa densidade, de forma a torná-la viável para utilização na criopreservação de células espermáticas ovinas.

A utilização de LBD nos meios diluidores, independentemente se fresca ou liofilizada, não foi capaz de eliminar as diferenças

individuais quanto à congelabilidade do sêmen. Essas diferenças foram reportadas por outros autores (Salamon e Mawell, 2000; Holt e Look, 2004; Maia, 2006).

Foi possível observar que os espermatozoides dos animais 2, 3, 5, 7 e 9 tiveram a motilidade progressiva melhor preservada pelo meio contendo 8% de LBD fresca, enquanto os espermatozoides dos animais 1, 4, 6, 8 e 10 tiveram a motilidade progressiva melhor preservada em meios contendo 12% de lipoproteína fresca. O mesmo pode ser notado quanto aos demais atributos avaliados, como a integridade de membranas plasmática e acrossomal e os parâmetros de cinética espermática, em que os melhores resultados também foram obtidos com os espermatozoides preservados nos meios com 8 e 12% de LBD natural, porém sem diferença significativa.

Ouros estudos são necessários para se estabelecer a concentração ótima de lipoproteínas de baixa densidade em um meio diluidor para criopreservação de espermatozoides ovinos, bem como aprimorar as técnicas de armazenagem das lipoproteínas a fim de se facilitar sua utilização na rotina.

6. CONCLUSÕES

As lipoproteínas de baixa densidade mantiveram a viabilidade das células espermáticas após a criopreservação, da mesma forma que a gema de ovo total.

Não houve influência da concentração de lipoproteínas de baixa densidade utilizada e, assim, a adição de 8% de em meio para criopreservação de espermatozoides de ovinos já é capaz de promover resultados similares aos obtidos com o uso de concentrações maiores.

Os processos de liofilização e ressuspensão aqui empregados não foram capazes de preservar as características crioprotetoras das lipoproteínas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, M. A. A.; CHATAGNON, G.; AMIRAT-BRIAND, L. *et al.* Use of glutamine and low density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. *Reproduction in Domestic Animals*, 2008. Disponível em : < doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.00930.x>, acessado em dezembro, 2008.
- AITKEN, R. J.; SUTTON, M.; WARNER, P. Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamster oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 73, p. 441-449, 1985.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J. *et al.* *Molecular Biology of the Cell*. 4. ed. 2002. 3786p.
- AMANN, R. P.; ALMQUIST, J. O. Freezing of bovine semen. II. Effect of milk solids level, glycerol level and fresh skim milk diluents. *Journal of Dairy Science*, v.40, p.1542-1549, 1957.
- AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology*, v. 25, p. 317-325, 2004.
- AMANN, R. P.; PICKET, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science*, v.7, p. 145-173, 1987.
- AMIR, D.; VOLCANI, R. Seasonal fluctuations in the sexual activity of Awassi, German Mutton Merino, Corriedale, Border-Leicester and Dorset horn rams. II Seasonal changes in semen characteristics. *Journal Agricultural Science*, v.64, p.121-125, 1965.
- AMIRAT, L.; ANTON, M.; TAINTURIER, 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.
- AMIRAT, L.; TAINTURIER, 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.
- ANEL, L.; ALVAREZ, M.; MARTINEZ-PASTOR, F. *et al.* Improvement strategies in ovine artificial insemination. *Reproduction in Domestic Animals*, v.41, supl.2, p.30-42, 2006.
- BABIAK, I.; GLOGOWSKI, J.; LUCZYNSKI, M. J. *et al.* The effect of egg yolk, low density lipoproteins, methylxanthines, and fertilization diluent on cryopreservation efficiency of Northern Pike (*Esox lucius*) spermatozoa. *Theriogenology*, v. 52, p.473-479, 1999.
- BARBAS, J. P.; BAPTISTA, M. C.; CANNAS-SERRA, C. *et al.* First results in Portugal of artificial

- I insemination by cervical route using ram frozen semen on reproductive performance. In: 15th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, v. 2, 2004, Porto Seguro BA. *Anais...* Bahia: 15th International Congress on Animal Reproduction, 2004, p.378.
- BARTH, A.D.; OKO, R. J. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. 1. ed. Iowa: Iowa State University Press, 1989. 285p.
- BAVISTER, B. D.; LEIBFRIED, M. L.; LIEBERMAN, G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biology of Reproduction*, v. 28, p.235-247, 1983.
- BENCHARIF, D.; AMIRAT, L.; ANTON, M. *et al.* The advantages of LDL (low density lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*, v. 70, p. 1478-1488, 2008.
- BERGERON, A.; CRÊTE, MARIE-HÉLÈNE; 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.
- BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, v.73, p.1338-1344, 2006.
- BERGERON, B.; VILLEMURE, M.; LAZURE, C. *et al.* Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Molecular Reproduction and Development*, v.71, p.461-470, 2005.
- BICUDO, S.D.; SOUSA, D.B.; TAKADA, L. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado e biotécnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 15, 2003. Porto Seguro – BA. *Anais...* Belo Horizonte - MG: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2003.
- BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J. P.; MARQUANT-LE, B. *et al.* Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potencial of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*, v. 50, p. 699-706, 1998.
- BOYER, R. F. *Modern Experimental Biochemistry*. Califórnia: Addison-Wesley, 1986. 584p.
- BYRNE, G. P.; LONERGAN, P.; WADE, M. *et al.* Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p. 265-275, 2000.
- CAMARA, D. R.; SALLES, H. O.; ALMEIDA, V. M. *et al.* Inseminação artificial por via transcervical com sêmen congelado em ovinos deslanados sem raça definida (SRD). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 5, p. 75-77, 2002.
- CELEGHINI, E. C. C. *Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes*. 2005, 186f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; *et al.* Rapid technique for simultaneous evaluation of the plasma, acrossomal and mitochondrial membranes of ram spermatozoa. *Animal Reproduction*, v.3, p.243, 2006.

- CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C. *et al.* Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Animal Reproduction Science*, v. 104, p. 119–131, 2008.
- CENTOLA, G. M. Comparison of manual microscopic and computer-assisted methods for analysis of sperm count and motility. *Archives of Andrology*, v. 36, p.1-7, 1996.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA), *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*, p. 31-34, 1998.
- COOK, W. H.; MARTIN, W. G. Egg lipoproteins. In: Tria E, Sanu AM, editors. Structural and functional aspects of lipoproteins in living systems. New York, Academic Press, 1969. p.579- 615.
- CROSS, N. L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrossomal status of mammalian sperm. *Biology of Reproduction*, v. 41, p. 635-641, 1989.
- CRUZ JÚNIOR, C. A. *Caracterização anatômica e histológica da cerviz de ovelhas da raça Santa Inês*.2006. 45f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- D'ALESSANDRO, A. G.; MARTEMUCCI, L. A. G; COLORMA, M. A. *et al.* Post-thaw survival of ram spermatozoa and fertility after insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender composition. *Theriogenology*, v. 55, p. 1159-1170, 2001.
- DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I. G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, v.14, p.466-470, 1977.
- DIESEL, W. R. Perspectivas econômicas da ovinocultura. In: II Simpósio de Ovinos e Caprinos da EV-UFGM, 2007, Belo Horizonte. *Anais...Belo Horizonte*: [s.n.], 2007. p.1-28.
- DOMÍNGUEZ, M. P.; FALCINELLI, A.; HOZBOR, F. *et al.* Seasonal variations of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology*, v. 69, p. 564-573, 2008.
- FISER, P. S.; FAIRFULL, R. W. Combined effects of glycerol concentration, cooling velocity, and osmolality of skim milk diluents on cryopreservation of ram spermatozoa. *Theriogenology*, v. 25, p. 473-484, 1986.
- FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica and Biophysica Acta*, v. 1469, p. 197-235, 2000.
- FOULKES, J. A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.49, p.277-284, 1977.
- FUKUI, Y.; KOHNO, H.; TOGARI, T. *et al.* Fertility of ewes inseminated intrauterinally with frozen semen using extender containing bovine serum albumin. *Journal of Reproduction and Development*, v.53, p.959-962, 2007.
- FUKUI, Y.; TOGAWA, M.; ABE, N. *et al.* Validation of the sperm quality analyzer and the hiposmotic swelling test for frozen-thawed ram and minke whale (*Balaenoptera bonarensis*) spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development*, v. 50, p. 147-154, 2004.
- GIL, J.; LUNDEHEIM, N.; SODERQUIST, L. *et al.* Influence of extender, temperature,

- and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*, v.59, p.1241-1255, 2003.
- GIL, J.; RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M.; LUNDEHEIM, N. *et al.* Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for artificial insemination. *Theriogenology*, v.59, p.1157-1170, 2003.
- GIL, J.; RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M.; SODERQUIST, L. *et al.* Influence of centrifugation or low extension rates prefreezing on the fertility of ram semen after cervical insemination. *Theriogenology*, v.57, p.1781-1792, 2002.
- GLOVER, T. E.; WATSON, P. F. The effects of egg yolk, the low density lipoprotein fraction of egg yolk, and three monosaccharides on the survival of cat (*Felis catus*) spermatozoa stored at 5°C. *Animal Reproduction Science*, v.13, p. 229-237, 1987.
- GONZÁLES, C. I. M.; OBA, E.; BICUDO, S. D. Avaliação do sêmen ovino (*ovis aries*) congelado em palhetas e “pellets” com diferentes meios diluidores. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 23, p. 280-281, 1999.
- GRAAF, S. P.; EVANS, G.; GILLAN, L. *et al.* The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the *in vitro* quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. *Theriogenology*, v.67, p.217-227, 2007.
- GRAAF, S. P.; LEAHY, T.; MARTI, J. *et al.* Application of seminal plasma in sex-sorting and sperm cryopreservation. *Theriogenology*, v.70, p.1360-1363, 2008.
- GRAHAM, J. K.; FOOTE, R. H. Effect of several lipids fatty acyl chain length and degree of insaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*, v.24, p.42-52, 1987.
- HALBERT, G. W.; DOBSON, H.; WALTON, J. S. *et al.* The structure of the cervical canal of the ewe. *Theriogenology*, v.33, p.977-992, 1990.
- HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 88, p. 343-352, 1990.
- HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, v. 53, p. 47-58, 2000.
- JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SÖDERQUIST, L. *et al.* Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology*, v.52, p.641-58, 1999.
- 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. *J. Reprod. Fertil.*, v. 47, n. 1, p. 219-228, 1984.
- JIANG, Z.; LI, Q.; LI, W. *et al.* Effect of low density lipoproteins on DNA integrity of freezing-thawing boar sperm by neutral comet assay. *Animal Reproduction Science*, v. 99, p.401-407, 2007.
- JONES, R. T.; MARTIN, I. C. A. The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5°C on the ultrastructure of ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.35, p.311-320, 1973.
- JULIANI, G.; HENRY, M.; MELO, M. I. V. Freezing of equine semen in extenders with low density lipoproteins. In: 15th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, v. 2, 2004, Porto Seguro BA. *Anais...* Bahia: 15th

International Congress on Animal Reproduction, 2004, p.498.

KAMPSCHMIDT, R. F., MAYER, D. T., HERMAN, H. A. Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. *Journal of Dairy Science*, v. 36, p. 733-742, 1953.

KERSHAW, C. M.; KHALID, M.; MCGOWAN, M. R. *et al.* The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*, v.64, p.1225–1235, 2005.

KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*, v. 39, n. 6, p. 1279-1289, 1993.

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

MALMGREN, L. Assessing the quality of raw semen a review. *Theriogenology*, v.48, p. 523-530, 1997.

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.

MANN, T. *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract.* 1. ed. Londres, Methuen and CO Ltd., 1964. 493p.

MARCO-JIMÉNEZ, F.; PUCHADES, S.; MOCÉ, E. *et al.* Use of powdered egg yolk vs fresh egg yolk for the cryopreservation of ovine semen. *Reproduction in Domestic Animals*, v.39, p. 438-441, 2004.

MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G.; MORTIMER, S. T. *et al.* Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen–thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 11, p. 123–126, 1999.

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

MEDINA, V. H.; AISEN, E. G.; VENTURINO, A. *et al.* Post-thawed characteristics and fertility of semen of rams with good or poor freezing ability. In: 15th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, v. 2, 2004, Porto Seguro BA. *Anais...* Bahia: 15th International Congress on Animal Reproduction, 2004, p.479.

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

MOLINIA, F.; EVANS, G.; MAXWELL, M. Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet freezing ram spermatozoa. *Theriogenology*, v.42, p.849-858, 1994.

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

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

MORTIMER, S. T.; MAXWELL, W. M. C. Effect of medium on kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction*, v.127, p.285-291, 2004.

- MORTIMER, D.; PANDYA, I. J.; SAWERS, R. S. Relationship between human sperm motility characteristics and sperm penetration into human cervical mucus *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 78, p. 93–102, 1986.
- 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.
- NEVES, M. M. *Extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de Gallus domesticus e sua aplicação na criopreservação do sêmen canino*. 2008. 117 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- NORDSTOGA, A. B.; SODERQUIST, L.; ÅDNØY, T. *et al.* Effect of different packages and freezing/thawing protocols on fertility of ram semen. *Reproduction in Domestic Animals*. 2008. Disponível em: <Reprod Dom Anim doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01284.x>, acessado em dezembro/2008.
- O'MEARA, C. M.; HANRAHAN, J. P.; PRATHALINGAM, N. S. *et al.* Relationship between *in vitro* sperm functional tests and *in vivo* fertility of rams after cervical insemination of ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, v.69, p.513-522, 2008.
- PACE, M. M.; GRAHAM, E. F. Components of egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *Journal of Animal Science*, v.39, p.1144-1149, 1974.
- PAULENZ, H.; ÅDNØY, T.; SÖDERQUIST, L. Comparison of fertility results after vaginal insemination using different thawing procedures and packages for frozen ram semen *Acta Veterinaria Scandinavica* 2007. Disponível em: <http://www.actavetscand.com/content/49/1/26>, acessado em: março/2008.
- PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v. 38, p. 209-222, 1992.
- PEREZ, L. J; VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M. A. *et al.* Comparative Study of Four Techniques for Evaluation of Sperm Quality in Ovine and Bovine Frozen-thawed Samples *Reproduction in Domestic Animals*, v. 32, p. 157-160, 1997.
- PHILLIPS, P. H. Preservation of bull semen. *Journal of Biological Chemistry*, v. 130, p.415, 1939.
- PHILLIPS, P. H.; LARDY, H. A. A yolk-buffer pabulum for preservation of bull sperm. *Journal of Dairy Science*, v.2, p.399–404, 1940.
- POLGE, C. Functional survival of fowl spermatozoa after freezing at -79°C. *Nature*, v. 9, p. 949-950, 1951.
- POLGE, C.; ROWSON, L. E. A. Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at -79°C. *Nature*, v. 12, p. 626-627, 1952.
- POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, v.164, p.666, 1949.
- PURDY, P. H. The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48h at 5°C prior to cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, v.93, p.114-123, 2006.
- QUINN, P. J.; WHITE, I. G.; CLELAND, K. W. Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 18, p. 209-220, 1969.

- QUINTERO-MORENO, A.; MIRÓ, J.; TERESA RIGAU, A. *et al.* Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*, v. 59, p. 1973-1990, 2003.
- RIJSSELAERE, T.; SOOM, A. V.; MAES, D. *et al.* Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology*, v. 60, p. 1553-1568, 2003.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reproduction in Domestic Animals*, v.38, p.312-318, 2003.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Review. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, v. 37, p. 185-249, 1995.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, p. 77-111, 2000.
- SALAMON, S.; VISSER, D. Effect of composition of tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. *Australian Journal of Biological Science*, v. 25, p. 605- 618, 1972.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
- SANCHEZ-PARTIDA, L. G.; WINDSOR, D. P.; EPPLESTON, J. *et al.* Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. *Journal of Andrology*, v.20, p.280-288, 1999.
- SANTOS, A. D. F.; TORRES, C. A. A.; FONSECA, J. F. *et al.* Uso do teste hiposmótico (HOST) para avaliar a congelabilidade do sêmen de caprinos das raças Alpina e Saanen, jovens e adultos, submetidos ao manejo com luz artificial. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 25, n.3, p. 438-439, 2001.
- SCAROFF, J.; MIXNER, J. P. The relationship of egg yolk and glycerol content of diluents and glycerol equilibration time and thawing rate upon freezability of bull spermatozoa in plastic straws. *Journal of Dairy Science*, v.38, p.292-297, 1955.
- SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, v. 65, p. 958-978, 2006.
- SILVA, J. C. B.; OLIVEIRA, R.; SCHNEIDER, C. *et al.* Inseminação artificial intra-uterina em ovinos por tração cervical. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, Supl. 1, p.307, 2005.
- SILVA, M. C.; SNOECK, P. P. N.; SILVAS, S. C. B. *et al.* Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre a viabilidade dos espermatozoides ovinos resfriados. In: 35º CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2008, Gramado. *Anais...* Gramado: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 2008. CD-ROM.
- SODERQUIST, L.; MADRID-BURY, N.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. *Theriogenology*, v. 48, p.1115-1125, 1997.
- SUKARDI, S.; CURRY, M. R.; WATSON, P. F. Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers.

Animal Reproduction Science, v. 46, p.89-96, 1997.

TARDIF, A. L.; FARRELL, P. B.; TROUERN-TREND, V. *et al.* Computer assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. *Journal of Dairy Science*, v. 80, p. 1606-1612, 1997.

THIMONIER, J. Control of seasonal reproduction in sheep and goats by light and hormones. *Journal of Reproduction and Fertility*, suppl. 30, p. 30-45, 1981.

TSUITSUI, T. Functional properties of heat-treated egg yolk low density lipoprotein. *Journal of Food Science*, v.53, p. 1103-1106, 1988.

VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M. A.; PEREZ, L. *et al.* Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. *Theriogenology*, v. 41, p. 483-489, 1994.

VARELA JÚNIOR, A. S.; CORCINI, C. D.; ULGUIM, R. R. *et al.* Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. *Animal Reproduction Science*, 2008. Disponível em: <doi:10.1016/j.anireprosci.2008.11.002>, acessado em: dezembro/2008.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of

spermatozoa and the assesment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 7, p. 871-891, 1995.

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

WATSON, P. F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg yolk lipoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 62, p. 483-492, 1981.

WATSON, P. F.; MARTIN, C. A. The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5°C. *Australian Journal of Biological Sciences* 28, 145-152, 1975

YÁNIZ, J. L.; SANTOLARIA, P.; MARCO-AGUADO, M. A. *et al.* Use of image analysis to assess the plasma membrane integrity of ram spermatozoa in different diluents. *Theriogenology*, 2008. Article in press. Disponível em: <doi:10.1016/j.theriogenology.2008.03.002 > Acessado em novembro/2008.

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

8. ANEXOS

Anexo 1 – Solução utilizada para realização do teste hiposmótico.

Solução hiposmótica (100 mOsm/L)	
Citrato de sódio biidratado	7,35g
Frutose	13,51g
Água destilada	1L

Fonte: Jeyendran *et al.*, 1984.

Anexo 2 – Composição do meio diluidor base Tris-glicose.

Diluyente controle: Tris-glicose-gema	
Tris (N-Tris[hidroximetil]aminometano)	3,876g
Ácido cítrico monoidratado	2,123g
Glicose	0,533g
Glicerol	5,3mL
Penicilina	100.000UI
Estreptomicina	100mg
Água destilada q.s.p.	100mL
Gema de ovo	16mL

Fonte: Salamon e Visser, 1972.

Anexo 3 - Protocolo de extração das lipoproteínas de baixa densidade.

- 1 – Utilizar ovos frescos de galinha;
- 2 – Após quebrar os ovos, separar a gema do albúmem e rolá-la sobre papel-filtro para eliminar a chalaza e qualquer traço de albúmem aderido à membrana vitelínica;
- 3 – Perfurar cuidadosamente a membrana vitelínica, com o auxílio de uma seringa de 10 mL, e acondicionar o conteúdo num bécquer resfriado com gelo;
- 4 – Diluir a gema com solução salina isotônica (0,17M NaCl), na proporção de 1:1, e manter em agitação a 4°C por 1h;
- 5 – Centrifugar em 11.400g por 45 minutos a 4°C;
- 6 – Coletar o sobrenadante (plasma) e corrigir o pH para 8,7 (utilizando NaOH 0,1N);
- 7 – Colocar o sobrenadante em um bécquer resfriado e adicionar solução de sulfato de amônio até obter 50% de saturação, mantendo sobre refrigeração e agitação constantes;
- 8 – Manter em agitação a 4°C por mais 1h e após centrifugar a mistura a 11.400g por 45 min.;
- 9 – Envasar o sobrenadante com membrana de diálise (29mm de diâmetro, MNCO: 12-14 000, Spectra/Por, – Molecular Porous) e manter dialisando em água bidestilada por no mínimo 36h, em constante agitação e a 4°C, até total retirada do sulfato de amônio (renovar a água a cada 3h);
- 10 – Centrifugar a solução a 10.000g, por 45min. a 4°C;
- 11 – Coletar o sobrenadante (resíduo rico em LBD) com o auxílio de uma espátula, e utilizar imediatamente.

Fonte: Moussa *et al.* (2002), modificado por Neves, 2008.

Anexo 4 - Método de liofilização.

- 1 – Colocar a LBD extraída em um tubo plástico de centrífuga até ocupar 1/3 do volume total do frasco e fechar com tampa possuindo pequena perfuração central;
- 2 – Resfriar o tubo em nitrogênio líquido, em ângulo de 45° em relação à lâmina de nitrogênio, até congelar o conteúdo;
- 3 – Colocar o tubo congelado no liofilizador, previamente ligado e resfriado a -40°C, e manter até total secagem das proteínas;
- 4 – Após a liofilização, armazenar o material a -20°C em tubo de centrífuga com tampa sem perfuração.

Fonte: Neves, 2008.

Anexo 5 - Setup Hamilton Torne Biosciences, Ivos Ultimate

Analysis Setup

Frame rate	60 Hz
Frame Acquired	30
Minimum Contrast	60
Minimum Cell Size	5 pixels
Straightness (STR)	80%
Path Velocity (VAP)	75 $\mu\text{m/s}$
VAP Cutoff	21.9 $\mu\text{m/s}$
VSL Cutoff	6.0 $\mu\text{m/s}$
Cell Size	5 pixels
Cell Intensity	55
Static Intensity Gates	0.25 – 1.50
Static Size Gates	0.60 – 8.00
Static Elongation Gates	0.00 – 95.00
Temperature	37.3°C

Technical Guide - Chapter 2: Starting Parameters for Various Species – Ram

Anexo 6 – Soluções utilizadas para realização da técnica de fluorescência..

Soluções estoque e de trabalho utilizadas na técnica de fluorescência		
Solução estoque iodeto de propídio (IP)	IP	25mg
	DMSO	1mL
Solução trabalho de IP	DPBS	980 µL
	Sol. Estoque de IP	20 µL
Sol. de azida de sódio	Azida de sódio	1g
	Água deionizada q.s.p.	10mL
FITC-PSA	FITC-PSA	2mg
	DPBS	18mL
	Sol. de azida de sódio	2mL

Fonte: Adaptado de Celeghini, 2005.

Anexo7 – Soluções para preparo do meio TALP.

Solução de TALP		
Sais de TALP	NaCl	2,1g
	KCl	0,935g
	NaHCO ₃	1,05g
	CaCl 2H ₂ O	0,145g
	NaH ₂ PO ₄	0,025g
	MgCl 6H ₂ O	0,04g
	Hepes	3,25g
	Água destilada q.s.p.	500mL
Metabólitos glicosados	Glicose	2,5g
	Lactato de sódio	9,25mL
	Piruvato de sódio	70mg
	Pen-Strep	12,5mL
Solução estoque	Sais de TALP	45mL
	Metabólitos glicosados	5mL
Solução trabalho	Sais de TALP	10mL
	Solução estoque	200µL
	BSA	100mg

Fonte: Bavister, *et al.*, 1983.