

Valéria Spyridion Moustacas

**VIABILIDADE *IN VITRO* DE ESPERMATOZOIDES OVINOS
CRIOPRESERVADOS EM MEIOS CONTENDO
LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE NAS FORMAS
NATURAL E LIOFILIZADA**

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

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: *Marc Roger Jean Marie Henry*

Co-orientador: *Monique de Albuquerque Lagares*

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
2009

M933v Moustacas, Valéria Spyridion, 1983-

Viabilidade in vitro de espermatozoides ovinos criopreservados em meios contendo lipoproteína de baixa densidade nas formas natural e liofilizada / Valéria Spyridion Moustacas. – 2009.

55 p. : il.

Orientador: Marc Roger Jean Marie Henry

Co-orientador: Monique de Albuquerque Lagares

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

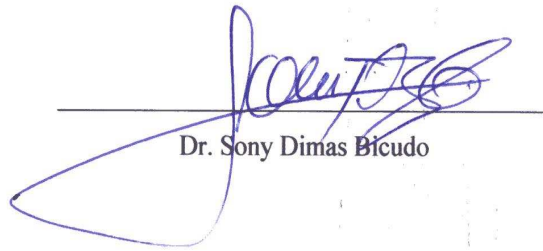
1. Ovino – Reprodução – Teses. 2. Espermatozoides – Teses. 3. Criopreservação – Teses. 4. Lipoproteínas – Teses. 5. Reprodução animal – Teses. I. Henry, Marc Roger Jean Marie. II. Lagares, Monique de Albuquerque. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.308 926

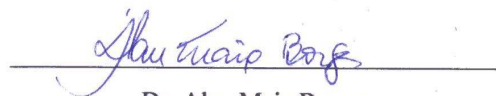
Dissertação defendida e aprovada em 13 de fevereiro de 2009, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Marc Roger Jean Marie Henry
(Orientador)



Dr. Sony Dimas Bícudo



Dr. Alan Maia Borges

"Faça o que for justo. O resto virá por si só."

- Goethe –

**Aos meus pais,
Valéria e Vassilis, que
lutaram bravamente para
que eu chegasse até aqui.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Valéria Maria Moustacas e Vassilis Spyridion Moustacas, pelo apoio incondicional e, acima de tudo, por sempre acreditarem em mim.

À Escola de Veterinária da UFMG, pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao prof. Marc Henry, pela confiança, orientação, paciência, conselhos e transparência, e pelos valiosos ensinamentos. Meu eterno agradecimento.

À prof.^a Monique de Albuquerque Lagares pela co-orientação, amizade, companheirismo e revisão da versão final da dissertação.

À Fundação Ezequiel Dias (FUNED), à Mariana Machado Neves e ao pesquisador Luiz Guilherme Dias Heneine, pela extração, purificação e liofilização das lipoproteínas de baixa densidade.

À Fazenda Calambau e ao proprietário Luis Carlos Dornas Fagundes, por ceder os animais para a realização do experimento piloto.

Aos professores do Setor de Reprodução Animal, Alan Maia Borges, Antônio de Pinho Marques Júnior, José Monteiro da Silva Filho e Vicente Ribeiro do Vale Filho, pelos ensinamentos prestados.

Aos colegas de pós-graduação, Fabiana Varago, Luiza Mendonça, Ana Maria, Jair Ozório, Ester Rossi e Rebeca Mascarenhas, pela ajuda, companhia e pelos bons momentos proporcionados.

Aos alunos e ex-alunos de iniciação científica Carolina Camargo, Caroline Ramos, Daniele Miranda e Pedro Lage pela disponibilidade e cooperação durante os experimentos.

Ao prof. Renato de Lima Santos, por ceder gentilmente os animais para a realização deste trabalho.

À professora Ângela Maria Quintão Lana e ao técnico Danilo pela orientação e execução da análise estatística.

Às amigas Cristina de Oliveira Pedroso e Carmem Lúcia Stockler, que sempre acreditaram em mim e que, mesmo à distância, estiveram sempre presente em minha vida.

Ao prof. Rubens Paes de Arruda, pela oportunidade de realização de parte dos experimentos nas dependências do Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (LBSA) – FMVZ – USP Pirassununga; pelos conselhos e sugestões, por ter me ensinado a importância do senso crítico e, acima de tudo, pelo exemplo de profissional. Minha admiração.

À pós-graduanda Fabiane Gilli Zafallon, pelo exemplo de dedicação e caráter, pela disponibilidade, paciência e pela grande ajuda durante as análises realizadas no LBSA da USP-Pirassunga.

Aos pós-graduandos da FMVZ-USP, Juliana Nascimento, André Furugen César de Andrade e Andrés Mejias pelo acolhimento, amizade e pela contribuição profissional.

Ao Raphael de Castro Mourão, pelo amor e apoio, principalmente durante a fase final de confecção da dissertação, e por tornar todos os nossos momentos inesquecíveis.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Pesquisa, pela concessão da bolsa de estudo.

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

Muito Obrigada !!!

LISTA DE TABELAS

SUMÁRIO

	RESUMO.....	12
	ABSTRACT.....	13
1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	Membranas Celulares.....	15
2.2	Alterações nas membranas celulares decorrentes do resfriamento.....	16
2.3	Crioprotetores.....	17
2.3.1	Glicerol.....	18
2.3.2	Gema de ovo e Lipoproteína de Baixa Densidade (LBD).....	19
2.4	Técnicas de Avaliação Espermática.....	22
2.4.1	Morfologia espermática.....	23
2.4.2	Análise Computadorizada do Sêmen (sistema CASA).....	23
2.4.3	Avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal	24
2.4.4	Teste Hiposmótico.....	25
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1	Local e Período.....	25
3.2	Animais e coleta de sêmen.....	25
3.3	Avaliação espermática pré-criopreservação.....	26
3.4	Processamento do sêmen para o congelamento.....	26
3.5	Resfriamento, congelamento e descongelamento dos espermatozoides.....	27
3.6	Avaliação espermática após o descongelamento.....	27
3.7	Análise estatística.....	28
4	RESULTADOS	28
5	DISCUSSÃO.....	40
6	CONCLUSÕES.....	44
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
8	ANEXOS.....	52

Tabela 1	Características do sêmen fresco dos 10 animais, considerando-se a média de dois ejaculados por animal (n=20).....	29
Tabela 2	Médias e desvios padrão da motilidade e dos parâmetros de cinética espermática, estimadas pelo sistema análise computadorizada, dos espermatozoides congelados/descongelados em meios com diferentes concentrações de lipoproteína de baixa densidade.....	30
Tabela 3	Taxa de redução da motilidade total espermática, em relação ao sêmen pré-congelamento, de ovinos após a criopreservação com meios diluidores contendo diferentes concentrações de lipoproteínas de baixa densidade, nas formas fresca e liofilizada.....	31
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.....	38
Tabela 5	Coefficiente de correlação de Pearson (r) entre variáveis do sêmen após o descongelamento.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismo de atuação da lipoproteína de baixa densidade em sêmen após diluição (adaptado de Manjunath <i>et al.</i> , 2002).....	18
Figura 2	Curva de resfriamento na qual o sêmen foi submetido após a diluição.....	25
Figura 3	Motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) após descongelamento do sêmen de 10 carneiros diluído no meio Tris-glicose.....	32
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.....	32
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.....	33
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.....	33
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.....	34
Figura 8	Motilidade total de espermatozoides ovinos congelados/descongelados em diferentes diluidores e submetidos ao teste de termorresistência, durante 180 minutos.....	35
Figura 9	Percentual de células morfolologicamente normais e com defeitos na região da cabeça, do sêmen fresco e após criopreservação nos diferentes diluidores.....	36
Figura 10	Categorias de integridade de membrana plasmática e acrossomal de espermatozoides ovinos avaliadas por combinação das sondas fluorescentes IP e FITC-PSA.....	37
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.....	39

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Solução utilizada para realização do teste hiposmótico.....	52
Anexo 2	Composição do meio diluidor base Tris-glicose.....	52
Anexo 3	Protocolo de extração das lipoproteínas de baixa densidade.....	53
Anexo 4	Método de liofilização.....	53
Anexo 5	Setup Hamilton Torne Biosciences, Ivos Ultimate.....	54
Anexo 6	Soluções utilizadas para realização da técnica de fluorescência.....	55
Anexo 7	Soluções para preparo do meio TALP.....	55

Viabilidade *in vitro* de espermatozoides ovinos criopreservados em meios contendo lipoproteínas de baixa densidade nas formas natural e liofilizada

RESUMO

Objetivou-se avaliar a eficácia da substituição da gema de ovo por diferentes concentrações de lipoproteínas de baixa densidade (LBD) nas formas fresca e liofilizada, durante o processo de criopreservação do sêmen ovino. Para tal, foram utilizados 10 carneiros, sendo coletados dois ejaculados por animal. Após a coleta foram avaliados a motilidade, o movimento de massa, o vigor, a concentração, a reatividade ao teste hiposmótico e a morfologia espermática. Para o congelamento foram utilizados somente ejaculados que apresentaram motilidade mínima de 70%, vigor 3 (0-5) e máximo de 30% de patologias espermáticas. Cada ejaculado foi fracionado em nove diferentes diluidores, sendo o meio base Tris-16% de gema (controle) e os demais consistiram na substituição da gema de ovo por 8, 12, 16 e 20% de LBD natural e liofilizada. As amostras foram diluídas para a concentração final de 100×10^6 espermatozoides/mL e envasadas em palhetas de 0,25mL. Após o congelamento/descongelamento foram avaliadas a motilidade total, progressiva e os parâmetros de cinética espermática com auxílio do sistema computadorizado (CASA), além do teste hiposmótico. Foram avaliadas a integridade de membranas plasmática e acrossomal, bem como a morfologia e a longevidade espermática. O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso, sendo cada bloco representado por um animal. A análise estatística foi realizada com auxílio do programa estatístico SAS (Statistical Analyses System), sendo as médias comparadas pelo teste múltiplo de Duncan. Para todas as características avaliadas, o uso das diferentes concentrações de lipoproteínas de baixa densidade fresca promoveu resultados similares ($P > 0,05$) aos encontrados com o meio contendo gema de ovo. Os meios contendo lipoproteínas liofilizadas promoveram respostas significativamente inferiores ($P < 0,05$) aos demais tratamentos em todos os parâmetros avaliados. Os resultados permitem concluir que as lipoproteínas de baixa densidade frescas são capazes de proteger as células espermáticas durante a criopreservação da mesma forma que a gema de ovo. No entanto, os processos de liofilização e ressuspensão não foram capazes de preservar as características funcionais das lipoproteínas, visto que os valores dos parâmetros espermáticos avaliados foram inferiores aos demais tratamentos que continham gema de ovo ou lipoproteína fresca.

Palavras-chave: Criopreservação, LDL, sêmen ovino.

In vitro viability of ovine spermatozoa cryopreserved in extenders containing natural and lyophilized low density lipoproteins

ABSTRACT

The aim of the present work was to evaluate the efficiency of the addition of fresh and lyophilized low density lipoproteins (LDL) to ram semen extender instead of egg yolk during cryopreservation. Two ejaculates from 10 rams were collected and sperm motility, mass motility, vigor, number, reactivity to the hypoosmotic swelling test and morphology were evaluated. Ejaculates presenting sperm motility equal or higher than 70%, vigor equal or higher than 3 and sperm pathologies lower than 30% were frozen. The ejaculates were divided in 9 aliquots according to the treatments. Treatment 1 (T1) 16% egg yolk -Tris (control), T2: 8% fresh LDL- Tris, T3: 12% fresh LDL- Tris, T4: 16% fresh LDL- Tris, T5: 20% fresh LDL- Tris, T6: 8% lyophilized LDL -Tris, T7: 12% lyophilized LDL- Tris, T8: 16% lyophilized LDL-Tris, T9: 20% lyophilized LDL -Tris. The samples were diluted to 100×10^6 spermatozoa/ mL and packaged into 0,25mL straw. After three hours cooling, the samples were frozen in liquid nitrogen. Total and progressive motility and sperm kinetic parameters were evaluated using computadorized analyses system (CASA). The percentage of spermatozoa with functional membrane was assessed using the hypoosmotic swelling test, sperm membrane integrity with Propidium Iodide dye, acrosome integrity with FITC-PSA and spermatozoa longevity with microscopy. The experiment was designed in randomized blocks, each animal being a block. Data were analyzed using the SAS program (Statistical Analyses System). The mean values from the evaluated semen characteristics were compared with the Duncan's multiple range test. There was no difference in the semen characteristics evaluated when different concentrations of fresh low density lipoproteins or egg yolk were added to the extenders ($P > 0.05$). Although, the low density lipoproteins lyophilization and resuspension process were unable to preserve functional characteristics of lipoproteins, since the sperm parameters evaluated showed lower values compared to the other treatments.

Key-words: Cryopreservation, LDL, ram semen.