UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária

Dissertação

Uso de diferentes crioprotetores em diluentes para sêmen ovino congelado

RAFAEL ADOLFO TONIETO

Pelotas, 2008

RAFAEL ADOLFO TONIETO

Uso de diferentes crioprotetores em diluentes para sêmen ovino congelado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Área do conhecimento: Reprodução Animal).

Orientador: Thomaz Lucia Junior

Pelotas, 2008

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Jose Carlos Ferrugem Moraes
Pesquisador EMBRAPA - Pecuária Sul

Dr. João Carlos Deschamps
Profº Titular, UFPEL

Dr. Ivan Bianchi
Profº Adjunto, UFPEL

Dr. Thomaz Lucia Junior
Profº Adjunto, UFPEL (Orientador)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

À minha mãe Lorena e ao meu pai Reinaldo, pela confiança, carinho, ensinamentos e oportunidades que me deram.

À minha namorada Camila, pelo incentivo, amor, carinho e tempo dedicado à finalização deste trabalho. Te Amo.

Às minhas irmãs Lenara e Carina e ao meu cunhado Jeferson, pelo carinho, convivência e superações que enfrentamos juntos.

Ao meu sobrinho Gabriel (*in memorian*), pelo amor e a capacidade de despertar sentimentos. Sempre sentirei tua presença...

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) e ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária, pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Prof° Thomaz Lucia Junior, pelo profissionalismo, pela oportunidade de ensinamentos e pela confiança depositada em mim para a realização deste trabalho.

Ao Profº João Carlos Deschamps pelas opiniões, sugestões e conversas que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos membros desta banca de Defesa de Dissertação, pela disponibilidade e colaboração para o trabalho.

À família Loeck, pelo carinho, convívio e apoio em todos os momentos.

À amiga e colega de Pós-graduação Karina Lemos Goularte, pela amizade e tempo dedicados à execução deste trabalho.

À Raquel e ao Gustavo, pela amizade, troca de conhecimentos e dedicação exclusiva para a realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas de Pós-graduação Marcelo Mendonça, Marcelo Vieira, Guilherme Van Der Lan, Eduardo Xavier, Gissele Rambo, Elisa Santos, Priscila Leon, pelo convívio, que proporcionou momentos de aprendizado e, principalmente, pela amizade.

Aos colegas do Laboratório de Biotécnicas da Reprodução Animal Tiago e Vinicius, pela elaboração do projeto inicial.

À todos os colegas e amigos do Laboratório de Biotécnicas da Reprodução animal que contribuíram para a realização deste trabalho.

À todos os professores e funcionários da Faculdade de Veterinária e do Centro de Biotecnologia.

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

Meu muito obrigado.

RESUMO

TONIETO, Rafael Adolfo. **Uso de diferentes crioprotetores em diluentes para sêmen ovino congelado.** 2008. 53f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas.

Em ovinos, as baixas taxas de prenhez obtidas com inseminação artificial com sêmen congelado inviabilizam o seu uso como rotina. Provocando o processo de criopreservação lesões nos espermatozóides, o desenvolvimento de diluentes que incluam crioprotetores de excelência se justifica. Este trabalho testou a inclusão da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e da trealose em diluentes para congelamento de sêmen ovino, a partir da avaliação de parâmetros de qualidade seminal pós-descongelamento. No primeiro experimento, foram comparados 3 tratamentos: Tris com 20% de gema de ovo e 5% de glicerol (T1); Tris com 100 mM de trealose (T2); e T1 com 50 mM de trealose (T3). A motilidade não diferiu entre os tratamentos ($P > 0,05$), mas o T2 apresentou maior proporção de gametas com membranas íntegras ($P < 0,05$). No segundo experimento, foram comparados 4 tratamentos: Tris com 20% de gema de ovo (T1); T1 com 5% de glicerol (T2); T1 com 100 mM de trealose (T3); e T1 com 100 mM de trealose e 5% de glicerol (T4). A motilidade e a integridade da membrana espermática do T2, T3 e T4 foram superiores a do T1 ($P > 0,05$), mas a integridade do acrossoma não diferiu ($P > 0,05$) em todos os tratamentos. No terceiro experimento, foram comparados 4 tratamentos: Tris com 20% de gema de ovo e 110 mM de trealose (T1); Tris com 8% de LDL, incluindo 5% de glicerol (T2); Tris com 8% de LDL, incluindo 110 mM de trealose (T3); Tris com 8% de LDL, incluindo 110 mM de trealose e 5% de glicerol (T4). A motilidade dos espermatozóides para o T2 e para o T3 foram superiores aos demais tratamentos ($P < 0,05$), mas, com relação à integridade de membrana, não houve diferença entre os tratamentos com LDL ($P > 0,05$). A integridade do acrossoma não diferiu entre os tratamentos ($P > 0,05$). Portanto, o uso de LDL e trealose como crioprotetores foi associado com melhorias na motilidade e na integridade da membrana espermática, no sêmen ovino, após o descongelamento.

Palavras-chave: Trealose, LDL, sêmen congelado, ovinos.

ABSTRACT

TONIETO, Adolfo Rafael. **Use of distinct cryoprotectant solutions in extenders for frozen ram semen**. 2008. 53p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The low pregnancy rates obtained with artificial insemination using frozen ram semen make its routine use unfeasible. As the cryopreservation process causes injuries in the sperm cells, the development of extenders that include state-of-the art cryoprotectant solutions is justified. This study tested the inclusion of low density lipoprotein (LDL) and trehalose in extenders for freezing ram semen, by evaluating parameters of post-thawing semen quality. In the first experiment, 3 treatments were compared: Tris including 20% egg yolk and 5% glycerol (T1); Tris including 10 mM trehalose (T2); and T1 including 50 mM trehalose (T3). Sperm motility did not differ across treatments ($P > 0.05$), but T2 presented higher proportion of sperm cells having membrane integrity ($P < 0.05$). In the second experiment, 4 treatments were compared: Tris including 20% egg yolk (T1); T1 including 5% glycerol (T2); T1 including 100 mM trehalose (T3); and t1 including 100 mM trehalose and 5% glycerol (T4). Sperm motility and membrane integrity were higher for T2, T3 and T4 than for T1 ($P < 0.05$), but acrossome integrity did not differ among treatments ($P > 0.05$). In the third experiment, four treatments were compared: Tris including 20% egg yolk and 100 mM trehalose; and T1 with the replacement of egg yolk by LDL including 5% glycerol (T2); 100 mM trehalose (T3); and 100 mM trehalose and 5% glycerol (T4). Sperm motility and membrane integrity were higher for T2 and T3 than for the other treatments ($P < 0.05$), but there was no further difference among the LDL treatments ($P > 0.05$). Acrossome integrity did not differ across treatments ($P > 0.05$). Therefore, the inclusion of LDL and trehalose as cryoprotectants in extenders for frozen ram semen was associated with improvement in post-thawing sperm motility and membrane integrity.

Key-words: Trehalose, LDL, frozen semen, ram.

SUMÁRIO

Banca Examinadora 3
Dedicatória 4
Agradecimentos 5
Resumo.....6
Abstract.....7
Sumário.....8
Lista de tabelas.....9
Revisão: Criopreservação de sêmen ovino.....10
1. Introdução.....11
2. Indicadores da redução da função espermática após a criopreservação.....11
3. Alteração da motilidade e atividade respiratória.....14
4. ROS e lipídio peroxidação.....16
5. Alteração da membrana espermática após a criopreservação.....17
6. Crioprotetores para a membrana espermática.....21
7. Referências.....24
Artigo: Uso de diferentes crioprotetores em diluentes para o congelamento de sêmen ovino.....31
Resumo.....32
1. Introdução.....33
2. Materiais e Métodos.....37
3. Resultados.....41
4. Discussão.....44
5. Conclusão.....48
6. Referências.....49

Lista de Tabelas

Tabela 1 O efeito da concentração de trealose sobre a motilidade e a integridade de membrana espermática após o descongelamento de sêmen ovino

Tabela 2 Efeito da trealose e do glicerol sobre a motilidade, a integridade de membrana espermática e a integridade acrossomal após o descongelamento de sêmen ovino

Tabela 3 Efeito da LDL, trealose e glicerol sobre a motilidade, a integridade da membrana espermática e da membrana do acrossoma após o descongelamento de sêmen ovino

Criopreservação de sêmen ovino

(Revisão)

1. Introdução

A criopreservação de sêmen da maioria das espécies domésticas consiste em um processo complexo, o qual envolve o balanço de vários fatores para que se obtenham resultados satisfatórios (Purdy, 2006).

Não somente os diluentes, taxas de diluição, curvas de resfriamento, congelamento e descongelamento são importantes para melhorar os índices de fertilidade do sêmen congelado. Além disso, outros fatores, tais como ambiente, interações entre as substâncias crioprotetoras e plasma seminal e a anatomia da fêmea, são fundamentais.

As alterações atribuídas ao processo de criopreservação, em grande parte, afetam a estrutura da membrana plasmática, alterando principalmente a disposição da bicamada lipídica da membrana do espermatozóide (Watson, 1995).

A quebra na omeostase da estrutura da membrana plasmática implica na maior susceptibilidade do espermatozóide às mudanças ultra-estruturais, bioquímicas e funcionais durante a criopreservação. Desta maneira, a célula espermática perde eficiência na interação com o meio, limitando-se a realizar trocas vitais para a manutenção de sua viabilidade (Leboeuf *et al*.,2000).

A baixa eficiência do congelamento do sêmen ovino pode ser atribuída ao choque térmico, ao estresse osmótico e ao efeito citotóxico decorrente da adição e remoção de substâncias crioprotetoras, além da desidratação celular e formação de cristais de gelo (Watson, 2000). A ação de todos estes fatores leva à diminuição na integridade da membrana plasmática e na viabilidade espermática após o descongelamento.

2. Indicadores de redução da função espermática após a criopreservação

Na maioria das espécies domésticas nas quais se aplicam programas de inseminação artificial, o processo de criopreservação do sêmen resulta em diminuição da fertilidade quando comparada ao sêmen a fresco.

Estes prejuízos surgem da combinação de aspectos como perda da viabilidade espermática e danos na capacidade funcional dos espermatozóides sobreviventes (Watson, 2000).

Salamon & Maxwell (1993) relatam que a fertilidade do sêmen ovino resfriado diminui de 10 a 35% para cada dia de preservação em resfriamento.

Quando as ovelhas são inseminadas via cervical com sêmen a fresco, apresentam taxa de prenhez entre 68 e 75%, todavia, quando inseminadas, da mesma forma, com sêmen resfriado, conservado por 24, 48 e 72 horas, apresentam fertilidade de apenas 45-50%, 25-35% e 15-20%, respectivamente.

Durante a criopreservação do sêmen, 60-80% dos espermatozóides podem sofrer danos significativos. Assim, ainda que 40-60% dos espermatozóides apresentem motilidade após o descongelamento, somente 20-30% destes permanecem biologicamente intactos.

Os danos sofridos durante o processo de congelamento podem ser ultra-estruturais, físicos, bioquímicos ou funcionais. Dessa forma, os espermatozóides que se mantêm móveis podem estar danificados de modo a reduzir sua probabilidade de penetrar e fertilizar oócitos (Salamon & Maxwell, 2000).

Durante os diferentes estágios do processo de criopreservação do sêmen, podem ocorrer danos em diversas estruturas celulares, tais como na membrana plasmática, na membrana acrossomal e na mitocôndria.

Um estudo no qual o sistema genital de ovelhas foi corado após a IA cervical, demonstrou que a sobrevivência dos espermatozóides no canal cervical seria de 27h para espermatozóides a fresco, de 22-23h para os resfriados por 24h e de apenas 19-22h para aqueles preservados durante 48h (Lopyrin, 1971).

No entanto, com IA intra-uterina, os espermatozóides mantêm a capacidade fertilizante por até 10 dias após o resfriamento à 5ºC (Maxwell & Watson, 1996).

Na inseminação intra-uterina de ovelhas super-ovuladas, a taxa de concepção e a porcentagem de oócitos fertilizados com sêmen congelado são aproximadamente 20% menores do que quando utilizado sêmen a fresco.

A taxa de fertilidade do sêmen congelado pode atingir índices inaceitáveis de concepção quando utilizada a IA transcervical em ovelhas (Bailey, 2000), o que ocorre em função das crioinjúrias causadas pelo processo de criopreservação, as quais reduzem a sobrevivência dos espermatozóides e prejudicam o seu transporte ao longo do trato reprodutivo da fêmea (Salamon & Maxwell, 1995a; b).

Por outro lado, quando há uma maior sincronia entre o intervalo da ovulação e a realização da IA com sêmen congelado, via cervical, as taxas de fertilização são mais elevadas, atingindo índices de até 52% de prenhes em ovelhas sincronizadas com progestágenos (Donavan *et al.,* 2004).

As baixas taxas de fertilidade da IA cervical com sêmen congelado são atribuídas aos danos que as células sofrem durante a criopreservação, acarretando em prejuízos no transporte e viabilidade e dificultando o alcance do sítio de fertilização, além da redução na capacidade fertilizante dos espermatozóides, que resulta no aumento da mortalidade embrionária (Lightfoot & Salamon, 1975).

Entretanto, após a fertilização *in vitro* de oócitos ovinos maturados, a clivagem seria mais precoce com a utilização do sêmen congelado, quando comparado ao uso de sêmen fresco. Enquanto o uso de sêmen criopreservado é associado com a produção de elevado percentual de zigotos com sinais de degeneração e alta taxa de mortalidade embrionária (em torno de 33%), as taxas observadas com o uso de sêmen fresco seriam bem menores, de 6% (Gillan *et al.,* 2004).

De acordo com vários trabalhos, a IA cervical com sêmen congelado apresenta índices de fertilidade entre 10 e 35% (Salamon & Maxwell, 2000), os quais são inferiores aos obtidos com a IA por laparoscopia com sêmen congelado (50-70%) (Anel *et al.,* 2005).

A IA por via cervical apresenta pontos de estrangulamento, como a complexa estrutura anatômica da cérvix da ovelha, que é composta por pregas cartilaginosas dispostas em diferentes planos e direções, que dificultam ou mesmo impedem a deposição do sêmen no lúmen uterino. Este fator, aliado à inabilidade do espermatozóide criopreservado em atravessar a cérvix (Windsor, 1997), seria a causa da redução na fertilidade com IA cervical, pois somente uma pequena população de espermatozóides viáveis alcança o local de fertilização (Evans & Maxwell, 1990).

O sêmen congelado, no entanto, nem sempre é sinônimo de baixas taxas de fertilidade, já que, dependendo da profundidade da penetração do cateter de IA transcervical, podem ser obtidos índices de fertilidade aceitáveis para a espécie. Na medida em que ocorre a transfixação da cérvix, a deposição do sêmen se aproxima do sítio de fertilização, ocorrendo taxas de prenhez acima de 70%.

Assim, quanto maior for a distância entre a deposição do sêmen e o sítio de fertilização, menor será a taxa de prenhez. Quando o sêmen é depositado no interior do útero ou do oviduto, podem ser obtidas altas taxas de fertilização (85-95%), ainda que com IA com sêmen congelado (Salamon & Maxwell, 2000).

Estudos comprovaram a hipótese de que compostos espermicidas são produzidos pelo trato reprodutivo da fêmea em decorrência da manipulação

obstétrica realizada durante a IA transcervical, o que acarreta alterações celulares, as quais são responsáveis por elevadas taxas de mortalidade embrionária, após a utilização de sêmen congelado (Meghan *et al.,* 2004).

3. Alteração da motilidade e da atividade respiratória

Metodologias direcionadas a preservar a fertilidade do sêmen congelado através da adição de substâncias crioprotetoras aos diluentes têm sido bastante estudadas nos últimos anos.

Colas (1981) escreveu que a dose inseminante necessita de aproximadamente 800 milhões de células com motilidade progressiva após o descongelamento para que índices aceitáveis de fertilidade sejam obtidos na IA cervical.

A motilidade pode ser utilizada como um parâmetro para a avaliação da qualidade do sêmen pós-descongelamento, embora estudos *in vitro,* com enfoque na avaliação da integridade funcional dos espermatozóides, tenham mostrado outras causas que comprometem a fertilidade do sêmen criopreservado, sem necessariamente alterar a motilidade (Silva & Gadella, 2006). Estas alterações atingem a estrutura física, bioquímica e funcional dos espermatozóides, provocando danos à membrana plasmática, acrossoma e mitocôndria das células (Pena *et al.,* 2007).

Durante a curva de resfriamento, as células espermáticas são muito sensíveis à queda na temperatura, em especial na faixa de transição entre os 25 ºC e os 5ºC (Aboagla & Terada, 2003). O choque térmico induz à perda da viabilidade celular, trazendo conseqüências irreversíveis tanto para a membrana celular, como para a atividade respiratória e glicolítica dos espermatozóides.

O choque térmico caracteriza-se pela presença de muitos espermatozóides com movimentos circulares, pela perda prematura da motilidade, pela diminuição da produção de energia, pelo aumento da permeabilidade da membrana e pela perda de moléculas e íons intracelulares (Watson, 2000). A grande sensibilidade dos espermatozóides ao choque térmico está entre os fatores preponderantes que limitam o uso do sêmen ovino congelado em larga escala.

A redução da motilidade durante o processo de descongelamento do sêmen pode estar ligada à diminuição gradual da habilidade do espermatozóide em produzir

ATP, através da respiração mitocondrial, como conseqüência dos danos ao metabolismo energético, culminando com a morte celular (Celeghini *et al.,* 2008).

Dentre as principais alterações que o espermatozóide sofre durante a criopreservação, a arquitetura da mitocôndria é a mais atingida, resultando em perda de partes da sua estrutura, o que culmina na diminuição da atividade respiratória do espermatozóide e, conseqüentemente, na redução de sua motilidade, devido à interrupção na produção de energia (Widsor, 1997).

As alterações da mitocôndria apresentam implicações no transporte espermático, sendo associadas com a morte prematura dos espermatozóides, antes que alcancem o sítio de fertilização no trato reprodutivo da fêmea.

Gillan & Maxwell (1999), utilizando o corante Fluorochrome Rhodamine 123, o qual se acumula na mitocôndria, demonstraram que a capacidade respiratória diminui mais rapidamente nos espermatozóides criopreservados do que nos a fresco, quando ambos foram incubados durante 6h à 37ºC.

Estes mesmos autores relatam que a respiração mitocondrial, quando a IA é intra-uterina, não provoca tantos prejuízos na fertilidade.

A diminuição na motilidade também pode ser provocada pelos efeitos tóxicos das reações oxigênio espécie específica (ROS), oriundas do metabolismo dos espermatozóides. As ROS podem vir a causar declínio no metabolismo da energia, acarretando a redução na motilidade e na viabilidade espermática e a desnaturação do DNA (Baumber *et al.,* 2000).

Eppleston & Maxwwell (1993) relataram que não haveria correlação entre os parâmetros motilidade, velocidade e linearidade de movimento, mensuradas pelo sistema computadorizado CASA (Computer-Assisted Semen Analysis - Hamilton Thorne Research, USA), considerando a fertilidade da IA por laparoscopia em estudos realizados com mais de 5000 ovelhas.

Câmara *et al.,* (2004) classificaram reprodutores de acordo com a motilidade espermática pós-descongelmento em alta (80%), média (70%) e baixa motilidade (53%), concluindo que a taxa de prenhez, quando realizada IA por laparoscopia, não diferiu entre os grupos.

4. ROS e lipídio-peroxidação

Durante a criopreservação, as células espermáticas ficam expostas ao choque térmico e ao oxigênio atmosférico, estando propensas a lipídio-peroxidação (LPO), devido à elevada produção de reações oxigênio espécie específica (ROS), especialmente em função de apresentarem alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados em sua composição.

A composição lipídica da membrana espermática é o principal fator determinante para a LPO, produzindo esta as seguintes alterações: perda da integridade de membrana, prejuízos nas funções celulares e redução da motilidade e capacidade fertilizante do sêmen (Maxwell & Watson, 1996).

Normalmente os danos associados com a ROS são fisiológicos e mantêm a capacidade fertilizante, capacitação e reação acrossômica. Porém, quando em quantidades excessivas, a ROS pode levar à perda da motilidade e da capacidade fertilizante dos espermatozóides (Baumber *et al.,* 2000).

O complexo de anti-oxidantes fisiológicos e bioquímicos, tais como glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GSH-PX), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), apresentam mecanismos funcionais que defendem as células contra a LPO durante o congelamento (Gadella *et al.,* 2004). Todavia, estes mecanismos endógenos anti-oxidantes de proteção celular são insuficientes para fornecer a proteção espermática durante longos períodos de armazenamento, trazendo como conseqüência a redução na motilidade e na viabilidade espermática (Bilodeau *et al.,* 2001).

Os espermatozóides dos mamíferos são altamente sensíveis a lipídio-peroxidação, a qual ocorre pela redução de moléculas de oxigênio em superóxidos, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila (Bucak *et al.,* 2008) e pela destruição da matriz lipídica pela ação das ROS, responsáveis por formar compostos redutores do oxigênio.

O ataque das ROS à membrana prejudica as funções espermáticas de motilidade e fertilidade, devido à perda intracelular de enzimas e alterações no DNA espermático, levando, ainda, ao estresse oxidativo e à formação de aldeídos citotóxicos (Aitken *et al.,* 1993).

O processo de criopreservação provoca alteração na integridade da dupla fita do DNA e diminui a área de superfície da cromatina, alterando a sua densidade, que

é responsável pela resistência física e química do DNA espermático (Silva & Gadella, 2006).

As alterações no DNA estão relacionadas com perdas no desenvolvimento embrionário, embora os espermatozóides que apresentam tais anomalias possam permanecer com funcionalidade ativa, motilidade e capacidade fertilizante (Kasimanickam *et al.,* 2006).

5. Alterações da membrana espermática pela criopreservação

A composição da membrana plasmática espermática segue o modelo clássico, semelhante às demais membranas, sendo formada por duas camadas de fosfolipídios, entremeadas por proteínas integrais e glicoproteinas de superfície de ligação e glicolipídios, organizados em um mosaico fluído (Singer & Nicholson, 1972).

Este estado fluído é uma característica fundamental para o desempenho das funções da célula. Os principais fatores que alteram esta fluidez são as relações entre fosfolipídios e colesterol e também a temperatura a que a membrana é exposta.

A manutenção do estado fluído dos lipídios e proteínas permite a livre movimentação dos componentes celulares, bem como a interação da célula com o meio (Flesch & Gadella, 2000).

As proteínas são as principais responsáveis pela ocorrência dos processos dinâmicos, enquanto os carboidratos têm importante função nas interações celulares (Amann & Graham 1993).

Quando íntegra, a membrana plasmática é responsável pelos mecanismos de manutenção e equilíbrio osmótico celular, atuando como uma barreira entre os meios intra e extracelulares.

Alterações na estrutura da membrana podem levar a quebra da homeostase, culminando na perda das funções ou até mesmo na morte celular (Amann & Pickett, 1987).

Portanto, a manutenção da integridade da membrana plasmática é fundamental para a manutenção da viabilidade do espermatozóide no trato reprodutivo da fêmea e de sua capacidade de atingir o sítio de fertilização. (Flesch & Gadella, 2000).

Quando os espermatozóides são submetidos à criopreservação, a rápida redução da temperatura de 20ºC para 0ºC provoca um choque térmico, sendo que a membrana espermática é a primeira estrutura da célula a sofrer as alterações decorrentes deste processo.

Exames microscópicos demonstraram que a integridade da membrana do espermatozóide de ovinos é inevitavelmente afetada, em diferentes proporções, durante a criopreservação (Watson, 1995; Bailey *et al.,* 2000).

Durante o resfriamento, as células sofrem intensa separação e rearranjo dos componentes da membrana, sendo estes eventos, na maioria das vezes, irreversíveis, não permitindo a reconstituição estrutural e funcional da membrana após o reaquecimento celular.

Em função do choque térmico, ocorrem danos na membrana espermática diretamente vinculados à fase de transição de temperatura dos lipídios, provocando alterações que comprometem a sua integridade.

Estes danos são caracterizados por uma desestabilização da membrana, associada com o aumento da fluidez de sua bi-camada lipídica, ocorrendo desorganização dos fosfolipídios e formação de pontos de fragilidade, permeabilidade excessiva ou ruptura da membrana (Amann & Graham, 1993).

Na fase de transição física, durante a qual a membrana apresenta um estado de gel, as cadeias de ácidos graxos que se encontram aleatoriamente distribuídas, passam a ordenar-se paralelamente, produzindo uma estrutura rígida, deixando estas áreas fracas e susceptíveis à ruptura e, ainda, permitindo fusões entre as membranas e elevada permeabilidade a íons (Holt, 2000).

Em geral, estes danos se refletem em diminuição na motilidade e prejuízos para a atividade metabólica espermática (Ricker *et al.,* 2006). Adicionalmente, a membrana pode perder sua permeabilidade seletiva ao cálcio, permitindo seu influxo, o que pode desencadear o processo de capacitação espermática (Watson, 1995).

Também, pode ocorrer despolimerização prematura dos filamentos de actina, o qual permite a aproximação da membrana espermática ao folheto externo da membrana do acrossoma, contribuindo para a fusão desorganizada da membrana e para a exocitose acrossomal (Watson, 2000).

A composição dos diluentes utilizados na criopreservação do sêmen favorece à ocorrência de modificações na disposição e características dos componentes da

membrana, resultado em desestabilização, o que parece ser um pré-requisito para a ocorrência da capacitação (Pérez *et al.,* 1996).

A criopreservação pode antecipar a maturação das membranas espermáticas, aumentando a proporção de espermatozóides capacitados ou com reação acrossômica, em comparação com o sêmen *in natura* (Maxwell & Watson, 1996), comprometendo, assim, a sobrevivência espermática no trato reprodutivo da fêmea e limitando o seu tempo de vida.

Lipídios externos, tais como aqueles contidos em diluente usados na criopreservação do sêmen, possuem efeitos sobre a membrana espermática, especialmente sobre os lipídios presentes nesta, o que estaria relacionado com a fluidez dos lipídios, conforme já demonstrado nos estudos com sêmen bovino (Zeron *et al.,* 2002).

Em razão disso, atribui-se a função crioprotetora da gema de ovo aos lipídios presentes na sua constituição (fostatidil colina), os quais contém grande quantidade de cadeias acil móveis, que reduzem a sensibilidade da membrana ao resfriamento.

A desestabilização da membrana espermática leva à ocorrência de diversos eventos associados à capacitação dos espermatozóides, tais como: aumento na fluidez da membrana, influxo de cálcio, aumento do pH interno e hiper-polarização (Topfer-Petersen, 2000).

Os espermatozóides sobreviventes ao processo de congelamento permanecem alojados em canais de diluidor não congelado, o que indica que cada célula está sujeita a ser exposta a altas e baixas concentrações de solutos.

Em bovinos, avaliações morfométricas mostraram indícios de que há redução no tamanho da cabeça do espermatozóide criopreservado, alertando para o fato de que possam a ocorrer alterações na arquitetura da membrana (Gravance *et al.,* 1998).

Outro efeito importante do resfriamento seria o agrupamento de proteínas integrais durante a separação da fase lipídica, durante a qual estas proteínas são afetadas conjuntamente com os canais de cálcio. A saída de colesterol e de ácidos graxos da membrana também aumenta a sua permeabilidade ao cálcio (Yanagimachi, 1994).

A alteração da regulação do cálcio tem implicações na capacitação e na fusão entre a membrana plasmática e a porção externa da membrana do acrossoma.

Existem também similaridades entre danos da membrana durante o resfriamento e a reação acrossomal (Agca & Critser, 2002).

O influxo de cálcio da membrana contribui para mudanças relacionadas à capacitação e para os eventos de fusão entre as membranas, o que seria uma versão desorganizada da reação acrossomal (Watson, 2000).

A integridade do acrossoma é fundamental para que ocorra a penetração do espermatozóide no interior da zona pelúcida e a fusão com a membrana do oócito (Flesch & Gadella, 2000).

Durante o descongelamento do sêmen, o reaquecimento poderá formar padrões de associação entre lipídios e proteínas, diferentes daqueles existentes antes do congelamento.

O restabelecimento da estrutura original das camadas da membrana, lipídio-lipídio e lipídio-proteína dependerá da competência da difusão celular em permitir a reorganização dos componentes (Park & Graham, 1992).

Mudanças na estrutura das membranas, ocasionadas pela reorganização dos lipídios, interferem na cinética e na movimentação da água e do crioprotetor através das membranas da célula espermática. Este movimento é importante para que ocorra a desidratação celular, o processo de congelamento e o restabelecimento da estrutura da célula, após o descongelamento.

Tanto a temperatura, como a osmolaridade do meio, durante a criopreservação, induzem a alterações no volume de água intracelular, o que confere considerável estresse à membrana (Noiles *et al.,* 1995).

A sensibilidade da membrana espermática ao resfriamento apresenta diferenças entre as espécies, o que seria atribuído a variações na composição da membrana plasmática de cada uma delas (Bailey *et al.,* 2000).

Outro fator que deve ser considerado é a quantidade de lipídios existente na membrana, que é inversamente proporcional à concentração de colesterol presente na mesma (Drobnis *et al.,* 1993).

Espécies com sêmen considerado mais sensível à criopreservação, como bovinos e ovinos, apresentam baixos níveis de lipídios na membrana espermática, em comparação com espécies menos sensíveis, como coelhos e humanos.

Esta sensibilidade às baixas temperaturas também pode ser atribuída às altas taxas de ácidos graxos insaturados que compõem a membrana. Desta forma, de acordo com este critério, espécies animais como bovinos, ovinos e suínos poderiam

ser classificadas como susceptíveis à criopreservação, já que apresentam uma taxa de ácidos graxos insaturados 2,5 vezes maior do que as espécies menos susceptíveis, como coelhos, cães e humanos (Bailey *et al.,* 1994).

Em comparação com os bovinos, os ovinos sofrem alterações mais severas na membrana espermática, durante a criopreservação.

A perda de lipoproteínas e aminoácidos após o descongelamento é maior nos ovinos, bem como a perda dos fosfolipídios e a redução na atividade da fosfatase alcalina, responsável por diminuir o conteúdo de colesterol ligado às proteínas.

Além disso, o congelamento aumenta a concentração de sódio e diminui a de potássio nos espermatozóides (Holt, 2000).

Em ovinos, a integridade da membrana após o descongelamento é drasticamente reduzida, mas os efeitos na redução da motilidade não ocorrem na mesma proporção. A análise simultânea da integridade da membrana e da motilidade revelaram a existência de uma grande população de espermatozóides com membrana lesada, porém móveis, após o descongelamento.

Porém, esta sub-população de espermatozóides com membrana lesada perde a motilidade rapidamente, quando incubada a 37ºC (Valcárcel *et al.,* 1997).

Valcárcel et al., (1997) referem ainda que a membrana plasmática apresenta maior fragilidade em relação à membrana acrossomal externa. Dessa forma, o ponto crítico para o sucesso do congelamento de sêmen seria a preservação da integridade da membrana plasmática do espermatozóide.

6. Crioprotetores para a membrana espermática

Estudos recentes focados no desenvolvimento de meios diluidores hipertônicos para o congelamento de sêmen ovino, com base na inclusão de trealose, promoveram melhorias na motilidade, viabilidade celular e integridade da membrana após o descongelamento, já que este açúcar apresenta amplas funções que visam à preservação da viabilidade espermática (Aisen *et al.,* 2002; Bucak *et al.,* 2007).

A adição de açucares aos diluidores seria justificada por várias funções, tais como, substrato energético, equilíbrio do gradiente osmótico, antioxidação e função crioprotetora (Yildiz *et al.,* 2000).

A trealose é um dissacarídeo que desempenha um papel protetor sobre as membranas, contra os efeitos deletérios da desidratação celular pela criopreservação, fazendo com que a membrana se torne menos vulnerável às trocas físicas e morfológicas, que ocorrem durante o efluxo da água e o influxo de substâncias permeáveis à membrana.

Este efeito ocorre, provavelmente, porque a trealose altera o padrão de cristalização, forma e tamanho dos canais de solutos, os quais não congelam (Nicollajsen *et al.,* 1994).

A trealose também auxiliaria na fluidificação da membrana durante a criopreservação, por interagir com os lipídios de membrana, promovendo a estabilização da bicamada lipídica, durante a fase de transição da temperatura (Aboagla & Terada, 2003).

Aisen *et al.,* (2005) descrevem que diluentes hipertônicos para sêmen ovino congelado, com inclusão de trealose, proporcionam melhor proteção às células espermáticas, com melhorias na motilidade, integridade de acrossoma e viabilidade espermática após o descongelamento, em comparação com diluentes isotônicos.

Ainda, o uso de sêmen preservado em diluentes com inclusão de trealose foi associado com alta produção de blastocistos, em estudos que avaliaram a fertilização *in vitro* de ovócitos ovinos (Berlinguer *et al.*, 2007).

Dentre os lipídios presentes na gema de ovo, a lipoproteína de baixa densidade (LDL) é a substância a que se atribui o principal papel de proteção aos espermatozóides durante a criopreservação (Moussa *et al.,* 2002; Amirat *et al.,* 2004).

A LDL compete com os peptídeos catiônicos presentes no plasma seminal, os quais são prejudiciais à membrana espermática, além de formar um complexo contra as proteínas do plasma seminal (PPS) (Bergeron & Manjunath, 2006).

As PPS se ligam à membrana espermática após a ejaculação, devido à afinidade com os fosfolipídios colina presentes na membrana, estimulando o efluxo de colesterol e de fosfolipídios da membrana espermática (Manjunath & Thérien, 2002). Este efluxo desencadeia um processo semelhante à capacitação espermática, desestabilizando a membrana (Harrisson, 1996) e aumentando a sua sensibilidade ao choque térmico (Bergeron & Manjuhath, 2006).

Quando o sêmen é diluído, logo após a coleta, em diluente incluindo a gema de ovo, a LDL seqüestra as PPS (proteínas presentes no plasma seminal),

impedindo que estas fiquem disponíveis para atuarem na membrana, reduzindo, assim, a intensidade das alterações na mesma.

Bergeron *et al.* (2004) relatam que a proporção de PPS associadas aos lipídios da membrana espermática é reduzida em aproximadamente 80% após a diluição do sêmen em meio contendo LDL.

Amirat *et al.,* (2005) concluiu que quando é adicionado 8% de LDL extraída da gema de ovo a um diluente comercial, ocorre uma maior eficiência na criopreservação do sêmen de touro incubado a 4ºC, durante 4 horas, apresentando maior porcentagem de células intactas e menor freqüência de células com disfunção acrossomal.

Outros estudos foram conduzidos visando à preservação da integridade dos componentes da membrana espermática durante o congelamento com a utilização da LDL em diferentes espécies: cães (Varela *et al.,* 2004), caprinos (Aboagla & Terada, 2004), eqüinos (Martin *et al.,* 2005), suínos (Jiang *et al.,* 2007), restando nestes identificados o potencial efeito crioprotetor da LDL.

No entanto, até o momento, não se tem conhecimento de que ocorreram estudos nesta linha, utilizando LDL como crioprotetor, para o congelamento de sêmen ovino, espécie esta que apresenta limitações no processo de criopreservação de sêmen, enfatizando, então, a necessidade de estudos que, com enfoque em novas formulações de crioprotetores, que atuem diretamente na membrana espermática, conferido maior resistência e suportabilidade às alterações decorrentes do congelamento.

7. Referências

[1] ABOAGLA, E.M.E. TERADA, T. Effects of the supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa. **Theriogenology**. 62. 809-18. 2004.

[2] ABOAGLA, E.M.E. TERADA, T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. **Biology of Reproduction**. 69. 1245-50. 2003.

[3] AISEN, E. QUINTANA, M. MEDINA, V. MORELLO, H. VENTURINO, A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. **Cryobiology**. 50. 239-49. 2005.

[4] BERGERON, A. CRÊTE, M.H. BRINDLE, Y. MANJUNATH, P. Low-density lipoprotein fraction from hen`s egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of Reproduction**. 70. 708-17. 2004.

[5] WATSON, PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction. Science**. 61. 481-92. 2000.

[6] MAXWELL, W.M.C. SALAMON, S. Liquid storage of ram semen. **Reproduction, Fertility and Development**. 5. 613-38.1993.

[7] SALAMON, S. MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**. 62. 77-111. 2000.

[8] LOPYRIN, A. **Biology of Reproduction in sheep**. Russia, 1971.

[9] SALAMON, S. MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**. 37. 185-249. 1995.

[10] SALAMON, S. MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**. 38.1-36. 1995.

[11] GILLAN, L. MAXWELL, W.M.C. EVANS, G. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. **Reproduction, Fertility and Development**. 16. 447-54. 2004.

[12] ANEL, L. KAABI, M. ABROUG, B. ALVAREZ, M. ANEL, E. BOIXO, J.C. DE LA FUENTE, L.F. PAZ, P. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. **Theriogenology**. 63. 1235-47. 2005.

[13] WINDSOR, D.P. Mitochondrial function and ram sperm fertility. **Reproduction, Fertility and Development**. 9. 279-84. 1997.

[14] MEGHAN, C.W.R. SHIQUAN, W. GREGORY, S.L. Transcervical artificial insemination in sheep: effects of a new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. **Theriogenology**. 62. 990–1002. 2004.

[15] SILVA, P.F.N. GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**. 65. 958–78. 2006.

[16] WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**. 7. 871-91. 1995.

[17] CEROS - versão 10.8, **Operation manual** HTM-CEROS, HAMILTON THORNE 1999.

[18] PERIS, S. BILODEAU, J.F. DUFOUR, M. BAILEY, J.L. Impact of Cryopreservation and Reactive Oxygen Species on DNA Integrity, Lipid Peroxidation, and Functional Parameters in Ram Sperm. **Molecular Reproduction and Development**. 2006. Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

[19] GILLAN, L. MAXWELL, W.M.C. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. **Journal of Reproduction and Fertility**. 54. 271-83. 1999.

[20] DONOVAN, A. HANRAHAN, J.P. KUMMEN, E. DUFFY, P. BOLAND, M. P. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed semen at a natural or synchronized oestrus. **Animal Reproduction Science**. 84. 359-68. 2004.

[21] GILLAN, L. EVANS, G. MAXWELL, W.M.C. The interaction of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa with oviducal epithelial cells in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**. 12. 237-44. 2000.

[22] BUCAK, M.N. ATESSAHIN, A. YUCE, A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. **Small Ruminant Research**. 75. 128-34. 2008.

[23] BUCAK, M.N. ATESSAHIN, A. VARISLI, O. YUCE, A.A., TEKIN, N. AKÇAY, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. **Theriogenology**. 67. 1060-67. 2007.

[24] KASIMANICKAM, R. PELZER, D. K. KASIMANICKAM, V. SWECKER, W.S. THATCHER, D. C. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. **Theriogenology**. 65. 1407-21. 2006.

[25] HARRISSON, R.A. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as semen as seen in eutherian mammals. **Reproduction, Fertility and Development**. 8. 581-94. 1996.

[26] AMANN, R.P, PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a rewien of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**. 7. 145-73. 1998.

[27] AMANN, R.P., GRAHAN, J.K. Spermatozoal function. **Equine Reproduction**. Malvern. 715-45. 1993.

[28] AISEN, E.G., MEDINA, V.H., VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations, **Theriogenology**. 57. 1801-08. 2002.

[29] HOLT, WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**. 53. 47-58. 2000.

[30] RICKER, J.V. LINFOR, J.J. DELFINO W.J. KYSAR, P. SCHOLTZ, E.L. TABLIN, F. CROWE, J.H. BALL, B.A. MEYERS, S.A. Equine Sperm Membrane Phase Behavior: The Effects of Lipid-Based Cryoprotectants. **Biology of Reproduction**. 74. 359-65. 2006.

[31] YILDIZ, C. KAYA, A. AKSOY, M. TEKELI, T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**. 54. 579-85. 2000.

[32] MOUSSA, M. MARINET, V. TRIMECHE, A. TAINTURIER, D. ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**. 57. 1695-1706. 2002.

[33] AMIRAT, L. TAINTURIER, D. JEANNEAU, L. THORIN, D. CHATAGNON, G. COURTENS, J.L. ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**. 61. 895–907. 2004.

[34] AMIRAT, L. ANTON, M. TAINTURIER, D. CHATAGNON, G. BATTUT, I. COURTENS, J.L. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. **Research Reproduction**. 4. 535-43. 2005.

[35] NICOLLAJSEN, H. HVIDT, A. Phase Behavior of the System Trehalose-NaCl-Water. **Cryobiology**. 31. 199-205.1994.

[36] MANJUNATH, P. THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipids-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal Reproductive Immunology**. 53. 109-19. 2002.

[37] AITKEN, R.J. BUCKINGHAM, D. HARKISS, D. Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. **J. Reprod. Fertil**. 97. 441-50. 1993.

[38] LIGHTFOOT, R.J. SALAMON, S. Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method. Transport and viability of spermatozoa within the genital tract of the ewes. **J. Reprod. Fert**. 22. 385-98. 1975.

[39] EPPLESTON, J. MAXWELL, W.M.C. Sources of variation in the reproductive performace of ewes inseminated with frozen-thawed ram semen by laparoscopy. **Theriogenology**. 43. 777-88. 1995.

[40] MAXWELL, W. M. C. WATSON, P. F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**. 42. 55-65. 1996.

[41] BAILEY, J.L. BILODEAU, J.F. CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**. 21. 2000.

[42] EVANS, G. MAXWELL, W.M.C. Iseminación artificial de ovejas y cabras. Zaragoza. **Acribia**. 191p.1990.

[43] COLAS, G. GUÉRIN, Y. A new method for thawing frozen sêmen. **Theriogenology**. 16. 623-30. 1981.

[44] PEÑA, F.J. SARAVIA, F. NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I. JOHANNISSON, A. WALLGREN, M. RODRIGUEZ MARTINEZ, H. Detection of early changes in sperm membrane integrity pre-freezing can estimate post-thaw quality of boar spermatozoa. **Animal Reproduction Science**. 97. 74-83. 2007.

[45] CELEGHINI, C.C.E. ARRUDA, P.B. ANDRADE, C.F.A. NASCIMENTO, J. RAPHAEL, C.F. RODRIGUES, P.H.M. Effects that bovine sperm cryopreservation using different extender has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction science**. 104. 119-31. 2008.

[46] BAUMBER, J. BALL, B.A. GRAVANCE, C.G. MEDINA, V. DAVIES-MOREL, M.C. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrossomal integrity, mitochondrial membranes potential and membrane lipid peroxidation. **J. Andrology**. 21.895-902. 2000.

[47] PERIS, S.I. MORIER, A. DUFOUR, M. BAILEY, J.L. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm androloical parameters and sperm chromatin structure assy. **Journal of Andrology**. 25. 2004.

[48] GADELA, J. SELLES, E. MARCO, M.A. COY, P. MATAS, C. ROMAR, R. RUIZ, S. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Theriogenology**. 62, 690-701. 2004.

[49] BILODEAU, J.F. BLANCHETTE, S. GAGNON, I.C. SIRARD, M.A. Thiols prevent H_2O_2 mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**. 56. 275-86. 2001.

[50] BILODEAU, J.F. CHATTERJEE, S. SIRARD, M.A. GAGNON, C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Mol. Reprod. Dev**. 55. 282-88. 2000.

[51] KANKOFER, M. KOLM, G. AURICH, J. AURICH, C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 degrees C. **Theriogenology**. 63. 1354-65. 2005.

[52] DURU, N.K. MORSHEDI, M.S. SCHUFFNER, A. OEHNINGER, S. Cryopreservation thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. **J. Androl**. 22. 646-51. 2001.

[53] SINGER, S.J. NICHOLSON, G.L. The fluid mosaic of the structure of cell membrane. **Science**. 175. 720-31. 1972.

[54] FLESCH, F.M. GADELLA, B.M. Dynamics of mammalian sperm membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**.1469. 197-235. 2000.

[55] VALCÁRCEL, A. DE LAS HERAS, M.A. PÉREZ, L. MOSES, D.F. BALADASSARRE, H. Assessment of acrossomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. **Animal Reproduction Science**. 45. 299-309. 1997.

[56] PEREZ, L.J. VALCÁRCEL, A. DE LAS HERAS, M.A. MOSES, D. BALDASSARRE, H. Evidence that frozen-thawed RAM spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assy. **Theriogenology**. 46. 131-40. 1996.

[57] BAILEY, J.L. ROBERTSON, L. BUHR, M.M. Calcium regulation, computerized motility parameters and the fertility of bovine spermatozoa. **Jour. Anim. Sci**. 74. 53-58. 1994.

[58] TOPFER-PETERSEN, E. PETROUNKINA, A.M. Oocyte sperm interactions. **Animal Reproduction Science**. 60-61. 653-62. 2000.

[59] PARKS, J.E. GRAHAN, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**. 38. 209-22. 1992.

[60] BERLINGUER, F. LEONI, G.G. SUCCU, S. MOSSA, F. GALIOTO, M. MADEDDU, M. NAITANA, S. Cryopreservation of European Mouflon (Ovis Gmelini Musimon) Semen During thenon-Breeding Season is Enhanced by the Use of Trehalose. **Reprod. Dom. Anim**. 42. 202-07. 2007.

[61] BERGERON, A. MANJUNATH, P. New Insights Towards Understanding the Mechanisms of Sperm Protection by Egg Yolk and Milk. **Molecular Reproduction and Development**. 73. 1338-44. 2006.

[62] JIANG, Z.L. LI, Q.W. HU, J.H. LI, W.Y. ZHAO, H.W. ZHANG, S.S. Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low density lipoprotein in diluents. **Cryobiology**. 54. 301-04. 2007.

[63] VARELA, A.S.Jr.; LUCIA, T.Jr.; CORRÊA, M.N. et al. Effect of low density lipoproteins from egg-yolk on the quality of canine sêmen colled at 5º C. International Congress on Animal Reproduction – **ICAR. 2004.** Porto Seguro-BA, Brazil. **Anais**. 2, 514, 2004.

[64] MARTIN, C.E.G., LUCIA, T.Jr., NOGUEIRA, C.E.W. et al., Viabilidade de espermatozóides eqüinos criopreservados com diluente contendo lipoproteína de baixa densidade. **Cong. Bras. Reprod. Anim., Anais**, 16. Goiânia-GO, 2005.

[65] DROBNIS, E.Z. CROWE, L.M. BERGER, T. ANCHORDOGUY, T.J. OVERSTREET, J.W. CROWE, J.H. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membrane: A demonstration using sperm as a model. **J. Exp. Zool**. 265. 432-37. 1993.

[66] ZERON, Y. TOMCZAK, M. CROWE, J.H. ARAV, A. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. **Cryobiology**. 45. 143-52. 2002.

[67] GRAVANCE, C.G. VISHWANATH, R. PITT, C. GARNER, D.L. CASEY, P.J. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. **J. Androl**. 19. 704-09. 1998.

[68] NOILES, E.E. BAILEY, J. STOREY, B.T. Temperature dependence of the water permeability, Lp, of murine sperm shows a discontinuity between 4ºC and 0ºC. **Cryobiology.** 32. 220-38.1995.

[69] AGCA, Y. CRISTER, J.K. Cryopreservation of spermatozoa in assisted reproduction. **Seminars in Reproductive Medicine**. 20. 15-23. 2002.

[70] PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**. 63. 215-25. 2006.

[71] LEBOEUF, B. RESTALL, B. SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Anim. Reprod. Sci**. 62.113-41. 2000.

Uso de diferentes crioprotetores em diluentes para sêmen ovino congelado

(Artigo)

RESUMO

TONIETO, Adolfo Rafael. **USO DE DIFERENTES CRIOPROTETORES EM DILUENTES PARA SÊMEN OVINO CONGELADO**. 2008. 53f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Em ovinos, as baixas taxas de prenhez obtidas com inseminação artificial com sêmen congelado inviabilizam o seu uso como rotina. Provocando o processo de criopreservação lesões nos espermatozóides, o desenvolvimento de diluentes que incluam crioprotetores de excelência se justifica. Este trabalho testou a inclusão da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e da trealose em diluentes para congelamento de sêmen ovino, a partir da avaliação de parâmetros de qualidade seminal pós-descongelamento. No primeiro experimento, foram comparados 3 tratamentos: Tris com 20% de gema de ovo e 5% de glicerol (T1); Tris com 100 mM de trealose (T2); e T1 com 50 mM de trealose (T3). A motilidade não diferiu entre os tratamentos ($P > 0,05$), mas o T2 apresentou maior proporção de gametas com membranas íntegras ($P < 0,05$). No segundo experimento, foram comparados 4 tratamentos: Tris com 20% de gema de ovo (T1); T1 com 5% de glicerol (T2); T1 com 100 mM de trealose (T3); e T1 com 100 mM de trealose e 5% de glicerol (T4). A motilidade e a integridade da membrana espermática do T2, T3 e T4 foram superiores a do T1 ($P > 0,05$), mas a integridade do acrossoma não diferiu ($P > 0,05$) em todos os tratamentos. No terceiro experimento, foram comparados 4 tratamentos: Tris com 20% de gema de ovo e 110 mM de trealose (T1); Tris com 8% de LDL, incluindo 5% de glicerol (T2); Tris com 8% de LDL, incluindo 110 mM de trealose (T3); Tris com 8% de LDL, incluindo 110 mM de trealose e 5% de glicerol (T4). A motilidade dos espermatozóides para o T2 e para o T3 foram superiores aos demais tratamentos ($P < 0,05$), mas, com relação à integridade de membrana, não houve diferença entre os tratamentos com LDL ($P > 0,05$). A integridade do acrossoma não diferiu entre os tratamentos ($P > 0,05$). Portanto, o uso de LDL e trealose como crioprotetores foi associado com melhorias na motilidade e na integridade da membrana espermática, no sêmen ovino, após o descongelamento.

Palavras-chave: Trealose, LDL, sêmen congelado, ovinos.

1. Introdução

A utilização de biotécnicas aplicadas à reprodução animal permite maximizar a genética dos rebanhos, obtendo, assim, produtos com características produtivas e econômicas que atendem à demanda do mercado consumidor.

A inseminação artificial (IA) é uma biotécnica com custos relativamente acessíveis, que desempenha papel importante como ferramenta de melhoramento genético, em especial, com o uso de sêmen congelado, o qual viabiliza o armazenamento prolongado de gametas.

Porém, existem dificuldades na consolidação desta tecnologia, pois há uma limitada repetitibilidade nos resultados após IA transcervical, uma vez que a cérvix da ovelha apresenta uma estrutura anatômica que dificulta a inserção de cateteres convencionais (Naqvi *et al.,* 2003; Kershaw *et al.,* 2005; Kaabi *et al.,* 2006).

A aplicação de sêmen congelado através da inseminação cervical não proporciona resultados consistentes, limitando o seu uso em larga escala (Aisen *et al.,* 1999). Assim, as taxas de prenhez obtidas com este tipo de inseminação (inferiores a 40%), inviabilizam o seu uso como rotina (Donovan *et al.,* 2004), devendo ser salientado, no entanto, que quando o sêmen é apenas resfriado, as taxas obtidas tem se mostrado satisfatórias (superiores a 65%) (Paulenz *et al.,* 2003).

A diminuição da fertilidade do sêmen ovino congelado é resultado de danos na capacidade funcional dos espermatozóides devido ao choque térmico (Watson, 2000).

Outro aspecto relevante diz respeito ao estresse osmótico provocado pela adição das soluções crioprotetoras, as quais provocam a desidratação celular, ocasionando altas concentrações intracelulares de sais (Ball & Vo, 2001).

As alterações decorrentes do choque térmico e do estresse osmótico provocam alterações estruturais e funcionais na membrana plasmática do espermatozóide (Pursel & Johnson, 1975). Tais alterações implicam em um efeito negativo sobre a motilidade espermática e sobre as trocas metabólicas através das membranas celulares, que podem influenciar negativamente nos processos de capacitação espermática e no mecanismo de fertilização, ou, até mesmo, levar à morte celular (Watson, 1996; Salamon & Maxwell, 2000).

A membrana plasmática do espermatozóide ovino difere em sua composição em comparação com outras espécies mamíferas cujos espermatozóides são mais resistentes ao congelamento, como a bovina (Parks & Lynch, 1992).

A principal diferença seria no conteúdo de fosfolipídios (Watson, 1995), já que a presença de altas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, na estrutura lipídica da célula, necessita da atividade de potentes anti-oxidantes, para proteger a membrana contra a ação de danos oxidativos e da capacitação prematura (Bailey *et al.,* 2000).

O princípio da técnica de congelamento celular consiste na diminuição do metabolismo e na desidratação da célula através do uso de crioprotetores intracelulares (com baixo peso molecular) e extracelulares (com alto peso molecular).

Estes crioprotetores são utilizados para proteger as células contra lesões provocadas pelo choque térmico induzido pelos processos de congelamento e descongelamento (Purdy, 2006).

As soluções crioprotetoras normalmente têm caráter de hiper-osmolaridade, reduzindo o ponto de congelamento para –5 a –7 ºC, estabilizando as membranas celulares e atuando como tampão salino no combate aos efeitos deletérios das altas concentrações de eletrólitos nas células desidratadas (Silva & Gadela, 2006).

A gema de ovo é o crioprotetor externo mais utilizado em protocolos de congelamento para sêmen ovino (Salamon & Maxwell, 1995b).

Entretanto, a gema de ovo contém substâncias que podem dificultar o metabolismo celular, diminuindo a motilidade espermática (Moussa *et al.,* 2002).

Estudos recentes descreveram a lipoproteína de baixa densidade (LDL), presente na gema de ovo, como um eficiente crioprotetor externo em bovinos (Amirat *et al.,* 2004), cães (Varela *et al.,* 2004), eqüinos (Martin *et al.,* 2005), caprinos (Aboagla & Terada, 2004) e suínos (Jiang et al., 2007).

A LDL apresenta grande afinidade para se ligar com as proteínas do plasma seminal (PPS), formando um complexo e impedindo que estas interajam com a membrana espermática (Bergeron & Manjunath, 2006), além de prevenir a saída de fosfolipídios e colesterol da membrana (Manjunath *et al.,* 2002; Bergeron *et al.,* 2004). Como conseqüência, há um incremento na resistência das células espermáticas ao choque térmico.

Ainda, por meio de microscopia eletrônica, foi observado que o sêmen bovino congelado com diluentes incluindo LDL apresenta incremento na freqüência de células espermáticas viáveis (Amirat *et al.,* 2005).

A trealose, um dissacarídeo não penetrante, com funções de substrato energético durante a incubação, manutenção da pressão osmótica e ação crioprotetora, também pode aumentar a viabilidade espermática do sêmen ovino, após o descongelamento (Aisen *et al.,* 2005).

A desidratação celular ocasionada pela trealose protege a membrana contra os efeitos deletérios do trânsito de água durante o equilíbrio osmótico da célula (Aboagla & Terada, 2003; Yildiz *et al.,* 2000), além de interagir de forma específica com os fosfolipídios e proteínas da membrana. Isto confere à membrana espermática uma maior flexibilidade, tornando-a capaz de suportar os danos provenientes da criopreservação (Bucak *et al.,* 2007).

O glicerol também é utilizado em larga escala com eficiência como crioprotetor intracelular, quando em concentração adequada e adicionado ao sêmen em temperatura ideal para a espécie (Bailey *et al.*, 2000).

No entanto, o glicerol apresenta potencial efeito citotóxico, além de ser danoso à integridade da membrana espermática (Gil *et al.,* 2003).

Além disso, os radicais hidroxila do glicerol podem ligar-se entre si, diminuindo a probabilidade de ligações com as moléculas de água, o que se constitui em uma característica desfavorável ao processo de criopreservação (Wowk *et al.,* 1999).

Outro fator que deve ser levado em consideração quando da utilização de sêmen congelado na inseminação artificial, é a variabilidade existente entre os machos doadores de sêmen, tendo em vista as particularidades de cada animal (Roca *et al.,* 2006).

Diante deste quadro, não obstante os crioprotetores mencionados tenham apresentado bons índices de viabilidade do sêmen após o descongelamento, outras soluções crioprotetoras e novas formulações ainda podem ser testadas, a fim de melhorar os índices já alcançados.

1.1. *Objetivos*

Os objetivos deste trabalho são:

1. Verificar o efeito de diferentes diluidores utilizados para o congelamento do sêmen sobre a motilidade e a integridade da membrana plasmática, pré-congelamento e pós-descongelamento.

2. Estudar a criopreservação do sêmen ovino através do uso do crioprotetor extracelular à base de trealose, em diferentes composições, e os seus efeitos sobre a motilidade e sobre a integridade da membrana plasmática e da membrana do acrossoma no sêmen descongelado.

3. Avaliar o efeito da inclusão de lipoproteína de baixa densidade (LDL) na composição dos diluidores utilizados para o congelamento do sêmen, sobre a motilidade e a integridade da membrana plasmática e da membrana do acrossoma após o descongelamento.

4. Verificar o efeito da combinação de trealose e glicerol na composição dos diluentes, sobre os parâmetros motilidade e integridade da membrana plasmática e da membrana do acrossoma do sêmen ovino descongelado.

2. Materiais e Métodos

Foram realizados três experimentos. No primeiro experimento (EXP1) foi realizada uma triagem, na busca da melhor formulação para o diluente, em especial no que diz respeito à concentração de trealose. Foram comparados 3 tratamentos: controle, contendo o diluente Tris (Aisen *et al.,* 2005) com inclusão de 20% de gema de ovo e 5% de glicerol (T1); Tris com inclusão de 100 mM de trealose (T2); e T1 com inclusão de 50 mM de trealose (T3).

No segundo experimento (EXP2) foram comparados o glicerol e a trealose, no papel de crioprotetores internos, quando incluídos no meio diluidor Tris, incluindo gema de ovo como crioprotetor externo. Foram avaliados 4 tratamentos: controle, contendo o diluente Tris com inclusão de 20% de gema de ovo (T1); T1 com inclusão de 5% de glicerol (T2); T1 com inclusão de 100 mM de trealose (T3); e T1 com inclusão de 100 mM de trealose e 5% de glicerol (T4).

No terceiro experimento (EXP3), também foram comparados 4 tratamentos: controle, contendo o diluente Tris com 20% de gema de ovo e 110 mM de trealose (T1); Tris com 8% de LDL, incluindo 5% de glicerol (T2); Tris com 8% de LDL, incluindo 110 mM de trealose (T3); Tris com 8% de LDL, incluindo 110 mM de trealose e 5% de glicerol (T4).

A formulação do diluente Tris consiste em: 3,0 g de Tris hidroximetil aminometano; 1,2 g de ácido cítrico; 1,25 g de glicose; 100 mg de benzilpenicilina; 100 mg de sulfato de dihidroestreptomicina; e água destilada até completar 100 mL de diluidor. A osmolaridade variou entre 1450-1600 mOsM, o pH foi ajustado em 6,8 para todos os diluidores.

2.1. Coletas dos ejaculados

Em todos os experimentos as coletas de sêmen foram realizadas através de vagina artificial, utilizando um copo coletor de vidro.

No EXP1 foram utilizados quatro carneiros cruzados da raça Crioula, com aproximadamente 24-36 meses de idade. Os carneiros foram mantidos em grupo, sob condições semi-extensivas, nas mesmas condições ambientais, em área da Universidade Federal de Pelotas. Foram coletados três ejaculados de cada macho (n = 12).

No EXP2 e no EXP3 as condições são idênticas as descritas para o EXP1. Em ambos os experimentos foram coletados oito ejaculados de cada macho. No entanto, no EXP2 foram utilizados quatro carneiros cruzados da raça Crioula (n = 32), enquanto no EXP3 foram utilizados cinco carneiros cruzados da raça Crioula (n = 40).

Após a coleta de sêmen, foram avaliadas a motilidade espermática (0 – 100%), por microscopia óptica de contraste de fases, em aumento de 200 x (Bearden & Fuquay, 1997).

Todas as avaliações de motilidade espermática foram efetuadas pelo mesmo técnico treinado.

Somente foram utilizados nos experimentos ejaculados com motilidade maior ou igual a 80%.

Também foi avaliada a integridade da membrana dos espermatozóides por fluorescência, através das sondas Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídio(PI) (Harrison & Vickers, 1990).

As amostras de sêmen foram diluídas na proporção de 20/1 (v/v) nos respectivos diluentes a 37ºC, livres de glicerol.

2.2. Purificação da LDL da gema de ovo

Os ovos de galinha foram quebrados manualmente e as gemas foram separadas das claras. Cada gema foi colocada sob um papel filtro para remoção da chalaça e de traços de clara aderida à membrana vitelínica. Esta foi rompida e a gema foi colocada em um Becker resfriado em gelo. Após, foram preparados os diluentes com 20% de gema de ovo e os demais compostos, exceto o antimicrobiano e o glicerol. A gema de ovo foi centrifugada por 45 minutos, a 5ºC, em 10.000 x g. O sobrenadante foi retirado e centrifugado novamente por 45 minutos, a 5ºC, em 10.000 x g. O produto deste segundo sobrenadante é a fração da gema de ovo rica em LDL.

Ao final do processo foi obtido um diluente composto à base de LDL, no qual foi adicionado antimicrobiano, 100 mg de benzilpenicilina e 100 mg de sulfato de dihidroestreptomicina, para cada 100 ml de diluidor (adaptado de Varela *et al.,* 2004).

2.3. *Criopreservação, envase e descongelamento*

Após a coleta e diluição inicial do sêmen, foi iniciada a curva de resfriamento.

O sêmen permaneceu submerso em água isotérmica, em caixa térmica com temperatura de 5ºC, durante 2 horas, até completar a curva de resfriamento e atingir 5ºC.

Transcorrido este período, os tratamentos específicos receberam inclusão de glicerol com concentração final de 5%. O sêmen permaneceu 20 minutos em contato com o glicerol a 5ºC, para estabilização e, logo após, foi envasado em palhetas de 0,25 mL, com concentração final de 200 x 10^6 espermatozóides/palheta.

As palhetas foram colocadas horizontalmente, a 5 cm acima do vapor de nitrogênio líquido, por 15 minutos, sendo após mergulhadas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas a -196ºC.

O descongelamento das palhetas foi realizado a 37°C, por 20 segundos, em banho-maria com circulação de água.

As amostras descongeladas foram re-suspensas em tubo cônico de 15 mL, contendo 3 mL de citrato de sódio a 3%, previamente aquecido a 37ºC.

As amostras foram incubadas em banho-maria por 10 minutos, para posteriores avaliações.

2.4. Avaliação dos ejaculados após o descongelamento

A avaliação da motilidade espermática (0–100%) foi realizada através de microscopia óptica (200 x), 10 minutos após o descongelamento (Bearden & Fuquay, 1997b), utilizando aproximadamente 10 µl de sêmen em lamínula sobre lâmina, ambas pré-aquecidas a 37°C. Para todas as amostras, esta avaliação foi sempre realizada pelo mesmo técnico treinado.

Após o descongelamento, foi também realizada a avaliação da integridade de membrana dos espermatozóides por fluorescência (Harrison & Vickers, 1990), através das sondas Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA, Sigma-Aldrich®) e Iodeto de Propídio (PI, Sigma-Aldrich®).

Para a preparação da amostra foram utilizados 10 µL de sêmen e 40 µL de sonda fluorescente. Após a incubação da amostra a 22ºC, por 15 minutos, foi preparada uma nova amostra, com 10 µL da primeira amostra, em lamínula sobre lâmina.

A leitura foi realizada em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC), através de excitação em filtro WU sob aumento de 400 x.

Foram contados 200 espermatozóides em uma mesma lâmina, os quais foram classificados conforme a sua coloração em: íntegros (espermatozóides corados em verde em toda a sua extensão) e lesados (espermatozóides corados em vermelho).

A avaliação da integridade da membrana do acrossoma foi realizada conforme descrito por outros autores (Sukardi *et al.,* 1997; Kawamoto *et al.,* 1999), através da associação das sondas fluorescentes conjugadas lectin Pisun sativum - Isotiocinato de fluoresceína (FITC-PSA, Sigma-Aldrich®).

A amostra foi preparada com 20 µL de sêmen e centrifugada a 1400 rpm, durante 10 min. Após, o pellet foi re-suspenso em 80 µL de solução PBS e centrifugado novamente a 1400 rpm, por 10 minutos.

Foram contadas 200 células na mesma lâmina. As células foram classificadas em lesadas, quando apresentavam coloração verde fluorescente na região acrossomal e não lesadas, quando não apresentavam tal coloração. A leitura foi realizada sob microscopia de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC), através de excitação em filtro WU sob aumento de 400x.

2.5. Análise estatística

Em todos os experimentos o efeito dos tratamentos sobre os indicadores de qualidade de sêmen foi avaliado através de análise de variância com medidas repetidas.

O modelo incluiu os efeitos dos tratamentos, o dia da coleta de sêmen, a interação entre tratamento e coleta e o efeito individual de cada carneiro agrupado dentro do efeito dos tratamentos.

As comparações entre as médias foram conduzidas pelo teste de Tukey. Não tendo nenhuma das respostas seguido distribuição normal, elas foram submetidas a transformações. A motilidade espermática sofreu transformação arco-tangente, a integridade de membrana espermática sofreu transformação arco-seno e a integridade de acrossoma sofreu transformação para a escala logarítmica. No entanto, os dados foram relatados na sua escala original, para permitir a interpretação.

3. Resultados

3.1. Experimento 1:

Os efeitos dos tratamentos sobre a motilidade espermática e a integridade da membrana após o descongelamento são demonstrados na tabela 1.

No descongelamento, os percentuais de células móveis foram altos para todos os tratamentos, não havendo diferença significativa entre eles (P>0,05).

Com relação à integridade da membrana espermática, o T2 apresentou maior proporção de espermatozóides com membranas íntegras após o descongelamento do que o T3 (P<0,05). No entanto, não foi observada diferença significativa entre o T1 e o T2, quanto à integridade da membrana, tendo ambos apresentando valores elevados.

Tabela 1.

O efeito da concentração de trealose sobre a motilidade e a integridade da membrana espermática após o descongelamento do sêmen ovino (n = 12 coletas)

Tratamentos	Integridade da Membrana (%)	Motilidade (%)
T1	38,2±5,84^{ab}	76,2±4,63
T2	42,1±5,84^{a}	64,0±4,63
T3	25,4±5,84^{b}	67,5±4,63

As médias nas colunas seguidas de diferentes letras diferem em (P<0,05); n=12

T1= Tris+gema de ovo+glicerol; T2= Tris+gema de ovo+trealose; T3=Tris+gema de ovo+trealose+glicerol

3.2. Experimento 2:

Os resultados do EXP2 são demonstrados na tabela 2.

Após o descongelamento, as proporções de células móveis e a integridade da membrana espermática, para o T2, o T3 e o T4 foram superiores ao T1 (P>0,05). No entanto, para ambas as variáveis, o T2, o T3 e o T4 não diferiram (P>0,05).

Os tratamentos não diferiram quanto à integridade do acrossoma (P>0,05).

Tabela 2.

O efeito da trealose e do glicerol sobre a motilidade, a integridade da membrana espermática e a integridade acrossomal após o descongelamento do sêmen ovino (n = 32 coletas)

Tratamentos	Motilidade (%)	Integridade da membrana (%)	Integridade do acrossoma (%)
T1	23,7±2,71[b]	16,4±2,62[b]	49,2±3,47
T2	54,2±2,71[a]	37,2±2,62[a]	55,4±3,47
T3	49,2±2,71[a]	36,5±2,62[a]	65,3±3,47
T4	43,7±2,71[a]	35,1±2,62[a]	56,2±3,47

As médias das colunas de diferentes letras diferem em (P<0,05); n=32

T1= Tris + gema de ovo; T2= Tris + gema de ovo + glicerol; T3= Tris + gema de ovo + trealose: T4= Tris + gema de ovo + trealose + glicerol

3.3. Experimento 3:

Os resultados do EXP3 são demonstrados na tabela 3.

A porcentagem de espermatozóides com membranas plasmáticas intactas, após o descongelamento, foi superior (P<0,05) para o T2 e o T3 em comparação com o T1, embora não tenha ocorrido diferença estatística significativa entre os tratamentos com inclusão de LDL (P>0,05).

A percentagem de células móveis foi superior para o T2 e o T3 em comparação com o T1 e o T4 (P<0,05).

Não foram observadas diferenças entre os tratamentos quanto à integridade do acrossoma (P>0,05).

Tabela 3.

O efeito da LDL, da trealose e do glicerol sobre a motilidade, a integridade da membrana espermática e da membrana acrossomal após o descongelamento do sêmen ovino (n = 40 coletas)

Tratamentos	Motilidade (%)	Integridade da membrana (%)	Integridade do acrossoma (%)
T1	31,2±2,15^{b}	14,9±1,77^{b}	36,0±3,41
T2	43,5±2,15^{a}	22,9±1,77^{a}	38,5±3,41
T3	41,7±2,15^{a}	24,9±1,77^{a}	36,7±3,41
T4	32,5±2,15^{b}	19,3±1,77^{ab}	38,3±3,41

As médias das colunas de diferentes letras diferem em (P<0,05); n=40

T1 = Tris + gema de ovo + trealose; T2 = Tris + LDL + glicerol; T3 = Tris + LDL + trealose; T4 = Tris + LDL + trealose + glycerol

4. Discussão

Os dados do presente estudo indicam que os diluentes incluindo LDL e trealose do experimento 3 apresentaram a melhor eficiência na proteção dos espermatozóides contra o choque térmico, caracterizando-se por uma alta freqüência de espermatozóides mantendo motilidade e integridade da membrana plasmática após o descongelamento, apesar de não apresentarem efeito sobre a integridade do acrosssoma.

Os resultados observados quanto à integridade de membrana e motilidade corroboram as observações de outro estudo que relatou a capacidade crioprotetora da trealose (Aisen *et al*., 2005).

Os resultados referentes à integridade do acrossoma não estão de acordo com outros estudos, nos quais foram observadas interações significativas entre açucares crioprotetores (Yildiz *et al*., 2000), gema de ovo e glicerol (Aboagla & Terada, 2004).

O principal efeito deletério da criopreservação provavelmente é a alteração na permeabilidade da membrana plasmática, devido às alterações no estado físico dos lipídios que a compõe, a qual é associada com danos sub-letais na estrutura espermática, tais como o desprendimento da membrana plasmática e alterações de flagelo.

Tais alterações resultam na exposição e reorganização contínua dos sítios ligantes das fibras de actina (Holt & North, 1991), o que implica na desestabilização da cadeia lipídica, culminando com o efluxo e a peroxidação dos lipídios de membrana (Bergeron *et al.,* 2004).

A ação crioprotetora da trealose é associada com a habilidade na preservação da integridade da membrana plasmática, ainda que este açúcar tenha potente ação antioxidativa, melhorando as condições após o descongelamento do sêmen ovino, ainda que fora da estação reprodutiva da espécie (Berlinguer *et al.,* 2007).

A desidratação intracelular causada pela trealose contribui para a preservação das organelas durante o congelamento, reduzindo a formação dos cristais de gelo (Aisen *et al*., 2002).

A trealose também interfere no padrão de cristalização dos canais de soluto que permanecem na fração de água não congelada (Nicolajsen *et al*., 1994).

Por isso, a trealose vem sendo utilizada como base para diluentes hipertônicos, já que o processo de osmo-regulação do espermatozóide, em baixas temperaturas, pode levar a alterações relevantes na integridade da membrana plasmática, principalmente pela desestruturação da camada lipídica, comprometendo a integridade e a motilidade celular (Meyers, 2005).

A desidratação da célula espermática, em meio hipertônico, durante o congelamento, em curvas de temperaturas ideais, pode fazer com que o sêmen suporte temperaturas negativas por longos períodos, trazendo benefícios para o espermatozóide no final do processo de congelamento (Woelders *et al.,* 1997).

Os resultados do experimento 2 comprovam esta afirmação, uma vez que o percentual de motilidade e de células com membranas intactas no T3 foi de 26 e 20 pontos percentuais superior, respectivamente, ao observado no grupo controle.

Outros estudos também demonstraram a eficiência crioprotetora da trealose para o sêmen de bovinos (Chen *et al.*, 1993) e camundongos (Storey *et al.*, 1998).

Nos experimentos 2 e 3, quando utilizada a LDL, ao serem comparados os crioprotetores trealose e glicerol, não foi observada diferença na motilidade e na integridade da membrana plasmática e do acrossoma, após o descongelamento.

No entanto, no experimento 1, quando utilizada a gema de ovo, a trealose apresentou superioridade quanto ao percentual de células com membranas íntegras, ao ser comparada ao glicerol.

Este efeito pode ser atribuído a possíveis danos irreversíveis na célula espermática, causados pelo glicerol presente no diluidor, o qual, apesar de suas características benéficas como crioprotetor, tem potencial efeito citotóxico para a célula espermática em determinadas concentrações (Holt, 2000; Watson, 2000). Todavia, os efeitos deletérios do glicerol são menos intensos quando este crioprotetor intracelular é associado à LDL, o que explica os diferentes resultados obtidos entre os experimentos 2 e 3 e o experimento 1.

Além disso, os radicais hidroxilas do glicerol podem ligar-se entre si, diminuindo a probabilidade de ligações com as moléculas de água, o que é desfavorável à preservação do espermatozóide (Wowk *et al.,* 1999).

Em função destes efeitos, a trealose poderia ser recomendada como crioprotetor em substituição do glicerol.

O uso da trealose também apresentaria outras vantagens, tais como: a facilidade na execução do protocolo de congelamento, pois este açúcar pode ser

adicionado ao diluente a 30ºC, durante a fase de preparação, e a redução da ocorrência de choque térmico e estresse osmótico, a 5ºC, durante a adição do glicerol ao sêmen.

Os resultados deste trabalho indicam, ainda, que nos três experimentos, quando a trealose e o glicerol foram incluídos na mesma formulação (como no T4, do Experimento 3), a motilidade e a integridade da membrana foram inferiores.

Estes resultados vão ao encontro das observações de Woelders *et al.* (1997), que atribuíram este efeito ao choque osmótico provocado pelas altas concentrações intracelulares de sais e outros solutos, resultantes do processo de desidratação ao qual a célula é submetida.

Em função da superioridade quanto à motilidade e à integridade de membrana, nossos resultados indicam, também, que a LDL é um crioprotetor externo mais eficiente do que a gema de ovo, na composição dos diluentes para o congelamento de sêmen ovino.

A concentração de LDL utilizada neste estudo (8%) foi ajustada com base em estudos desenvolvidos em bovinos (Moussa *et al*., 2002), cães (Varela Junior *et al.*, 2004) e eqüinos (Martin *et al.,* 2005), tendo ela se mostrado capaz de proteger as células espermáticas das injúrias decorrentes das baixas temperaturas.

Efeitos benéficos da LDL na proteção de espermatozóides contra o choque térmico foram também observados em suínos (Jiang *et al.*, 2007). Em bovinos, quando comparada com diluentes comerciais, a LDL apresentou benefícios para a integridade do acrossoma, após incubação por 24 h, o que a qualifica para o uso em preservação de sêmen bovino a 4ºC (Amirat *et al.,* 2005).

Estes efeitos seriam conseqüência de sua capacidade de evitar o efluxo de fosfolipídios (Thérien *et al.*, 1999) e de colesterol da membrana plasmática dos espermatozóides (Bergeron *et al*. 2004). As moléculas de LDL interagem com as proteínas do plasma seminal, impedindo que estas fiquem livres para atuar na membrana celular durante a criopreservação, preservando a sua integridade (Bergeron & Manjunath, 2006). Os lipídios presentes na LDL não são incorporados à membrana plasmática, agindo como uma barreira física que preserva a membrana durante a criopreservação, principalmente na fase de transição dos lipídios, evitando a separação das membranas e conferindo estabilidade contra o choque térmico (Ricker *et al.,* 2006).

No experimento 3, a associação da LDL com a trealose e o glicerol não trouxe prejuízos para a integridade da membrana dos espermatozóides após o descongelamento. No entanto, esta mesma combinação de crioprotetores, em associação com a gema de ovo, apresentou resultados insatisfatórios, no experimento 1.

A causa responsável pela superioridade do efeito crioprotetor da LDL é a remoção das substâncias prejudiciais que fazem parte da gema de ovo, tais como os componentes granulares e minerais, que se aderem rapidamente à membrana, e a fração de lipoproteína de alta densidade, a qual potencializa a ação das proteínas do plasma seminal para o efluxo de fosfolipídios e colesterol da membrana espermática (Thérin *et al.,* 1999). Tais substâncias podem dificultar a atividade respiratória do espermatozóide (Tosic *et al.,* 1946) e, conseqüentemente, a sua motilidade (Pace *et al.,* 1974).

5. Conclusão

Foi estabelecido um novo diluente para o processo de congelamento do sêmen ovino, incluindo lipoproteína de baixa densidade na concentração de 8% e trealose na concentração de 110 mM. Os dois crioprotetores estiveram associados a melhorias na motilidade e integridade da membrana plasmática dos espermatozóides após o descongelamento.

6. Referências

[1] ABOAGLA, E.M.E. TERADA, T. Effects of the supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa. Theriogenology. 62. 809-18. 2004.

[2] ABOAGLA, E.M.E. TERADA, T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. **Biology of Reproduction.** 69. 1245-50. 2003.

[3] AISEN, E. QUINTANA, M. MEDINA, V. MORELLO, H. VENTURINO, A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. **Cryobiology.** 50. 239-49. 2005.

[4] BERGERON, A. CRÊTE, M.H. BRINDLE, Y. MANJUNATH, P. Low-density lipoprotein fraction from hen`s egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of Reproduction**. 70. 708-17. 2004.

[5] WATSON, PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.** 61. 481-92. 2000.

[6] SALAMON, S. MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science.** 62. 77–111. 2000.

[7] SALAMON, S. MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science.** 37. 185-249. 1995.

[8] SALAMON, S. MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen Il. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science.** 38.1-36. 1995.

[9] GILLAN, L. MAXWELL, W.M.C. EVANS, G. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. **Reproduction, Fertility and Development.** 16. 447-54. 2004.

[10] SILVA, P.F.N. GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology.** 65. 958–78. 2006.

[11] WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development.** 7. 871-91. 1995.

[12] DONOVAN, A. HANRAHAN, J.P. KUMMEN, E. DUFFY, P. BOLAND, M. P. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed semen at a natural or synchronized oestrus. **Animal Reproduction Science.** 84. 359-68. 2004.

[13] BUCAK, M.N. ATESSAHIN, A. VARISLI, O. YUCE, A.A., TEKIN, N. AKÇAY, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. **Theriogenology.** 67. 1060-67. 2007.

[14] YILDIZ, C. KAYA, A. AKSOY, M. TEKELI, T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology.** 54. 579-85. 2000.

[15] AMIRAT, L. TAINTURIER, D. JEANNEAU, L. THORIN, D. CHATAGNON, G. COURTENS, J.L. ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology.** 61. 895–907. 2004.

[16] AMIRAT, L. ANTON, M. TAINTURIER, D. CHATAGNON, G. BATTUT, I. COURTENS, J.L. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos®, low density lipoprotein and Triladyl®, before, during and after freezing and thawing. **Research Reproduction.** 4. 535-43. 2005.

[17] MANJUNATH, P. THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipids-binding proteins Reproductive Immunology. 53. 109-19. 2002.

[18] BAILEY, J.L. BILODEAU, J.F. CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology.** 21. 2000.

[19] JIANG, Z.L. LI, Q.W. HU, J.H. LI, W.Y. ZHAO, H.W. ZHANG, S.S. Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low density lipoprotein in diluents. **Cryobiology.** 54. 301-04. 2007.

[20] VARELA, A.S.Jr.; LUCIA, T.Jr.; CORRÊA, M.N. et al. Effect of low density lipoproteins from egg-yolk on the quality of canine sêmen colled at 5º C. International Congress on Animal Reproduction – **ICAR. 2004. Porto Seguro-BA, Brazil. Anais.** 2, 514, 2004.

[21] MARTIN, C.E.G., LUCIA, T.Jr., NOGUEIRA, C.E.W. et al., Viabilidade de espermatozóides eqüinos criopreservados com diluente contendo lipoproteína de baixa densidade. **Cong. Bras. Reprod. Anim., Anais,** 16. Goiânia-GO, 2005.

[22] NAQVI, S.M.K. PANDEY, G.K. GAUTAM, K.K. JOSHI, A. GEETHALAKSHMI, V. MITTAL, J.P. Evaluation of gross anatomical features of cervix of tropical sheep using cervical silicone moulds. **Animal Reproduction Science.** 84. 337-44. 2005.

[23] PAULENZ, H. SÖDERQUIST, L. ADONY, T. FOSSEN, H.O. BERG, A.K. Effect of milk and TRIS-based extenders on the fertility of sheep inseminated vaginally once or twice with liquid semen. **Theriogenology.** 60. 759-66. 2003.

[24] HARRISON, R.A.P. VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility.** 88. 343-52. 1990.

[25] BALL, B.A. VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology.** 22. 1061-69. 2001.

[26] WATSON, P.F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. In: INTERNATIONAL CONFERENCE BOAR SEMEN PRESERVATION, 3, 1996, Germany. **Proceedings…** Germany, 1996, p.135-140.

[27] PURSEL, V.G. JOHNSON, L.A. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. **J. Anim. Sci.** 40. 99-102.1975.

[28] PURDY, P.H. The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48h at 5ºC prior to cryopreservation. **Animal Reproduction Science.** 93. 114-24. 2006.

[29] PARKS, J.E. LYNCH, D.V. Lipid composition and thermotropic phasebehavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. **Cryobiology.** 29. 255-66. 1992.

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

[31] ROCA, J. HERNÁNDEZ, H. CARVAJAL, G. VÁZQUEZ, J.M. MARTÍNEZ, E.A. Factors influencing boar sperm cryosurvival. **Journal of Animal Science.** 84. 2692-99. 2006.

[32] WOWK, B. DARWIN, M. HARRIS, S.B. RUSSEL, S.R. RASH, C.M. Effects of solutes methoxilation on glass-forming ability and stability of vitrification solutions. **Cryobiology.** 39. 215-27. 1999.

[33] GIL, J. RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M. LUNDEHEIM, N.SÖDERQUIST, L. RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Fertility of RAM sêmen frozen in Bioexell® and used for cervical artificial insemination. **Theriogenology.** 59. 1157-70. 2003.

[34] BEARDEN, H.J, FUQUAY, J.W. Semen evaluation. In: BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Appl. **Anim. Reprod.** 4th Ed.New Jersey: Prentice Hall, 1997b. p.159-170.

[35] SUKARDI, S. CURRY, M.R. WATSON, P.F. Simultaneous detection the acrossomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. **Animal Reproduction Science.** 46. 89-96. 1997.

[36] KAWAMOTO, A. OHASHI, K.KISHIKAWA, H. ZHU, L. AZUMA, C. MURATA, Y. Two-color fluorescence staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrossomal status. **Fertility and Sterility.** 71. 1999.

[37] AISEN, E.G. MEDINA, V.H, VENTURINO, A. Evaluación del semen ovino congelado en distintas concetraciones de trealose. **Rev. Bras. Reprod. Anim**. Rio Negro, 23. 282-83. 1999.

[38] KERSHAW, C.M. KHALID. M. McGOWAN, R.M. INGRAM, K. LEETHONGDEE. S. WAX, G. SCARAMURAZZI, J.R. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. **Theriogenology.** 64. 1225-35.2005.

[39] KAABI, M. ALVAREZ, M. ANEL, E. CHAMORRO, C.A. BOIXO, J.C. DE PAZ, P. ANEL, L. Influence of breed and age on morphometry and depth of inseminating catheter penetration in the ewe cervix: A post mortem study. **Theriogenology.** 66. 1876-83. 2006.

[40] AISEN, E.G., MEDINA, V.H., VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations, **Theriogenology.** 57. 1801-08. 2002.

[41] BERLINGUER, F. LEONI, G.G. SUCCU, S. MOSSA, F. GALIOTO, M. MADEDDU, M. NAITANA, S. Cryopreservation of European Mouflon (Ovis Gmelini Musimon) Semen During thenon-Breeding Season is Enhanced by the Use of Trehalose. **Reprod. Dom. Anim.** 42. 202-07. 2007.

[42] NICOLLAJSEN, H. HVIDT, A. Phase Behavior of the System Trehalose-NaCl-Water. **Cryobiology.** 31. 199-205.1994.

[43] HOLT, WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology.** 53. 47-58. 2000.

[44] BERGERON, A. MANJUNATH, P. New Insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk**. Molecular Reproduction and Development.** 73. 1338-44. 2006.

[45] THÉRIEN, I. MOREAU, R. MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phopholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. **Biol. Reprod.** 61. 590-98. 1999.

[46] STOREY, B.T. NOILES, E.E. THOMPSON, K.A. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse cryopreservation. **Cryobiology.** 58. 37-46. 1998.

[47] CHEN, Y. FOOTE, R.H. BROCKETT, C.C. Effect of source, trehalose, hypotaurine, taurine and blood serum on survival of frozen bull sperm. **Cryobiology.** 30. 423-31. 1993.

[48] HOLT, W.V. NORTH, R.D. Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. **J. Reprod. Fert.** 91. 451-61. 1991.

[49] WOELDERS, H. MATTHIJIS, A. ENGEL, B. Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intacteness of bull sperm after freezing thawing. **Cryobiology.** 35. 93-105. 1997.

[50] TOSIC, P.H.; WALTON, A. Effects of egg yolk and its contituents on the respiration and fertilizing capacity of spermatozoa. **J. Agric Sci.** 37.69-76. 1946.

[51] PACE MM; GRAHAM EF. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. **J. Anim Sci.** 39. 1144-49. 1974.

[52] Statistix ®. Statistix for Windows User's manual. Tallahas-see: Analytical software; 2003.