

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

VIABILIDADE E FERTILIDADE DE SÊMEN OVINO  
CRIOPRESERVADO COM GLICEROL E DIMETILACETAMIDA  
ACRESCIDO DE TREALOSE E EDTA

RODRIGO FREITAS BITTENCOURT

BOTUCATU-SP

AGOSTO - 2009

UNIVERSIDADE UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

VIABILIDADE E FERTILIDADE DE SÊMEN OVINO  
CRIOPRESERVADO COM GLICEROL E DIMETILACETAMIDA  
ACRESCIDO DE TREALOSE E EDTA

RODRIGO FREITAS BITTENCOURT

Tese apresentada junto ao  
programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária, área  
Reprodução Animal, para  
obtenção do título de doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Eunice Oba

Nome do Autor: Rodrigo Freitas Bittencourt

Título: Viabilidade e fertilidade de sêmen ovino criopreservado com glicerol e dimetilacetamida acrescido de trealose e edta

### COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Eunice Oba  
Presidente e Orientadora  
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária  
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo  
Membro  
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária  
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa  
Membro  
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária  
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Rubens Paes Arruda  
Membro  
Departamento de Reprodução Animal  
FMVZ – USP – São Paulo

Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente  
Membro  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal  
FCAV - UNESP-Jaboticabal

Data da Defesa: 03 de Agosto de 2009

**À minha avó Maria Hildete Bittencourt;  
Ao meu avô Soares;  
Aos meus pais, Parísio e Etinete  
Bittencourt;  
Aos meus irmãos, Max e Karina  
Bittencourt;  
À minha noiva (em breve esposa), Marta  
Vasconcelos;**

***Com amor intenso, dedico***

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Eunice Oba, pelo exemplo como pessoa e como mestre. Ao teu lado no dia a dia, e teus exemplos de ser, saber e agir, pude experimentar de forma intensa, o meu crescimento como pessoa e pesquisador. Obrigado pela confiança dispensada, pelo carinho, preocupação e amizade. Levo momentos e ensinamentos para todo o sempre.

Ao Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo, pelos exemplos como mestre, confiança, paciência e os tantos conhecimentos passados. Minha admiração deixou de ser apenas pelo grande profissional que é, e transbordou nos horizontes do pessoal. Obrigado por tudo!

Ao Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa, agradeço pela possibilidade de ter acompanhado, mesmo que um pouco de longe, a sua forma de trabalhar, sua paixão pela pesquisa aplicada e pelo trabalho que executa, sempre com a busca incessante pela descoberta e ineditismo.

Aos docentes do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Maria Denise Lopes, João Carlos Pinheiro Ferreira, Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga, Marco Antônio Alvarenga e Cezinande de Meira pela receptividade, convívio tranquilo e conselhos sempre oportunos para a realização deste e demais trabalhos.

Aos funcionários Cristina, Márcio, Walter, Edílson bela eterna boa vontade comigo e pela amizade.

À amiga e cunhada Veridiana Silveira pela amizade sincera e ajuda incansável nos diversos momentos, difíceis e felizes. “Amigos para sempre...”.

Ao amigo Carmo Biscarde pelo apoio, amizade incondicional e muitas risadas proporcionadas.

Ao amigo Hymerson Azevedo pela amizade, confiança, incentivo, apoio e por proporcionar que o Experimento *in vivo* pudesse ser concretizado.

Aos colegas de Pós-Graduação: André, Bruna, Camila, Cely, Gabriel, Giovana, Guta, Heder, Ian, José Dellaqua, Jungiro, Luciana Leal, Leandro, Marcel, Marcio, Moisés, Nina e Viviane pelos ótimos momentos e amizade.

Às funcionárias da Pós-Graduação: Zé, Denise e Maria, pela atenção, paciência e boa vontade dispensadas.

À FAPESP pela concessão da Bolsa de Doutorado e financiamento do projeto.

À EMBRAPA Tabuleiros Costeiros por disponibilizar a estrutura, recursos humanos e animais necessários para a realização do Experimento *in vivo*.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

**Os meus sonhos nada mais são  
Do que objetivos a serem alcançados.  
Alguns estão a um passo,  
Outros, mais distantes,  
Além do horizonte.  
Distância pela qual  
Minhas pernas fortes me guiarão,  
Com paciência sim, mas com clareza.  
E se no caminho houver algo,  
Que o tempo me obste atingir  
Não tem problema.  
Meus sonhos são tão belos,  
Que do meu ofego,  
Farei descanso,  
E do meu suor,  
Farei vitória.  
(Autor desconhecido)**

**Aquele que nunca descansa,  
Aquele que almeja,  
De corpo e alma ao impossível,  
Esse é o vencedor.  
(Confúcio)**

## LISTA DE TABELAS:

**EXPERIMENTO 1: Viabilidade dos espermatozóides ovinos criopreservados com a utilização do glicerol em duas concentrações, em meio diluidor com e sem trealose, associada ou não ao EDTA.**

Tabela 1	Composição, pH e osmolaridade dos diferentes diluidores estudados (TRIS+GL3%, TRIS+GLI6%, TRIS+GLI3%+TRE, TRIS+GLI6%+TRE, TRIS+GLI3%+TRE+EDTA, TRIS+GLI6%+TRE+EDTA).	33
Tabela 2	Médias e desvios-padrão dos parâmetros subjetivos da cinética espermática no sêmen <i>In natura</i> e pós-descongelção, nos diferentes diluidores estudados (TRIS+GL3%, TRIS+GLI6%, TRIS+GLI3%+TRE, TRIS+GLI6%+TRE, TRIS+GLI3%+TRE+EDTA, TRIS+GLI6%+TRE+EDTA).	40
Tabela 3	Médias e desvios-padrão dos índices de viabilidade espermática, avaliados pelo teste supravital (SV) no sêmen <i>In natura</i> e pós-descongelção, nos diferentes diluidores estudados (TRIS+GLI3%, TRIS+GLI6% TRIS+GLI3%+TRE, TRIS+GLI3%+TRE, TRIS+GLI3%+TRE+EDTA, TRIS+GLI6%+TRE+EDTA).	43
Tabela 4	Médias e desvios-padrão dos parâmetros de cinética espermática pós-descongelção, obtidos através da análise computadorizada, nos diferentes diluidores estudados (TRIS+GL6%, TRIS+GLI3%, TRIS+GLI6% TRIS+GLI3%+TRE, TRIS+GLI3%+TRE, TRIS+GLI3%+TRE+EDTA, TRIS+GLI6%+TRE+EDTA).	45
Tabela 5	Médias e desvios-padrão das frequências das subpopulações espermáticas (SBP), obtidas através da combinação das sondas fluorescentes aglutinina de <i>Pisum sativum</i> conjugada à fluoresceína de isotiocianato - FITC-PSA), potencial da membrana mitocondrial (PMM, iodeto de 5,5',6,6'tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina - JC-1), nos diferentes diluidores estudados (TRIS+GL6%, TRIS+GLI3%, TRIS+GLI6% TRIS+GLI3%+TRE, TRIS+GLI3%+TRE, TRIS+GLI3%+TRE+EDTA, TRIS+GLI6%+TRE+EDTA).	51
Tabela 6	Médias e desvios-padrão das frequências de espermatozóides com membrana plasmática (IMP) e acrossomal íntegras (IAC) e com alto potencial da membrana mitocondrial (PMM), obtidas através da combinação das sondas fluorescentes iodeto de proprídio, aglutinina de <i>Pisum sativum</i> conjugada à fluoresceína de isotiocianato - FITC-PSA) e iodeto de 5,5',6,6'tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina - JC-1), nos diferentes diluidores estudados (TRIS+GL3%, TRIS+GLI6%, TRIS+GLI3%+TRE, TRIS+GLI6%+TRE, TRIS+GLI3%+TRE+EDTA, TRIS+GLI6%+TRE+EDTA).	58

Tabela 7	Coeficientes de correlação verificados entre os parâmetros de cinética espermática .....	63
Tabela 8	Coeficientes de correlações observados entre os parâmetros de cinética espermática e os de integridade das membranas espermáticas. ....	65
Tabela 9	Coeficientes de correlações observados entre os parâmetros de integridade das membranas espermáticas. ....	67

**EXPERIMENTO 2: Viabilidade dos espermatozóides ovinos criopreservados com a utilização da dimetilacetamida em duas concentrações, em meio diluidor com e sem trealose, associada ou não ao EDTA**

Tabela 1	Composição, pH e osmolaridade dos diferentes diluidores estudados (TRIS+GLI%, TRIS+DMA3%, TRIS+DMA6%, TRIS+DMA3%+TRE, TRIS+DMA6%+TRE, TRIS+DMA3%+TRE+EDTA, TRIS+DMA6%+TRE+EDTA). ....	83
Tabela 2	Médias e desvios-padrão dos parâmetros subjetivos da cinética espermática no sêmen <i>In natura</i> e pós-descongelção, nos diferentes diluidores estudados (TRIS+GL6%, TRIS+DMA3%, TRIS+DMA6%, TRIS+DMA3%+TRE, TRIS+DMA6%+TRE, TRIS+DMA3%+TRE+EDTA, TRIS+DMA6%+TRE+EDTA). ....	89
Tabela 3	Médias e desvios-padrão dos parâmetros de cinética espermática pós-descongelção, obtidos através da análise computadorizada, nos diferentes diluidores estudados (TRIS+GL6%, TRIS+DMA3%, TRIS+DMA6%, TRIS+DMA3%+TRE, TRIS+DMA6%+TRE, TRIS+DMA3%+TRE+EDTA, TRIS+DMA6%+TER+EDTA). ....	91
Tabela 4	Médias e desvios-padrão dos índices de viabilidade espermática, avaliados pelo teste supravital (SV) no sêmen <i>In natura</i> e pós-descongelção, nos diferentes diluidores estudados (TRIS+GL6%, TRIS+DMA3%, TRIS+DMA6%, TRIS+DMA3%+TRE, TRIS+DMA6%+TRE, TRIS+DMA3%+TRE+EDTA, TRIS+DMA6%+TRE+EDTA). ....	92



Tabela 5	Médias e desvios-padrão das frequências de espermatozóides com membrana plasmática (IMP) e acrossomal íntegras (IAC) e com alto potencial da membrana mitocondrial (PMM), obtidas através da combinação das sondas fluorescentes iodeto de proprídio, aglutinina de <i>Pisum sativum</i> conjugada à fluoresceína de isotiocianato - FITC-PSA) e iodeto de 5,5',6,6'tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina - JC-1), nos diferentes diluidores estudados (TRIS+GL6%, TRIS+DMA3%, TRIS+DMA6%, TRIS+DMA3%+TRE; TRIS+DMA3%+TRE, TRIS+DMA3%+TRE+EDTA, TRIS+DMA6%+TRE+EDTA). .....	94
Tabela 6	Coeficientes de correlações observados entre os parâmetros de cinética espermática e os de integridade das membranas espermáticas. ....	96

### **EXPERIMENTO 3: Viabilidade e fertilidade dos espermatozóides ovinos criopreservados com a utilização do glicerol e da dimetilacetamida, em meio diluidor com e sem trealose.**

Tabela 1	Composição, pH e osmolaridade dos diferentes diluidores estudados (TRIS+GLI%, TRIS+GLI%+TRE, TRIS+DMA3%, TRIS+DMA3%+TRE). .....	127
Tabela 2	Médias e desvios-padrão dos parâmetros subjetivos da cinética espermática no sêmen <i>In natura</i> e pós-descongelção, nos diferentes diluidores estudados (TRIS+GL6%, TRIS+GL6%+TRE, TRIS+DMA3%, TRIS+DMA3%+TRE). .....	139
Tabela 3	Médias e desvios-padrão dos parâmetros de cinética espermática pós-descongelção, obtidos através da análise computadorizada, nos diferentes diluidores estudados (TRIS+GL6%, TRIS+GL6%+TRE, TRIS+DMA3%, TRIS+DMA3%+TRE). .....	140
Tabela 4	Médias e desvios-padrão dos índices de viabilidade espermática, avaliados pelo teste supravital (SV) no sêmen <i>In natura</i> e pós-descongelção, nos diferentes diluidores estudados (TRIS+GL6%, TRIS+GL6%+TRE, TRIS+DMA3%+TRE). .....	141
Tabela 5	Médias e desvios-padrão das frequências de espermatozóides com membrana plasmática (IMP) e acrossomal íntegras (IAC) e com alto potencial da membrana mitocondrial (PMM), obtidas através da combinação das sondas fluorescentes iodeto de proprídio, aglutinina de <i>Pisum sativum</i> conjugada à fluoresceína de isotiocianato - FITC-PSA) e iodeto de 5,5',6,6'tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina - JC-1), nos diferentes diluidores estudados (TRIS+GL6%, TRIS+GL6%+TRE, TRIS+DMA3%, TRIS+DMA3%+TRE) .....	143

Tabela 6	Médias e desvios-padrão do dano de DNA, mensuradas através do <i>tail intensity</i> (TINT, %) e <i>tail moment</i> (TMOM, %) em espermatozóides ovinos, obtidos através da sonda fluorescente Syber Gold, nos diferentes diluidores estudados (TRIS+GL6%, TRIS+GL6%+TRE, TRIS+DMA3%, TRIS+DMA3%+TRE) e nos controles positivo (CPOS) e negativo (CNEG). .....	145
Tabela 7	Taxa de prenhez das fêmeas inseminadas com sêmen congelado nos diferentes diluidores experimentais (TRIS+GL6%, TRIS+GL6%+TRE, TRIS+DMA3%, TRIS+DMA3%+TRE). .....	147
Tabela 8	Taxa de prenhez das fêmeas inseminadas pelos diferentes inseminadores. ....	148
Tabela 9	Coefficientes de correlações observados entre os parâmetros de cinética espermática e os de integridade das membranas espermáticas e DNA. ....	149

#### **ANEXO I: RESUMOS DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA – EXPERIMENTO 1**

Tabela 1	Resumo da análise de variância dos parâmetros da avaliação subjetiva e computadorizada da cinética espermática do sêmen ovino <i>In natura</i> e/ou congelado, tendo como fonte de variação os tratamentos e os carneiros. ....	191
Tabela 2	Resumo da análise de variância dos parâmetros da avaliação da integridade da membrana plasmática pelo teste supravital com eosina (SV), integridade das membranas plasmática (IMP) e acrossomal (IAC), potencial da membrana mitocondrial espermática (PMM) do sêmen ovino <i>In natura</i> e/ou congelado, tendo como fonte de variação os tratamentos e os carneiros .....	192

#### **ANEXO II: RESUMOS DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA – EXPERIMENTO 2**

Tabela 4	Resumo da análise de variância dos parâmetros da avaliação subjetiva e computadorizada da cinética espermática do sêmen ovino <i>In natura</i> e/ou congelado, tendo como fonte de variação os tratamentos e os carneiros. ....	193
Tabela 5	Resumo da análise de variância dos parâmetros da avaliação da integridade da membrana plasmática pelo teste supravital com eosina (SV), integridade das membranas plasmática (IMP) e acrossomal (IAC), potencial da membrana mitocondrial espermática (PMM) do sêmen ovino <i>In natura</i> e/ou congelado, tendo como fonte de variação dos tratamentos e os carneiros. ....	194

**ANEXO III: RESUMOS DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA – EXPERIMENTO 3**

- Tabela 6 Resumo da análise de variância dos parâmetros da avaliação subjetiva e computadorizada da cinética espermática do sêmen ovino *In natura* e/ou congelado, tendo como fonte de variação os tratamentos e os carneiros. .... 195
- Tabela 7 Resumo da análise de variância dos parâmetros da avaliação da integridade da membrana plasmática pelo teste supravital com eosina (SV), integridade das membranas plasmática (IMP) e acrossomal (IAC), potencial da membrana mitocondrial espermática (PMM) integridade do DNA (TINT e TMOM) *In natura* e/ou congelado, tendo como fonte de variação os tratamentos e os carneiros. .... 196

## LISTA DE FIGURAS:

**EXPERIMENTO 1: Viabilidade dos espermatozóides ovinos criopreservados com a do glicerol em duas concentrações, em meio diluidor com e sem trealose, associada ou não ao EDTA.**

Figura 1	Reprodutores utilizados como doadores de sêmen para as congelações experimentais. ....	30
Figura 2	A: Laboratório de manipulação e processamento do sêmen da Tertúlia Central Genética; B: Teste supravital observado em microscopia óptica, com aumento de 400x. Setas pretas indicando espermatozóides corados de vermelho com lesão da membrana plasmática e setas azuis indicando os espermatozóides não corados, com membrana íntegra. ....	33
Figura 3	A: Analisador de sêmen modelo IVOS 12 do Laboratório de Estudos em Biotecnologia Aplicada aos Pequenos Ruminantes; B: Diversas categorias de espermatozóides sob microscopia de epifluorescência (1000x), em filtro I3 (excitação BP 450-490 e supressão LP515). ....	35
Figura 4	Fluxograma das etapas de avaliação do sêmen pós descongelação. ....	37
Figura 5	Subpopulações espermáticas (SBP) obtidas na avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial do espermatozóide ovino, visualizadas sob microscopia de epifluorescência (1000x), pelo uso simultâneo da aglutinina de <i>Pisum sativum</i> conjugada à fluoresceína de isotiocianato - FITC-PSA), potencial da membrana mitocondrial (PMM, iodeto de 5,5',6,6'tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina - JC-1). ....	53

**EXPERIMENTO 3: Viabilidade e fertilidade dos espermatozóides ovinos criopreservados com a utilização do glicerol e da dimetilacetamida, em meio diluidor com e sem trealose.**

Figura 1	Reprodutores utilizados como doadores de sêmen para as congelações experimentais na EMBRAPA Tabuleiros Costeiros-SE. ....	124
Figura 2	Colheita e avaliação do sêmen pré-congelação. A: À esquerda área externa do laboratório de avaliação e manipulação de sêmen da Fazenda Queimadas e à direita o aprisco onde eram realizadas as colheitas de sêmen; B: Área interna do Laboratório de manipulação de sêmem; C: Fêmea contida utilizada como manequim para colheita de sêmen; D: Colheita de sêmen através da vagina artificial. ....	125
Figura 3	Microscópio de fluorescência Axioplan II .....	131

Figura 4	A: Fêmeas utilizadas no experimento, nos currais de manejo da EMBRAPA Tabuleiros Costeiros-SE; B: Observação da receptividade das fêmeas à monta dos rufiões com criptorquidia bilateral. ....	132
Figura 5	Representação esquemática do protocolo de sincronização do estro e ovulação utilizado no Experimento. ....	134
Figura 6	Equipamentos e etapas da Inseminação Artificial por Laparoscopia. A: Acima fonte de luz e abaixo trocater, estilete e bastão de manipulação; B: Laparoscópio de 5mm mantido embebido em solução anti-séptica entre as inseminações; C: Anestesia local; D: Incisões para inserção dos trocater; E: Pesquisa pelos cornos uterinos; F: Introdução do aplicador seminal e administração da dose inseminante bilateral. ....	135
Figura 7	Teste do cometa em espermatozóides de ovinos, apresentando maiores e menores graus de lesão de DNA, em microscopia de fluorescência com aumento de 400x e uso do corante Syber Gold. ....	146

## LISTA DE QUADROS

## ANEXO IV

Quadro 1.	<i>Set Up</i> do Ivos 12 (Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, EUA) .....	197
Quadro 2	Solução de PBS: Barth & Oko (1989) .....	198
Quadro 3	Solução de Glutaraldeído a 0,2% (Barth & Oko, 1989) .....	198
Quadro 4	Solução Iodeto de proprídio .....	199
Quadro 5	Solução de JC-1 .....	199
Quadro 6	Solução de FITC-PSA .....	200

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	01
<b>ABSTRACT</b>	02
 <b>CAPÍTULO 1</b>	
1	<b>INTRODUÇÃO</b> ..... 04
2.	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> ..... 06
2.1.	Diluidores de congelação ..... 06
2.1.1	Diluidores convencionais ..... 07
2.1.2	Diluidores a base de lecitina de soja ..... 08
2.2.	Crioprotetores ..... 09
2.2.1	Crioprotetores penetrantes ..... 10
2.2.2	Crioprotetores não penetrantes ..... 14
2.2.2.1	Albumina sérica bovina - BSA ..... 16
2.2.2.2	Trealose ..... 16
2.3.	Aditivos utilizados no meio de congelação ..... 19
2.3.1	Quelante de cálcio EDTA ..... 19
2.3.2.	Emulsificantes ..... 21
2.3.3.	Antioxidantes ..... 22
 <b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>EXPERIMENTO 1: Viabilidade dos espermatozóides ovino criopreservados com a utilização do glicerol em duas concentrações, em meio diluidor com e sem trealose, associada ou não ao EDTA.</b>	
	Resumo ..... 27
	Abstract ..... 28
1.	Introdução ..... 29
2.	MATERIAIS E MÉTODOS ..... 30
3.	RESULTADOS E DISCUSSÕES ..... 39
4.	CONCLUSÕES ..... 68
5	REFERÊNCIAS ..... 69

### CAPÍTULO 3

#### **EXPERIMENTO 2: Viabilidade dos espermatozóides ovinos criopreservados com a utilização da dimetilacetamida em duas concentrações, em meio diluidor com e sem trealose, associada ou não ao ao EDTA.**

	Resumo .....	77
	Abstract .....	78
1.	Introdução .....	79
2.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	80
3.	RESULTADOS .....	88
4.	DISCUSSAO .....	97
5.	CONCLUSÕES .....	108
6.	REFERÊNCIAS .....	110

### CAPÍTULO 4

#### **EXPERIMENTO 3: Viabilidade *in vitro* e fertilidade *in vivo* dos espermatozóides ovinos criopreservados com a utilização do glicerol e da dimetilacetamida, em meio diluidor com e sem trealose.**

	Resumo .....	118
	Abstract .....	119
1.	Introdução .....	120
2.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	123
3.	RESULTADOS .....	138
4.	DISCUSSÃO .....	150
5.	CONCLUSÕES .....	163
6.	REFERÊNCIAS .....	165
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE OS ARTIGOS .....</b>	<b>172</b>
	<b>ÚLTIMAS CONSIDERACOES .....</b>	<b>174</b>
	<b>REFERÊNCIAS GERAIS .....</b>	<b>175</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>191</b>



Bittencourt, R.F. Viabilidade e fertilidade de sêmen ovino criopreservado com glicerol e dimetilacetamida acrescido de trealose e EDTA. Botucatu, 2009. 201p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia e o efeito dos crioprotetores glicerol (GLI) e dimetilacetamida (DMA) em duas concentrações (3 e 6%), em meio diluidor com e sem trealose (TRE), associada ou não ao EDTA, sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento. Para tanto, foram utilizadas quarenta e nove amostras de sêmen de 20 carneiros da raça Santa Inês. Os estudos foram divididos em três experimentos. O primeiro comparou as duas concentrações de GLI em meio com ou sem a TRE, associada ou não ao EDTA. O segundo experimento avaliou a DMA em duas concentrações (3 e 6%) em meio com ou sem TRE, associada ou não ao EDTA. O terceiro experimento testou os dois diluidores com os melhores resultados *in vitro* no experimento 1 e os dois do experimento 2. Todos os experimentos tiveram os parâmetros da cinética espermática avaliados subjetivamente e pela análise computadorizada (CASA). A análise da viabilidade espermática foi realizada através da associação das sondas fluorescentes iodeto de proprídio, JC-1 e FITC-PSA. Para a análise estatística das características avaliadas, foi empregado o programa estatístico (SAS), versão 5.0 (1996). A DMA a 6% apresentou toxicidade e a 3% demonstrou baixo efeito crioprotetor sobre o espermatozóide ovino. A adição da TRE promoveu efeito negativo sobre a cinética espermática, entretanto melhorou os níveis de integridade das membranas espermáticas pós-descongelamento. O diluidor com GLI a 6% sozinho foi o protocolo mais eficaz para a manutenção da integridade espermática, entretanto a taxa de prenhez das fêmeas não diferiu entre os grupos.

**Palavras-chave:** Ovinos, sêmen, criopreservação, glicerol, dimetilacetamida, trealose, EDTA.

BITTENCOURT, R.F. Viability and fertility of ram semen cryopreserved with glycerol and dimethyl acetamide, with trehalose and EDTA. Botucatu, 2009. 201p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the efficacy and the effect of the cryoprotectants glycerol (GLY) and dimethyl acetamide (DMA) in two grades (3 and 6%) in extender with and without trehalose (TRE) extender associated or not with EDTA, on the post-thawing sperm viability. For that, they were used forty nine semen samples of 20 rams of the Santa Inês breed. The studies were divided into three experiments. The first one compared the two GLY grades (3 and 6%) in extender with or without TRE, associated or not with EDTA. The second experiment evaluated the DMA at two concentrations (3 e 6%) in medium with or without TRE, associated or not with EDTA. The third one tested the two extenders with the best *in vitro* results in experiment 1 and the two from experiment 2. All experiments had the kinetics sperm parameters evaluated subjectively and by computer analysis (CASA). The sperm viability evaluation was performed through the multiple sperm parameter staining with propidium iodide, JC-1 and FITC-PSA. For the statistical analysis of the characteristics evaluated was used the statistical package (SAS), version 5.0 (1996). The DMA at 6% was toxic and at 3% had a poor cryoprotective effect for ram semen. The addition of TRE promoted negative effect on sperm kinetics, entertain improved levels of sperm membranes integrity post-thawing. The extender with GLI at 6% alone was the best protocol for maintaining the sperm integrity, however the pregnancy rates of the ewes did not present difference ( $P>0.05$ ) among the groups.

**Key words:** Ovine, semen, cryopreservation, glycerol, dimethy acetamide, trehalose, EDTA

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo dados do IBGE (2006) o rebanho ovino do Brasil, é de 13.856.747 de cabeças, com o maior número na região Nordeste (7.752.139), seguido pela região Sul (3.998.753). Em quarto lugar está a região Sudeste que passou de 399.925 cabeças em 2001, para 763.617 em 2006. O estado de São Paulo com o maior rebanho da região Sudeste (460.746) representa 60,3% destes ovinos (IBGE, 2006). Do ano de 2003, quando o rebanho ovino era de apenas 287.722 animais (IBGE, 2003), até o ano de 2006 (IBGE, 2006), com o aquecimento da ovinocultura na região e no Brasil, o estado registrou neste período um avanço de 62,4% no número de cabeças, mais de 20% ao ano.

Apesar do crescimento da ovinocultura no Brasil, em número de animais, a produção de carne ovina e seus subprodutos ainda encontram-se abaixo da demanda do mercado interno, com o volume de importações crescendo a cada ano. Para o abastecimento do mercado interno, o Brasil importou em 2006 7,1 mil toneladas de carne ovina, cinquenta por cento a mais que no ano de 2005. A maioria das importações é oriunda do Uruguai, que tem conseguido colocar seu produto no País a um preço relativamente menor do que o praticado no mercado interno (TURINO, 2008). Esta demanda crescente pelos subprodutos de ovinos no país evidencia o potencial da ovinocultura em fornecer retorno econômico para o investidor brasileiro (VIANA e BORGES, 2005).

De uma forma geral, a caprinovinocultura tem aumentado sua participação no agronegócio brasileiro e mundial. E para aumentar a produtividade da espécie ovina, torna-se necessário maximizar o seu potencial biológico, através de programas de reprodução programada, que podem promover o melhoramento genético e como consequência, o aumento dos índices produtivos dos ovinos.

Dentre as biotécnicas da reprodução, a inseminação artificial (IA) é aquela que propicia maior amplitude de resultados nos programas de melhoramento animal. E o advento do sêmen congelado trouxe uma nova dimensão para a IA, possibilitando, de forma maximizada, o melhoramento genético dos rebanhos, pela habilidade em produzir uma enorme progênie por macho e, em diversos lugares ao mesmo tempo (LEBOEUF et al., 1998). Além disso, criar a possibilidade da manipulação e armazenamento de material genético (LEBOEUF et al., 2000). Essa característica é necessária para criar e difundir o melhoramento genético das raças e facilitando a

aplicação das recentes técnicas de genética molecular, em programas de seleção animal (LEBOEUF et al., 1998).

O crescimento da inseminação artificial tem ocorrido paralelamente ao desenvolvimento da tecnologia para utilização de sêmen congelado, cujo uso tem sido limitado devido os baixos índices de fertilidade conseguidos com a inseminação intracervical nos ovinos (MAXWELL e WATSON, 1996).

Nesses últimos 50 anos, desde o primeiro relato mundial de congelação do sêmen ovino (ARAÚJO, 1955), os investimentos nessa tecnologia têm sido vultuosos, porém, a solução ideal para o uso do sêmen congelado nessa espécie ainda não foi obtida, nem se popularizou com resultados repetíveis (MORAES, 2003). Isso devido à maior sensibilidade do sêmen à congelação e às características anatomofisiológicas peculiares das fêmeas dessa espécie, que dificultam a inseminação transcervical, propocionando baixos índices de fertilidade quando essa técnica é utilizada. No entanto, a necessidade de um melhor aproveitamento genético de reprodutores e o alto valor comercial dos mesmos vem servindo de impulso para o melhoramento da técnica (NEVES et al., 1986).

Os baixos índices de fertilidade das fêmeas inseminadas com sêmen descongelado podem ser melhorados com os avanços positivos alcançados na técnica de inseminação transcervical (CARNEIRO et al., 2005; SILVA et al., 2005 a; SILVA et al., 2005 b) e, principalmente, com as melhorias que ainda podem ser implementadas na técnica de congelação de sêmen (AISEN et al., 2005).

Alguns autores consideram que o sucesso da utilização de sêmen congelado em programas de inseminação artificial, necessita do desenvolvimento de diluidores e protocolos mais eficazes e que melhorem a taxa de gestação das fêmeas inseminadas (VALLERIOTE et al., 2005; AISEN et al., 2005).

Assim, este trabalho foi desenvolvido com objetivos de testar a efiácia de dois crioprotetores penetrantes, o glicerol e a dimetilacetamida, em duas concentrações (3 e 6%) e avaliar o efeito destes, em meio hiperosmótico enriquecido com trealose ou desta associada ao EDTA, sobre a criopreservação do espermatozóide ovino. Para avaliação do *status* morfofuncional dos espermatozóides pós-descongelação foram utilizadas análises subjetivas e computadorizada da cinética celular, viabilidade celular através do corante eosina, microscopia de fluorescência para avaliação da integridade das membranas espermáticas e do DNA, e por último foi empregado o teste de fertilidade *in vivo*.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

Alguns autores consideram que os índices de fertilidade do sêmen ovino congelado ainda podem ser implementados com mudanças, principalmente, nos aspectos que envolvem a técnica de criopreservação do sêmen da espécie ovina, como por exemplo, o desenvolvimento de diluidores melhorados (AISEN et al., 2005; SALLES, 2005).

### **2.1. Diluidores de congelação**

Em geral, o diluidor de congelação apropriado deve promover uma pressão osmótica compatível com a do sêmen e essa depende dos ingredientes no meio e da taxa de eletrólitos e não-eletrólitos; balanço apropriado de elementos minerais, já que há indícios de que o nível de eletrólitos e não-eletrólitos pode ter um efeito significativo sobre a fertilidade; combinação apropriada de nutrientes, para o fornecimento adequado de energia aos espermatozóides e manutenção da motilidade; neutralização de produtos tóxicos produzidos pelos espermatozóides, como o ácido láctico e, equilíbrio do pH do meio; proteção contra mudanças de temperatura, especialmente contra o frio; estabilização dos sistemas enzimáticos e integridade das membranas conferida por macromoléculas que estabilizarão as membranas e minimizarão o vazamento de íons e enzimas (AMANN e PICKET, 1987).

A diluição do sêmen também é importante por permitir um tratamento efetivo do sêmen com antibióticos, minimizando a possibilidade de transmissão de patógenos ou de organismos potencialmente patogênicos, prolongar a sobrevivência dos espermatozóides e protegê-los de condições ambientais desfavoráveis, aumentar o volume do ejaculado, reduzindo os efeitos tóxicos dos subprodutos do metabolismo espermático, e possibilitar a avaliação apropriada da motilidade espermática individual, evitando, ao mesmo tempo, a aglutinação dos espermatozóides.

### 2.1.1. Diluidores convencionais

Os diluidores usados para a preservação do sêmen ovino, ou de outras espécies, de forma geral devem ter pH adequado e capacidade de proteção e manutenção, osmolaridade adequada, e deve proteger o espermatozóide de injúrias criogênicas (SALAMON e MAXWELL, 2000).

Diversos diluidores de congelação do sêmen ovino têm sido testados e utilizados: os mais comuns são os a base de glicina-gema, glicina-gema-leite (GONZALEZ et al., 1999), água de côco (NUNES, 1998), a base de citrato-açúcar-gema, leite ou leite desnatado, lactose, sacarose, rafinose e os formulados a base de tris-gema de ovo (SALAMON e MAXWELL, 2000).

O diluidor formulado a partir da gema de ovo é o mais utilizado para a preservação do sêmen ovino e advém de um diluidor formulado para congelação do sêmen bovino (FOOT et al., 1964; DAVIS et al., 1963), que vem sendo usado rotineiramente para a espécie ovina.

El-Alamy et al. (2001) em trabalho com ovinos, ao compararam a eficácia dos meios diluidores tris gema de ovo e leite integral, não encontraram diferenças significativas para os parâmetros espermáticos avaliados pós-descongelação. No entanto, Gil et al. (2000b) demonstraram melhores índices de viabilidade espermática quando o sêmen ovino foi congelado em meio à base de leite de vaca e suplementado com quantidades reduzidas de gema de ovo (5%), comparado ao sêmen congelado com meio tris e 20% gema de ovo. De fato, ao suplementarem o meio a base de leite, com diferentes concentrações de gema (5, 10, 15 e 20%). Gil et al. (2003b) não encontraram efeito benéfico com a utilização da gema em quantidades superiores a 10%.

D'Alessandro et al. (2001) verificaram que a eficácia do diluidor estava relacionada à concentração espermática na dose inseminante, obtendo melhores índices de congelabilidade do sêmen ovino com o diluidor a base de lactose leite-gema em maiores concentrações espermáticas ( $100-500 \times 10^6$  espermatozóides/0,25mL), enquanto o meio tris frutose gema obteve melhores resultados em menores concentrações espermáticas ( $50 \times 10^6$  espermatozóides/0,25mL).

### 2.1.2. Diluidores a base de lecitina de soja

Os aditivos de origem animal (gema-de-ovo e leite), comumente adicionados a diluidores de congelação de sêmen, representam um risco potencial para a contaminação do diluidor, caso certos contaminantes (microbianos ou outros) estejam no produto *in natura*. Além desse fato, também há uma falta de controle da qualidade desses aditivos, devido à grande variação da composição dos mesmos (GIL et al., 2003).

De fato, Bousseau et al. (1998) ao realizarem análises microbiológicas em dois diluidores de congelação de sêmen comerciais, adicionados de gema de ovo ou esta associada ao leite, demonstraram que todas as amostras estudadas (n=17), mesmo na presença de associações de antibióticos de larga ação (penicilina, estreptomicina, lincomicina, espectinomicina ou gentamicina, tilosina, lincomicina e espectinomicina) encontravam-se com contaminação moderada (10-60 CFU/mL) de agentes bacterianos ou destes associados à mycoplasma. Este fator, associado à falta de padronização desses aditivos, que podem apresentar grande variação nas suas composições (GIL et al., 2003b) estimularam o desenvolvimento de diluidores comerciais formulados a base de lecitina de soja, como uma alternativa à utilização da gema de ovo e do leite (Biociphos® and Bioexcell®, IMV, L'Aigle, France) e com índices de fertilidade semelhantes àqueles do sêmen de bovinos e ovinos criopreservados com os meios convencionais (FUKUY et al., 2008; GIL et al., 2003a; GIL et al., 2000a).

Apesar dos resultados positivos obtidos com a utilização dos meios a base de lecitina de soja para a congelação do sêmen ovino e bovino, Bittencourt et al. (2008) encontraram baixos índices de congelabilidade do sêmen de caprinos, ao utilizar o meio Bioexcell®. Os autores relataram taxas de motilidade espermática de 27% com este diluidor, valor inferior ( $P < 0,05$ ) ao observado com o diluidor tris gema (47%) no mesmo trabalho, e inferior também aos 56% de motilidade espermática relatados por Gil et al. (2003a). Contudo, é importante ressaltar as diferenças na metodologia empregada para a congelação do sêmen. Esses últimos utilizaram a metodologia rotineiramente empregada na Suécia com a diluição do sêmen em duas etapas, adicionando a fração do diluidor com glicerol somente após o resfriamento do sêmen a temperatura de 5°C, tanto para o diluidor Bioexcell quanto para o leite-gema de ovo. No estudo desenvolvido por Bittencourt et al. (2008), para todos os grupos



experimentais foi utilizado o método de diluição em uma etapa, já com a concentração final de glicerol, inclusive para o Bioexcell, já que esta é a forma na qual é feita a sua comercialização no Brasil. Esse fato sugere que melhores resultados com a utilização do Bioexcell® para a congelação do sêmen poderiam ser obtidos empregando-se a diluição em duas etapas.

Gil et al. (2003a) compararam a eficácia do Bioexcell®, em relação a um diluidor convencional, a base de leite-gema de ovo, para a criopreservação do sêmen ovino. O estudo verificou índices de fertilidade semelhantes entre as ovelhas inseminadas com o sêmen congelado nos diferentes protocolos.

Taxas de fertilidade semelhantes ( $P>0,05$ ) também foram observadas por Fukuy et al. (2008) após inseminação das ovelhas com o sêmen congelado em meio tris gema (64%), BSA (58%) e a base de lecitina (56%) (Andromed®, Minitub, Tiefenbach, Alemanha). Em trabalho posterior, a mesma equipe (HIWASA et al., 2009), após superovulação das ovelhas, obtiveram bons índices de estruturas fertilizadas (81%) e taxa de prenhez (72%), após inseminação laparoscópica em tempo fixo com sêmen congelado com o Andromed®.

Gil et al. (2003a) ressaltam que o diluidor a base de lecitina de soja, sem aditivos de origem animal, pode ser uma alternativa segura quando o sêmen congelado for utilizado para a introdução de material genético em um novo rebanho e, principalmente, em um outro país, minimizando os riscos de veiculação de patógenos.

## **2.2. Crioprotetores**

Agentes crioprotetores são essenciais para a criopreservação de quase todos sistemas biológicos (FAHY, 1986). A primeira descrição do uso de crioprotetores para a criopreservação é originada de Maxinov (1908) apud Salamon e Maxwell (1995) que observou que uma população parcial, de tecidos e células de plantas suspensas em soluções contendo glicerol, sobreviveu a congelação à 22°C negativos.

Esses agentes devem ser adicionados aos diluidores seminais para possibilitarem a sobrevivência dos espermatozoides durante o processo de congelação e descongelação (AMANN e PICKET, 1987). Estes componentes são

classificados como penetrantes, quando exercem sua ação crioprotetora dentro da célula ou não penetrantes, cuja atividade de crioproteção ocorre fora da célula.

### **2.2.1. Crioprotetores penetrantes**

Entre os crioprotetores penetrantes, o glicerol é o mais frequentemente utilizado para os espermatozóides, desde a demonstração da sua eficácia (SMITH e POLGE et al., 1950), e têm ação tanto intracelular como extracelular na proteção das estruturas celulares. O efeito protetor do glicerol é atribuído a sua propriedade coligativa ou de ligação com a água (SALOMON e MAXWELL, 1995), reduzindo a temperatura de congelação do meio intracelular (HAMMERSTEDT et al. 1990), prevenindo a formação de cristais de gelo. Também aumenta o volume de canais de solventes descongelados, dilui as altas concentrações de sais (SQUIRES et al., 1999) e diminui a pressão osmótica do meio resfriado (SALAMON e MAXWELL, 1995).

O glicerol tem sido o crioprotetor mais usado para a congelação de sêmen ovino. Para o sêmen congelado através do método convencional lento e com o uso, principalmente, de diluidores hipertônicos, a maioria dos estudos demonstra que as melhores concentrações de glicerol encontram-se entre 6% a 8% e para a congelação espermática rápida, pelo método de “pellets”, melhores taxas de sobrevivência espermática são atingidas com 3 a 4% de glicerol no diluidor (SALAMON e MAXWELL, 2000).

Apesar do glicerol ser o crioprotetor mais utilizado nos diluidores de congelação do sêmen ovino, alguns autores afirmam que a sua atividade crioprotetora sobre o espermatozóide é prejudicada pelo seu efeito negativo sobre a viabilidade e fertilidade pós-descongelação (FAHY, 1986). Seus efeitos deletérios aos espermatozóides incluem estresse osmótico, mudanças na organização, fluidez e permeabilidade da membrana plasmática, assim como desorganização da sua composição lipídica (WATSON, 1995).

Devido à toxicidade do glicerol alguns autores têm preferido fazer a adição do glicerol somente após o resfriamento do sêmen à temperatura de 5°C (FISER e FAIRFULL, 1989), realizando a diluição em duas etapas. Porém, nos dias atuais, a diluição em uma etapa é geralmente utilizada com bons resultados, e não há

nenhuma evidência convincente que suporte a necessidade da utilização do procedimento mais complicado, que é a diluição em duas etapas (SALAMON e MAXWELL, 2000).

Esse efeito tóxico do glicerol tem acarretado a pesquisa e utilização de outras substâncias, classificadas como crioprotetores intracelulares, em diluidores de congelação de sêmen ovino.

Outros crioprotetores internos incluem os do grupo de rápida penetração, o etilenoglicol, propanodiol e o dimetil sulfóxido (DMSO), que têm menores pesos moleculares que o glicerol, e agem protegendo o espermatozóide, provavelmente, através do mesmo mecanismo que o glicerol (MOLÍNIA et al., 1994a). Estes autores estudaram a eficiência desses crioprotetores, sozinhos ou em diversas associações, na criopreservação do espermatozóide ovino. Inicialmente verificou-se a ineficácia do DMSO, como crioprotetor do espermatozóide ovino. Também foi verificado que, apesar do etilenoglicol e do propanodiol exercerem atividade crioprotetora sobre os espermatozóides, o glicerol sozinho na concentração de 6%, obteve os melhores resultados tanto na motilidade pós-descongelação, quanto na percentagem de acrossomas intactos.

Os álcoois poliidrícos ou polióis, que são estruturalmente semelhantes ao glicerol, também, foram estudados na crioproteção do espermatozóide ovino por Molínia et al. (1994b), sozinhos ou associados ao glicerol. Esses autores, porém, concluíram que o glicerol, sozinho (6%), foi mais eficaz que os polióis estudados (adenitol, inositol, manitol, sorbitol e xilitol), tanto nas associações, quanto sozinhos.

Molínia et al. (1994a) ainda citaram que o melhor desempenho do glicerol está ligado à existência de uma interação entre esse e a membrana plasmática do espermatozóide ovino, o que não acontece com os outros crioprotetores penetrantes. Os autores também afirmam que a afinidade dos crioprotetores pela água, é a principal característica dos solutos que protegem as células vivas das temperaturas a baixo do ponto de congelação, e que essa estreita afinidade, é mais significativa para o glicerol, do que para os outros crioprotetores. Nesse estudo também se observou o efeito tóxico quando os crioprotetores foram associados. Esse fenômeno já havia sido reportado por Fahy (1986), e no momento ele o denominou como injúrias da congelação pela associação de crioprotetores.

Outros crioprotetores penetrantes têm sido estudados para congelar o sêmen de mamíferos domésticos, como os crioprotetores da função química álcool:

propilenoglicol, etanol, metanol e alguns da função química amida: acetamida, metilacetamida, dimetilacetamida, formamida, metilformamida, dimetilformamida, lactamida e butiramida. Alguns crioprotetores penetrantes como o dimetil sulfóxido (DMSO) e a acetamida têm desempenhado efeito crioprotetor satisfatório durante a criopreservação de sêmen de coelho, uma espécie considerada de difícil congelabilidade. Outros crioprotetores como a acetamida, metilacetamida e dimetilformamida têm demonstrado adequado efeito protetor aos espermatozoides congelados de eqüinos, sendo alternativas interessantes para a congelação de sêmen de garanhões considerados maus congeladores (Keith, 2002; Alvarenga et al., 2000; Alvarenga et al., 2002; Snoeck, 2003).

Segundo Alvarenga et al. (2005), dentre as amidas a dimetilformamida é a que tem promovido melhores índices de congelabilidade do sêmen equino, como também, quando comparado com o glicerol, tem obtido melhores taxas de fertilidade. As amidas podem representar alternativas promissoras também para a congelação de sêmen ovino, com possibilidade de minimizar a variabilidade individual de congelabilidade entre ejaculados de um mesmo carneiro e com isso melhorar os resultados de fertilidade pós-descongelação.

Skeff et al. (2008) testaram a eficácia da metilformamida em diferentes concentrações para a criopreservação do sêmen ovino. Ao comparar com o glicerol (5,3%), a metilformamida a 3% proporcionou índices de motilidade espermática e integridade de membrana pós-descongelação e após o teste de termoresistência lento (3h), semelhantes. Os autores sugeriram que também para a espécie ovina, as amidas podem representar uma alternativa importante para a preservação espermática, sendo necessário, no entanto, estudos para analisar sua fertilidade *in vivo*.

O etilenoglicol foi testado Bittencourt et al. (2004) na preservação do sêmen caprino. Os autores observaram um maior número de defeitos maiores e totais ( $p < 0,01$ ) para o grupo com sêmen congelado em diluidor contendo o glicerol (7%) em relação ao grupo com etilenoglicol (7%), apesar da menor motilidade encontrada para o segundo grupo ( $p < 0,0001$ ).

Neves Neto et al. (1995) utilizando as mesmas concentrações de etilenoglicol e glicerol, encontraram maiores índices de éguas prenhes com a utilização do sêmen congelado com etilenoglicol, demonstrando existir um crioprotetor alternativo para a congelação de sêmen equino.

Em trabalhos realizados com ovinos observou-se que os meios de congelação contendo etilenoglicol, utilizado na concentração de 0,5M, propiciaram motilidade e vigor, semelhantes ao glicerol (0,72M), porém, promovendo uma melhor proteção acrossomática (MORAES et al., 1998) e melhor preservação da integridade das membranas espermáticas (BRISOLA et al. 1999). O etilenoglicol já foi testado anteriormente para a criopreservação do sêmen ovino. Entretanto, segundo o levantamento bibliográfico realizado, todos os trabalhos encontrados, foram desenvolvidos com sêmen ovino congelado em pellets (MORAES et al., 1995, BRISOLA et al., 1999; MOLÍNIA et al., 1994) e não em palhetas ou mini-palhetas, que, atualmente, são as formas convencionais de comercialização de sêmen congelado de todas as espécies animais no Brasil.

A toxicidade dos crioprotetores é um obstáculo fundamental ao potencial da crioproteção artificial completa, porém esse fenômeno ainda permanece pouco compreendido (FAHY et al., 1990).

Com o conhecimento biológico e físico-químico atual dos efeitos dos crioprotetores, é sugerido que a toxicidade destes agentes é um fator limitante, fundamental, dentro da criobiologia. Esse fato não só faz com que esta toxicidade impossibilite o uso de níveis necessários desses aditivos, para que se consiga uma ação crioprotetora completa, mas também pelo fato dessa toxicidade ser manifestada na forma de crioinjúrias, sobre e além dos processos clássicos de crioinjúria celular. Isso acaba levando ao confundimento de quais alterações celulares foram causadas pelos efeitos tóxicos do crioprotetor ou pelos inúmeros processos da criopreservação celular que podem ocasionar danos celulares. O autor sugeriu que uma melhor supressão dessa toxicidade é possível, o que possibilitará avanços no processo de criopreservação celular (FAHY, 1986).

Leibo (2003)<sup>1</sup> discorda desse conceito de toxicidade celular provocada pelo crioprotetor e afirma que as lesões espermáticas são consequência do choque osmótico provocado pela introdução do sêmen em um meio contendo um crioprotetor, já que estes acarretam altas osmolaridades ao meio, incompatíveis com a osmolaridade seminal, que é em torno de 300 mOsmol/L. Snoeck (2003) verificou que a osmolaridade do seu diluidor de congelação (lactose-EDTA-gema-de-ovo) sem o crioprotetor era de 356 mOsmol/L, após a introdução do glicerol (5%) e

---

<sup>1</sup> LEIBO, S.P. XV Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, (Comunicação Pessoal), 2003

etilenoglicol (5%), em duas soluções diferentes, a osmolaridade foi para 1110 mOsmol/L e 1230 mOsmol/L respectivamente, demonstrando que os espermatozóides podem sofrer um estresse osmótico grande em decorrência desse diferencial de osmolaridade entre o sêmen fresco e após diluição nos meios de congelamento.

Esse fato discorda dos achados de Fiser e Fairfull (1989), que demonstraram que a motilidade pós-descongelamento e a integridade acrossomal de espermatozóides de carneiros, não foram afetadas pelas mudanças osmóticas glicerol-dependentes, associadas com a diluição do sêmen. Peris et al. (2000) relatam que o espermatozóide ovino mostrou resistência intermediária às variações osmóticas, não tendo havido danos à membrana em solução hiperosmótica de citrato de sódio a 910mOsmol. Essa observação vai de acordo com Curry e Watson (1994) ao relatarem que a viabilidade dos espermatozóides ovinos foi menos afetada pela desidratação em soluções hipertônicas que pela dilatação celular após diluição em meio hipotônico.

### **2.2.2. Crioprotetores não penetrantes**

Os crioprotetores não penetrantes como a lactose e as lipoproteínas encontradas na gema do ovo, agem somente no compartimento extracelular. Estes crioprotetores favorecem a desidratação dos espermatozóides, reduzindo a probabilidade de formação de grandes cristais de gelo dentro das células (SQUIRES et al. 1999).

A gema de ovo tem sido largamente usada como crioprotetor da membrana plasmática do espermatozóide em diversas espécies, inclusive na espécie ovina (GONZALEZ et al., 1999; MEDINA et al., 2004; OBA et al., 2004). WATSON (1995) cita que a gema seria o mais efetivo agente protetor do espermatozóide contra o choque térmico provocado pelo frio, prevenindo o dobramento de cauda dos espermatozóides e protegendo a motilidade espermática.

Watson e Martin (1975) observaram que a gema de ovo conferia certa proteção ao espermatozóide contra a queda de motilidade e sugeriu que essa proteção ocorreria durante o resfriamento e congelamento por sua interação com a membrana plasmática do espermatozóide.

Os lipídios presentes na gema-de-ovo são os principais responsáveis pela ação protetora sobre a membrana espermática. O componente essencial de sua ação é a interação desses lipídios na gema-de-ovo com a membrana espermática, tornando-a mais resistente durante o resfriamento (WATSON, 1995).

Quinn et al. (1980) observou que ao adicionar fosfolipídios ao sêmen lavado de carneiros, foi promovida uma imediata proteção contra o choque térmico, verificada pela avaliação da motilidade. Ao relavarem o sêmen, este se tornou novamente susceptível ao choque térmico. Esses autores notaram que os fosfolipídios adicionados ao sêmen e incubados por 3h a 37°C, não tinham se incorporado às membranas celulares e que a relação de fosfolipídios e colesterol no espermatozóide não foi mudada e, assim, concluíram que o efeito protetor dos fosfolipídios contra choque térmico dos espermatozoides de carneiros é devido a uma delicada interação dessas estruturas lipídicas com a membrana plasmática das células.

Daskin e Tekin (1996) verificaram uma maior taxa de motilidade e uma menor percentagem de lesão de acrossoma (respectivamente 47% e 25%) pós-descongelação para o sêmen congelado em meio contendo gema de ovo, que para as amostras congeladas em meio sem gema (19% e 33% para motilidade e lesão acrossomal, respectivamente).

Fiser e Fairfull (1986) verificaram que a adição da gema de ovo ao diluidor do sêmen promoveu melhores índices de sobrevivência espermática após o processo de congelação descongelação, principalmente quando o sêmen ovino foi submetido a uma curva rápida de resfriamento, previamente a congelação.

Outros dois agentes que têm mostrado possuir propriedades crioprotetoras são a glicina betaína e a prolina. Estes agentes estabilizam a membrana plasmática, provavelmente, por manterem a hidratação das proteínas de membrana (WATSON, 1995). Sanchez-Partida et al. (1998) testaram a utilização dessas duas substâncias para a congelação do sêmen ovino e verificou que o percentual de espermatozoides móveis pós-descongelação foi maior na presença da glicina betaína e da prolina do que quando as mesmas estavam ausentes no diluidor, entretanto a fertilidade do sêmen com esses aditivos foi reduzida.

Além das lipoproteínas do leite e da gema de ovo, outras substâncias atuam como crioprotetores não penetrantes, como a albumina sérica bovina (BSA),

açúcares como a frutose, trealose, lactose, manose, rafinose, polímeros sintéticos como a polivinilpirrolidona, metilcelulose e amido (JASKO, 1994; McKINNON, 1996).

### **2.2.2.1. Albumina sérica bovina - BSA.**

Apesar do efeito positivo da utilização da gema de ovo nos diluidores para a manutenção da viabilidade espermática pós-descongelação, esse componente tem o inconveniente de apresentar uma falta de controle da qualidade, devido a grande variação na sua composição (GIL et al., 2003a), bem como os riscos de contaminação bacteriana (Bousseau et al. 1998). Esses fatos vêm estimulando o desenvolvimento de diluidores quimicamente definidos, ou semi-definidos, formulados a base de lecitina de soja ou albumina sérica bovina, para a substituição da gema de ovo nos meios de congelação do sêmen ovino (GIL et al., 2000b; GIL et al., 2003a; MATSUOKA et al. 2006; FUKUY et al, 2007).

Matsuoka et al. (2006) avaliaram diferentes concentrações de BSA (0; 0,3; 15; 10 e 15%) no meio de congelação do sêmen ovino, sem gema de ovo. O sêmen congelado com 10 e 15% de BSA apresentou os maiores índices de motilidade espermática pós-descongelação, em relação aos demais grupos estudados, inclusive quando comparado ao meio frutose com 20% de gema de ovo. Estes resultados vão de acordo com os observados em trabalhos de Fukuy et al. (2007) e Fukuy et al. (2008) que ao congelarem o sêmen de carneiros com os meios tris-gema de ovo (15%) ou BSA (10%) sem gema de ovo, obtiveram taxas de fertilidade semelhantes (64 e 66% com tris-gema *versus* 58 e 65% com BSA) das fêmeas inseminadas em tempo fixo, via intra-uterina. Estes achados indicam que a BSA pode substituir integralmente a gema de ovo nos meios de congelação do sêmen ovino, sem comprometer os índices de fertilidade.

### **2.2.2.2. Trealose**

Os açúcares têm diversas funções no diluidor de sêmen, incluindo o fornecimento de substrato energético para os espermatozóides, a manutenção da



pressão osmótica do meio e atuando como um crioprotetor (BERLINGUER et al., 2007).

Um açúcar que tem se destacado como crioprotetor espermático é a trealose que é um dissacarídeo e exerce ação crioprotetora sobre o espermatozóide pela sua atividade desidratante e interação com as membranas celulares.

A atividade crioprotetora sobre as membranas plasmáticas exercida pela trealose estaria relacionada à sua capacidade de estabelecer pontes de hidrogênio com as cabeças polares dos fosfolípidios da membrana, substituindo, assim, as moléculas de água durante o processo de desidratação prevenindo a ocorrência dos eventos de fusão das membranas plasmáticas (BAKÁS e DISALVO et al., 1991).

Além de promoverem a estabilidade da membrana plasmática os dissacarídeos, como a sacarose e a trealose, também tem a capacidade de preservar as proteínas de membrana, através da substituição da água presente entre as cadeias de aminoácidos, mantendo a proteína estável e evitando sua desnaturação (LESLIE et al. 1995). Dessa forma, a utilização da trealose tem promovido melhorias nas taxas de motilidade e preservação da morfologia espermática ovina pós-descongelamento (AISEN et al., 2000; AISEN et al., 2005).

Aisen et al. (2005) demonstraram que a utilização de um diluidor hipertônico a base de trealose aumentou a viabilidade e fertilidade do sêmen pós-descongelamento. Nesse estudo, a adição de 100 mOsmol/L de trealose ao diluidor possibilitou o aumento de 35% de motilidade espermática pós-descongelamento, em relação ao sêmen congelado no diluidor sem o dissacarídeo. E o sêmen dos carneiros diluídos e criopreservados em meio contendo a trealose possibilitou, em dois experimentos, índices de nascimento de 45% e 47% com a inseminação transcervical. Índices de fertilidade duas vezes e meia superiores à fertilidade obtida pelo grupo controle, sem trealose.

Entretanto, existem relatos de insucesso com a utilização da trealose para a congelamento do sêmen ovino, como o estudo realizado por Valleriote et al. (2005) e Bittencourt et al. (2007), que não observaram o efeito positivo da adição da trealose no diluidor de congelamento. Esses últimos encontraram, através da análise computadorizada, taxas inferiores ( $P < 0,05$ ) de motilidade espermática para o sêmen congelado com adição de 100mOsmol de trealose comparado com o grupo controle tris gema de ovo de, respectivamente, 83% e 67%.

Esses resultados vão de acordo com estudo recente desenvolvido pela mesma equipe (BITTENCOURT et al., 2008b) com ovinos, cujos valores da motilidade total (MT), velocidade curvilínea (VCL) e deslocamento lateral de cabeça (ALH) foram inferiores ( $P < 0,05$ ) para o sêmen congelado em meio hiperosmótico a base de trealose, em relação ao meio isotônico (similar sem trealose). Este fato provavelmente está relacionado a maior densidade do meio diluidor hipertônico, que pode influenciar o deslocamento espermático, reduzindo os movimentos (ALH) e as velocidades destes (VAP, VSL, VCL). Dessa forma, os resultados das avaliações da cinética espermática ficam comprometidos no meio hipertônico, em relação aos meios isotônicos, usados mais comumente. Os autores verificaram que essas diferenças não representaram alterações espermáticas importantes, como as relacionadas à membrana plasmática ou às organelas, especialmente as mitocôndrias, responsáveis pelo metabolismo energético e que é uma das causas da redução verificada nos parâmetros da cinética espermática. Isso foi demonstrado pelos índices semelhantes de integridade da membrana plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial entre os grupos controle e com adição de 100mOsmol de trealose. Este fato reforça a justificativa de que o meio diluidor hipertônico exercer maior resistência aos espermatozoides e isto estaria representado pelas taxas inferiores das características relacionadas à cinética espermática.

Com o objetivo de reduzir o percentual de glicerol no meio de congelação, minimizando consecutivamente os prováveis efeitos tóxicos desse criogente, Bittencourt et al. (2008a) testaram a eficácia de um meio enriquecido com trealose (100mOsmol), associado a uma concentração inferior de glicerol (3%). No entanto, não tiveram sucesso, cujo grupo controle contendo 6% de glicerol obteve as melhores taxas de viabilidade espermática pós-descongelação.

Os resultados conflitantes existentes na literatura científica sobre o efeito da adição da trealose aos meios isotônicos a base de gema de ovo-glicerol, sobre os índices de viabilidade espermática pós-descongelação (BITTENCOURT et al. 2008, BITTENCOURT et al. 2008b; AISEN et al., 2005; ABGOALA e TERADA, 2003; AISEN et al., 2000), podem ser justificadas pelas variações nos protocolos de diluição, descongelação e rediluição, composição do meio diluidor e concentração da trealose utilizada.

Alguns trabalhos têm demonstrado que atividade de crioproteção da trealose pode ser potencializada quando a mesma é utilizada em conjunto com o EDTA, cujos autores afirmam que há a existência de uma atividade sinérgica importante entre essas substâncias (AISEN et al., 2000; BAKÁS e DISALVO, 1991).

Esses achados discordam dos observados por Bittencourt et al. (2008b). Neste estudo os autores encontraram índices inferiores de motilidade espermática, velocidade progressiva, velocidade curvilínea, velocidade de trajeto, deslocamento lateral de cabeça e de espermatozóides rápidos (%), tanto para o sêmen congelado apenas com a adição da trealose como pra associação trealose mais edta.

### **2.3. Aditivos utilizados no meio de congelação**

Alguns autores consideram que os índices de fertilidade do sêmen ovino congelado ainda podem ser implementados com o desenvolvimento de diluidores melhorados (AISEN et al., 2005; SALLES, 2005; VALLERIOTE et al., 2005).

Dessa forma vem-se buscando enriquecer o meio de congelação do sêmen ovino com substâncias com diferentes funções, que juntas ou individualmente possam possibilitar a maximização do processo de criopreservação celular, refletido em maiores índices de fertilidade das fêmeas inseminadas.

#### **2.3.1. Quelante de Cálcio EDTA**

A peroxidação dos fosfolipídios da membrana espermática é um outro fator que influencia a queda da fertilidade do sêmen congelado. Essa peroxidação pode ser prevenida através da manipulação seminal em condições anaeróbicas e através da utilização de antioxidantes e agentes quelantes como o EDTA (etileno-diamino-tetraacetato-dissódico) (SALAMON e MAXWELL, 2000).

Além desse fato, em temperaturas reduzidas, há uma queda na síntese de ATP e todos os mecanismos fisiológicos dependentes de ATP, como a bomba de sódio-potássio, ficam comprometidos. Isso pode resultar em uma despolarização parcial da membrana plasmática, provocando a abertura dos canais de cálcio controlados por voltagem, levando, assim, ao influxo do mesmo. Esse aumento do cálcio

intracelular promoveria a ativação das fosfolipases, e, assim, ocorreria a hidrólise dos fosfolipídios da membrana espermática. Tanto as alterações provocadas aos fosfolipídios, como a formação de ácidos graxos livres, acarretariam um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e plasmática, o que potencializaria a morte celular (AMANN e PICKETT, 1987).

Outro fator importante é a interação entre o íon de  $\text{Ca}^{2+}$  e os lipídios de membrana, o qual tem importante influência sobre a orientação das cabeças polares dos fosfolipídios da membrana, do grau de solubilidade e da fase de transição quando há mudança de temperatura (BAKAS et al., 1991). O cálcio também tem uma importante função na ocorrência da reação acrossomal, que é reduzida na presença do etileno-diamino-tetra-acetato-dissódico (EDTA) (ROLDAN et al., 1994).

Visando minimizar o efeito deletério do cálcio durante o processo de congelação, a partir de 1973, alguns autores passaram a empregar o EDTA em meios diluidores para a congelação de sêmen eqüino (MARTIN et al., 1979).

A função principal do EDTA é a de quelar o cálcio no meio extracelular, diminuindo seu influxo para o meio intracelular (WATSON, 1981). Essa função é extremamente importante, principalmente no processo de resfriamento, já que a concentração de cálcio intracelular aumenta na proporção em que cai a temperatura, sendo o espermatozóide capaz de restaurar os níveis normais de cálcio até  $22^{\circ}\text{C}$  ou em temperaturas superiores a esta, por um período de até duas horas. Porém o acúmulo irreversível de cálcio intracelular pode ser observado ao resfriar o espermatozóide bovino a temperaturas abaixo de  $16^{\circ}\text{C}$ , estando esse acontecimento correlacionado com a ocorrência de lesões na membrana espermática (ROBERTSON e WATSON, 1986).

Assim, o EDTA tem sido adicionado na composição de diluidores de centrifugação e de congelação de sêmen da espécie equina (ALGHAMDI et al., 2002, DEVIREDDY et al., 2002), de lhama (BAER et al., 1999), de bovinos e búfalos (DHAMI et al., 1993), suínos (NUNES et al., 2000) e caprinos (PURANIK et al 1994 e BITTENCOURT et al., 2004). Para a congelação do sêmen ovino o EDTA foi usado por Bittencourt et al. (2008b), Aisen et al. (2005) e Aisen et al. (2000).

Dhami e Sahni (1993) observaram, no sêmen de bovinos e bubalinos, uma superioridade ( $P < 0,05$ ) de 10-12% na taxa de motilidade espermática pós-descongelação com o diluidor que continha 0,1% de EDTA em sua composição, em relação ao diluidor que não o continha.

Bittencourt et al. (2004) também observaram taxas de motilidade espermática 10% superior para os espermatozóides caprinos congelados em diluidor com 0,1% de EDTA, em relação ao diluidor que não o continha.

Em trabalho recente com ovinos, esses autores (BITTENCOURT et al., 2008b) demonstraram que a adição do quelante de cálcio EDTA (0,1%) ao meio com trealose não promoveu melhorias nas taxas de cinética espermática pós-descongelção, cujos resultados, embora numericamente superiores (exceto para motilidade total) aos obtidos com a trealose sozinha, não representaram diferença significativa. Observou-se também, que o EDTA não foi eficaz para a redução das alterações de membrana plasmática, acrossomo e membrana mitocondrial, quando comparado com os meios que não o continha.

### **2.3.2. Emulsificantes**

Alguns trabalhos têm demonstrado que a introdução de substâncias emulsificantes, como o dodecil e lauryl sulfato de sódio ao meio de congelação, tem melhorado os índices qualitativos, sobrevivência e longevidade dos espermatozóides pós-descongelção, de cães (ROTA et al., 1999; PEÑA e LINDE-FORSBERG, 2000; PEÑA et al., 2002), equinos (FURST, 2002), caprinos (BITTENCOURT et al., 2005) e ovinos (MAIA et al., 2005, ALAMY e FOOTE 2001; OLIVEIRA et al., 1988).

A função do emulsificante é aumentar a disponibilidade dos fosfolípidios da gema de ovo, melhorando assim a sua capacidade de proteção à membrana plasmática dos espermatozóides contra o choque térmico e as alterações promovidas pelo processo de criopreservação (ROTA et al, 1999).

O OEP (ovus es paste) foi testado por MAIA et al. (2005) no diluidor de congelação do sêmen ovino. Os autores compararam a congelabilidade do sêmen ovino em um diluidor a base de Tris-gema de ovo com 0%, 0,5% e com 1% de OEP. Esse estudo demonstrou que a adição do OEP aumentou ( $P < 0,05$ ) a motilidade total e progressiva do espermatozóide em relação ao meio sem detergente. No diluidor Tris a motilidade total e progressiva foram de 34% e 24%, respectivamente, enquanto que no meio Tris com 0,5% de Equex essas foram de 65% e 39% e no Tris com 1% foram 70% e 39%. Resultados que demonstraram o efeito benéfico da utilização do detergente na congelação do sêmen ovino.

Resultados benéficos com a utilização de emulsificantes no meio de congelamento do sêmen ovino foram relatados por El-Alamy e Foot (2001) e Oliveira et al. (1998) que observaram maiores índices de células vivas, motilidade progressiva, integridade acrossomal e taxa de parição, quando comparado com o sêmen congelado com o meio sem o emulsificante.

Pena e Linde-Forsberg (2000) em trabalho com cães e Bittencourt et al. (2008 c) trabalhando com caprinos, também demonstraram que o diluidor de congelamento do sêmen que continha 0,5% de emulsificante promoveu melhores ( $P < 0,05$ ) índices de sobrevivência pós-descongelamento e após o teste de termoresistência.

Entretanto, Foote e Arriola (1987) com sêmen de touro, citam que a adição de detergente ao diluente a base de leite foi extremamente deletério aos espermatozoides, resultando em redução da motilidade espermática pré-congelamento e ausência da mesma após a congelamento-descongelamento.

### **2.3.3. Antioxidantes**

Metabólitos reativos do oxigênio (ROS) são formados e degradados por todos os organismos aeróbicos, levando tanto a concentrações fisiológicas requeridas para funcionamento normal das células, ou em excessivas quantidades, levam ao chamado estresse oxidativo. Os ROS incluem um número de moléculas reativas quimicamente, derivadas do oxigênio, sendo algumas mais reativas, como o radical hidroxila e outras menos reativas, como o peróxido de hidrogênio e o superóxido (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

Os sistemas de proteção antioxidante nos espermatozoides são primariamente de origem citoplasmática. Entretanto, os espermatozoides durante as fases finais de diferenciação perdem a maioria do seu citoplasma, descartando parte significativa do citoplasma contendo os antioxidantes que agiriam combatendo os efeitos deletérios das espécies oxigênio reativas e peroxidação lipídica (BUCAK et al., 2007).

A liberação controlada e espontânea de oxigênio molecular, formando baixas concentrações de ROS é requerida para a manutenção da capacidade fertilizante e para o processo de capacitação/reação acrossomal dos espermatozoides (BUCAK

et al., 2007). Entretanto, excessivas quantidades de ROS inibem a motilidade espermática e a capacidade fertilizante (BAUMBER et al., 2000).

A criopreservação induz o estresse físico e químico da membrana espermática, associado ao estresse oxidativo e aos ROS gerados pela morte espermática ou pelo oxigênio molecular do ambiente, levando a queda na motilidade, integridade da membrana e potencial fertilizante dos espermatozóides (UPRETI et al. 1998). Dessa forma, diversos trabalhos têm introduzido substâncias com atividade antioxidante, como a taurina, hipotaurina, trealose, cisteamina, catalase, ácido ascórbico,  $\alpha$  tocoferol (vitamina E) nos meios de congelação do sêmen ovino (BUCAK et al., 2007; DE GRAAF et al., 2007; MARTINS-BESSA et al., 2007; AISEN, et al., 2003, MAIA, 2006; SÁNCHEZ-PARTIDA et al., 1997) e de outras espécies (FERNÁNDEZ-SANTOS et al., 2009; MICHAEL et al., 2009)

Bucak et al. (2007) observaram que o sêmen ovino congelado com meio acrescido de 50mM de trealose, 25mM de taurina, e 5 e 10mM cisteamina, proporcionou maiores percentagens de motilidade pós-descongelação, embora sem efeito positivo ( $P>0,05$ ) sobre os índices de integridade da membrana, acrossomal e da morfologia espermática, em relação ao grupo controle, sem antioxidantes. Sânschez-Partida et al. (1997) também obtiveram efeito positivo significativo da taurina (25 mM or 50 mM) sobre a motilidade espermática ovina pós-descongelação, mas este efeito não foi refletido nos índices de fertilidade das fêmeas inseminadas, com sêmen congelado em diluidor com ou sem a taurina. Os autores concluíram que o efeito crioprotetor da taurina provavelmente estava mais relacionado ao efeito na regulação osmótica do que com o seu efeito antioxidante. Os outros antioxidantes testados (inositol, hipotaurina, carnosina e ácido ascórbico) não exerceram atividade benéfica sobre os parâmetros espermáticos avaliados.

De Graaf et al. (2007) incorporaram a catalase ao diluidor do sêmen de carneiros, antes de submetê-lo a sexagem por citometria de fluxo e posterior criopreservação, na tentativa de inibir o estresse oxidativo oriundo de ambos os processos. Os autores não observaram efeito positivo da catalase sobre nenhum dos parâmetros espermáticos estudados. A ineficácia da catalase e da vitamina E, adicionadas ao meio de diluição do sêmen ovino, para a manutenção da motilidade espermática também foi verificada por Upreti et al. (1997). Já Maia (2006) observou que a adição da catalase ao diluidor Tris-gema, melhorou a viabilidade do espermatozóide ovino, em relação aos outros diluidores sem a catalase ou

associado a um análogo hidrossolúvel do antioxidante tocoferol (Trolox C). A autora considerou que a catalase, pode ser um aditivo importante para os meios de congelação do sêmen ovino.

Os resultados conflitantes encontrados na literatura podem estar relacionados aos diversos fatores e condições que podem induzir a produção elevada de ROS e seus efeitos deletérios sobre o sêmen, como também podem estar associados às técnicas de avaliação dos parâmetros espermáticos e do efeito oxidativo sobre esses. Sabe-se que quanto maior o número de células mortas maior a produção de ROS (DE GRAAF et al., 2007), então, quanto mais eficaz for o diluidor para a manutenção da viabilidade espermática, menor atividade oxidativa vai estar presente no ambiente. Além do que, os meios de congelação, muitas vezes já possuem em sua composição substâncias com atividade antioxidante (FOOT et al., 2002). Dessa forma, a adição desses componentes ao meio torna-se desnecessária.

Os efeitos do estresse oxidativo sobre a célula espermática podem estar refletidos em níveis estruturais que as avaliações usualmente utilizadas não são capazes de identificar. Fernández-Santos et al. (2009) observaram que o sêmen bovino incubado com uma substância altamente oxidativa, previamente a congelação, quando comparado ao grupo controle, não apresentou diferenças para o percentual de células viáveis, alterações de acrossoma e cauda, entretanto, os níveis de fragmentação de DNA foram superiores ( $P < 0,05$ ). Porém, ao incorporar o antioxidante catalase ao meio diluidor com o componente oxidante, os índices de lesão de DNA foram minimizados. Li et al. (2007) também observaram que a adição dos antioxidantes catalase e ascorbato ao meio de congelação do sêmen humano, proporcionou menores níveis de ROS produzidos, conseqüentemente, índices inferiores de alteração do DNA espermático, observados através do teste "Cometa".



# CAPÍTULO 2:

**EXPERIMENTO 1:**

Viabilidade dos espermatozoides ovinos criopreservados com a utilização do glicerol em duas concentrações, em meio diluidor com e sem trealose, associada ou não ao EDTA.

Trabalho a ser enviado para o periódico *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*

ISSN: 15199940

Normas para publicação disponível em:

[http://revistas.ufba.br/forms/Normas\\_RBSPA.pdf](http://revistas.ufba.br/forms/Normas_RBSPA.pdf)

BITTENCOURT, R.F. Viabilidade dos espermatozoides ovinos criopreservados com a utilização do glicerol em duas concentrações, em meio diluidor com e sem trealose, associada ou não ao EDTA. Botucatu, 2009. 201p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## RESUMO

Vinte amostras de sêmen de 10 carneiros Santa Inês foram submetidas à criopreservação, com o objetivo de avaliar a eficácia da concentração do glicerol (GLI, de 3 e 6%) em um meio hiperosmótico com trealose (TRE, 100mOsmol) ou TRE mais EDTA e seu efeito sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento. Assim, foram formados seis grupos experimentais: TRIS+GLI3%; TRIS+GLI6%; TRIS+GLI3%+TRE; TRIS+GLI6%+TRE; TRIS+GLI3%+TRE+EDTA e TRIS+GLI6%+TRE+EDTA. Logo após a avaliação, o sêmen foi diluído nos diferentes meios e congelado com dose inseminante de  $80 \times 10^6$  espermatozoides e palhetas de 0,25mL. Após a descongelamento, realizada em banho-maria à 38°C por 50s, o sêmen foi diluído (1/20) e os parâmetros da cinética espermática avaliados subjetivamente e pela análise computadorizada (CASA). A análise da viabilidade espermática foi realizada através da associação das sondas fluorescentes iodeto de proprídio (IMP, integridade de membrana plasmática), JC-1 (PMM, potencial de membrana mitocondrial) e aglutinina de *Pisum sativum* conjugada à fluoresceína de isotiocianato - FITC-PSA (IAC, integridade acrossomal). Para a análise estatística das características avaliadas, foi empregado o programa estatístico (SAS), versão 5.0 (1996) (Procedimento MEANS e GLM com  $P < 0,05$ ). O diluidor com GLI a 6% foi o protocolo mais eficaz para a manutenção da integridade espermática e a adição da trealose ao diluidor Tris não promoveu melhorias nas taxas de viabilidade espermática pós-descongelamento.

Suporte Financeiro: FAPESP- Brasil proc. 05/59530-2.

BITTENCOURT, R.F. Ram sperm viability cryopreserved with the glycerol in two grades in extender with or without trehalose, associated or not with EDTA. Botucatu, 2009. 201p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista

## **ABSTRACT**

Twenty semen samples of ten rams of the Santa Inês breed were cryopreserved with the objective of verifying the effect of the glycerol grade (GLI, 3% and 6%) in a hyperosmotic extender with trehalose (TRE, 100mOsmol) or TRE plus EDTA and its effect on the post-thaw sperm viability. Then, they were formed six experimental groups: TRIS+GLI3%; TRIS+GLI6%; TRIS+GLI3%+TRE; TRIS+GLI6%+TRE; TRIS+GLI3%+TRE+EDTA and TRIS+GLI6%+TRE+EDTA. After evaluation, the semen was diluted in the different extenders and frozen with of  $80 \times 10^6$  sperms/0,25mL. After the thawing accomplished in 38°C water bath for 50s, the thawed semen was diluted (1/20) and the kinetic sperm parameters were analyzed subjectively and by computer analyses system (CASA). The sperm viability evaluation was performed by using the multiple sperm parameter staining with propidium iodide (PMI, plasmatic membrane integrity), JC-1 (MMP, mitochondrial membrane potential) and Pisum sativum agglutinin conjugates with fluorescein isothiocyanate – FITC-PSA (ACI, acrosomal integrity). All the statistical analyses were performed using the SAS software version 5.0 (1996) (Proceeding MEANS and GLM with  $p < 0.05$ ). The extender with GLI at 6% was the best protocol for maintaining the sperm integrity and the trehalose addition to the Tris extender did not promoted the increase of the post-thawing sperm viability rates.

Financial support: FAPESP- Brazil proc. 05/59530-2

## 1. INTRODUÇÃO

A trealose é um dissacarídeo, com atividade crioprotetora devido sua atividade desidratante e interação com as membranas celulares, além de exercer efeito antioxidante, minimizando as lesões espermáticas geradas pelo processo de criopreservação espermática (AISEN et al, 2005). A concentração de trealose no diluidor com melhores índices de viabilidade *in vitro* e fertilidade *in vivo* observados por Aisen et al. (2002) foi de 100mOsmol/L. Estes autores relataram o aumento de 35% de motilidade espermática pós-descongelação e taxas de prenhez duas vezes e meia maiores com a introdução da trealose no meio de congelação.

Os trabalhos mostram a ocorrência de atividade sinérgica importante entre o EDTA e a trealose, com efeitos benéficos observados sobre as taxas de motilidade e preservação da morfologia espermática pós-descongelação (AISEN et al., 2000; BAKÁS e DISALVO, 1991).

A criopreservação do sêmen promove a elevação dos níveis de cálcio intracelular, o que resulta em disfunção e morte celular (AMANN e PICKETT, 1987). Assim, visando minimizar o efeito deletério do cálcio durante o processo de congelação, a partir da década de 1970 alguns pesquisadores passaram a empregar o etileno-diamino-tetra-acetato-dissódico (EDTA) em meios diluidores para a congelação de sêmen de diferentes espécies (MARTIN et al., 1979; BITTENCOURT et al., 2004; AISEN et al., 2005). Sua principal função é quelar o cálcio no meio extracelular, diminuindo seu influxo para o meio intracelular, o que minimiza, o efeito deletério do cálcio sobre os espermatozóides (AMANN e PICKETT, 1987).

Em estudo com bovinos e bubalinos observou-se superioridade de 10-12% na taxa de motilidade espermática pós-descongelação com o diluidor que continha 0,1% de EDTA em sua composição, em relação aquele que não o continha (DHAMI e SAHNI, 1993). Resultados semelhantes foram verificados na espécie caprina, cuja motilidade espermática na descongelação foi 10% superior no diluidor com o EDTA (0,1%) em sua composição (BITTENCOURT et al., 2004).

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da trealose, adicionada ao meio diluidor com duas concentrações de glicerol, e da sua associação com o quelante de cálcio EDTA, para a manutenção da viabilidade do espermatozóide ovino pós-descongelação. Foi objetivo deste trabalho também, estudar as correlações existentes entre os parâmetros espermáticos encontrados pós-descongelação.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. O local e o Período

As atividades de colheita, avaliação do sêmen *in natura* dos reprodutores ovinos e criopreservação foram realizadas na Tertúlia Central Genética (TCG), situada no município de Santo Antônio de Jesus, Estado da Bahia. Esta etapa foi desenvolvida em Novembro de 2008. As análises laboratoriais pós-descongelamento foram conduzidas no Laboratório de Estudos em Biotecnologia Aplicada à Reprodução de Ovinos e Caprinos e no Centro de Diagnóstico e Biotecnologia em Reprodução Animal (CERAN), pertencentes ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), município de Botucatu, Estado de São Paulo. Esta etapa foi realizada nos meses de Dezembro de 2008 a Fevereiro de 2009.

### 2.2. Animais Experimentais

Foram utilizados 10 carneiros Santa Inês Puros de Origem (PO) (Figura 1), com registro na Associação Brasileira de Criadores de Ovinos (ARCO).



FIGURA 1: Reprodutores da raça Santa Inês Puros de Origem, utilizados como doadores de sêmen para as congelações experimentais.

Todos os reprodutores utilizados foram submetidos a programa de controle sanitário, através de vermifugação iniciada 30 dias antes do início das colheitas. A alimentação era baseada em 1Kg de concentrado balanceado, formulado na própria central, com média de 18% de proteína bruta e sal mineral para ovinos, água e feno de alfafa à vontade. Estes animais tinham idades entre 12 a 40 meses e foram submetidos a um regime de colheitas de sêmen e exames andrológicos e aqueles considerados aptos, conforme preconizado por Henry e Neves (1998), foram mantidos no programa. Destes animais foram colhidos pelo menos dois ejaculados diários, por período de dois a três dias consecutivos, previamente ao início das colheitas com fins experimentais.

### 2.3. Colheita e Avaliação do Sêmen Pré-Congelação

As colheitas de sêmen foram realizadas com a utilização de vagina artificial com água aquecida entre 42 a 50°C, tendo como manequim uma fêmea em estro natural. O ejaculado foi colhido em tubos graduados, protegidos da luz e da temperatura ambiente por um protetor térmico. Após a colheita a amostra de sêmen foi encaminhada imediatamente para o laboratório de processamento (Figura 2), colocado em banho-maria a temperatura de 37°C e avaliada quanto ao volume, aspecto, turbilhonamento, vigor e motilidade espermática.

O volume do ejaculado foi verificado por visualização direta do sêmen no tubo graduado e registrado em mililitros (mL), e o turbilhonamento (escala de 0-5) observado através de uma gota de sêmen sobre uma lâmina pré-aquecida em mesa aquecedora a 37°C, em microscopia óptica com aumento de 100x. Para observação do vigor (escala de 0-5) e da motilidade total e progressiva (0-100%), foi procedida a diluição (1:50) do sêmen no meio diluidor Tris-gema de ovo (ROBERTS, 1986), utilizado como o grupo controle deste experimento (descrito a seguir no item 2.4). Na sequência 10µL desta amostra eram colocados entre lâmina e lamínula e observada em microscopia óptica com aumento de 200x, tal como preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) (HENRY e NEVES, 1998).

Para o cálculo da concentração espermática, empregou-se a câmara de Neubauer, com sêmen diluído na proporção de 10µL para 4mL (1:400) de solução

de formol-salina tamponada (HANCOCK, 1957). A contagem foi realizada em microscopia óptica com aumento de 200x.

A mesma amostra de sêmen em formol-salina tamponada usada para cálculo da concentração foi usado para avaliação da morfologia espermática, por isso teve-se o cuidado de manter o tubo com formol salina sobre a placa aquecedora para que fossem evitadas alterações na célula espermática, provocadas por choque-térmico. O estudo da morfologia espermática foi realizado posteriormente através de preparação úmida, colocando-se 10 µL da amostra diluída sob lâmina e lamínula e observando os espermatozóides em microscopia de contraste de fase (aumento de 1.000X), computando e classificando 100 células de acordo com as anormalidades encontradas. Estas foram classificadas conforme descritas por Blom (1973).

O teste supravital foi empregado para avaliação da integridade da membrana plasmática do sêmen *in natura*. Entretanto, diferente do preconizado na técnica original (BARTH e OKO, 1989), pela praticidade foi utilizado apenas o corante eosina amarela<sup>1</sup>, sem a nigrosina (Figura 2), baseado em relatos de Cedenho e Tokunaga (1995) que não encontraram diferença ( $P>0,05$ ) para a avaliação realizada com ambas as formulações. Dessa forma, foi feito sobrepondo em lâmina uma gota de sêmen (10µL) com uma gota da eosina (10µL), previamente aquecida (37°C) e elaboração de esfregaço, deixando secar sobre placa aquecedora. Imediatamente após seca, a amostra foi observada em microscopia óptica com aumento de 400x. As células coradas (vermelhas) foram consideradas com membrana plasmática lesada e as sem coloração com membrana íntegra.

Os reprodutores foram submetidos às colheitas de sêmen e aqueles ejaculados com mais de 60% de integridade de membrana plasmática (supravital) e 75% de motilidade espermática eram aproveitados para o experimento. Assim, foram utilizados dois ejaculados de cada reprodutor, totalizando 20 amostras de sêmen para este experimento.

---

<sup>1</sup> Vetec Ltda (Duque de Caxias-RJ, Brasil)



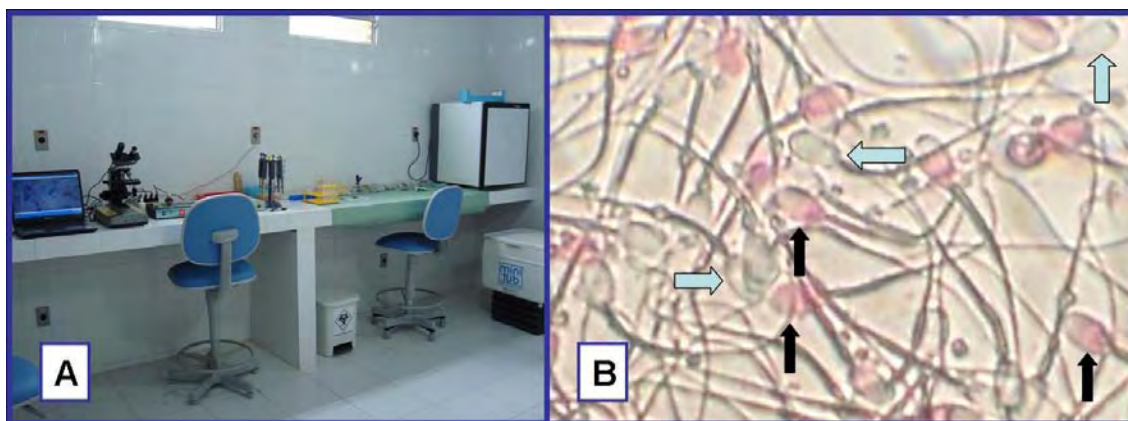


FIGURA 2: A: Laboratório de manipulação e processamento do sêmen da Tertúlia Central Genética; B: Teste supravital observado em microscopia óptica, com aumento de 400x. Setas pretas indicando espermatozóides corados de vermelho com lesão da membrana plasmática e setas azuis indicando os espermatozóides não corados, com membrana íntegra.

#### 2.4. Grupos Experimentais

A solução de Tris-gema de ovo-glicerol (ROBERTS, 1986) foi o diluidor base utilizado neste trabalho. Todos os reagentes químicos que o compuseram (2,42g de Tris, 1,5g de ácido cítrico, 1,25g de glicose e glicerol, para 100mL), bem como os aditivos EDTA e a trealose, utilizados nos grupos experimentais, foram fabricadas pelo laboratório VETEC Ltda<sup>2</sup>, exceto o sulfato de gentamicina<sup>3</sup> (13,4 mg).

Para o desenvolvimento do trabalho foram formados seis grupos experimentais, conforme descritos na Tabela 1.

TABELA 1. Composição, pH e osmolaridade dos diferentes diluidores estudados (TRIS+GL3%, TRIS+GLI6%, TRIS+GLI3%+TRE, TRIS+GLI6%+TRE, TRIS+GLI3%+TRE+EDTA, TRIS+GLI6%+TRE+EDTA).

Grupo	Diluidor base	% Glicerol	Trealose (mOsmol)	% EDTA	pH/Osmolaridade (mOsmol/Kg)
TRIS+GLI3%	TRIS	3		-	6,25/359
TRIS+GLI6%	TRIS	6		-	6,3/351
TRIS+GLI3%+TRE	TRIS	3	300	-	6,3/465
TRIS+GLI6%+TRE	TRIS	6	300	-	6,36/455
TRIS+GLI3%+TRE+EDTA	TRIS	3	300	0,1	6,36/455
TRIS+GLI6%+TRE+EDTA	TRIS	6	300	0,1	6,34/451

<sup>2</sup> Vetec Ltda (Duque de Caxias-RJ, Brasil)

<sup>3</sup> Schering-Plough S/A (São Paulo-SP, Brasil)

## 2.5. Resfriamento e Congelação do Sêmen

Após as avaliações iniciais e cálculo da concentração espermática, um total de  $400 \times 10^6$  de espermatozóides foram adicionados a tubos pré-aquecidos contendo 1mL de cada um dos seis diluidores (Tabela 1), já com o percentual final de glicerol (diluição em uma etapa), compondo quatro doses inseminantes de  $80 \times 10^6$  de espermatozóides com motilidade em 0,25mL, para cada grupo experimental. Assim, o ejaculado teve que ter no mínimo  $2.400 \times 10^6$  de espermatozóides móveis.

Após a diluição nos diferentes meios, o sêmen foi novamente avaliado, envasado em palhetas de 0,25mL e resfriado até 5°C em câmara refrigerada com temperatura estabilizada<sup>4</sup>, a uma taxa de resfriamento médio de 0,46°C/min, segundo metodologia descrita por Furst (2005). Após duas horas de resfriamento e tempo equilíbrio à temperatura de 5°C, a congelação foi efetuada mantendo-se as palhetas por 20min a uma altura de 5cm da lâmina de nitrogênio líquido (N<sup>2</sup>) e posteriormente mergulhadas no N<sup>2</sup>.

## 2.6. Avaliação do Sêmen Pós-Descongelação

As amostras dos diferentes grupos experimentais foram descongeladas em banho-maria à 38°C por 50 segundos, de trinta a noventa dias após a congelação. Após a descongelação, o sêmen de cada grupo foi depositado em micro tubos de 1,5mL<sup>5</sup>, previamente aquecidos e mantidos à 37°C, dos quais retiravam-se amostras para as avaliações *in vitro*. Para a avaliação subjetiva da motilidade e vigor espermático e teste supravital, procedeu-se como descrito para o sêmen *in natura* (item 2.3).

---

<sup>4</sup> Minitub do Brasil, Rio Grande do Sul, Brasil

<sup>5</sup> Microtubos MCT-150-C, 1,5mL, Axygen Scientific INC

### 2.6.1. Avaliação Computadorizada da Cinética Espermática

Uma alíquota de 5 $\mu$ L ( $2 \times 10^6$  espermatozoides) dos diferentes grupos experimentais foi diluída em 120 $\mu$ L de meio X-CELL<sup>6</sup> ( $16,6 \times 10^6$  espermatozoides/mL), previamente aquecido à 37°C, e mantida nesta temperatura por cinco a dez minutos. A seguir 10 $\mu$ L desta mistura foram transferidos para câmaras de Makler<sup>7</sup> e levadas para avaliação da cinética espermática através do analisador de sêmen modelo IVOS 12<sup>8</sup> (Figura 3) (*set up* no Anexo IV). Esta análise foi feita com a contagem mínima de quatro campos diferentes e mínimo de 300 células. As características avaliadas foram: as percentagens de espermatozoides com motilidade total (MTH, %), motilidade progressiva (MPH, %) e de espermatozoides rápidos (RAP, %), velocidade progressiva (VSL,  $\mu$ m/s), velocidade curvilínea (VCL,  $\mu$ m/s), velocidade de trajeto (VAP,  $\mu$ m/s), deslocamento lateral de cabeça (ALH,  $\mu$ m), frequência de batimento flagelar (BCF, Hz), linearidade (LIN, %) e retilinearidade (STR, %).

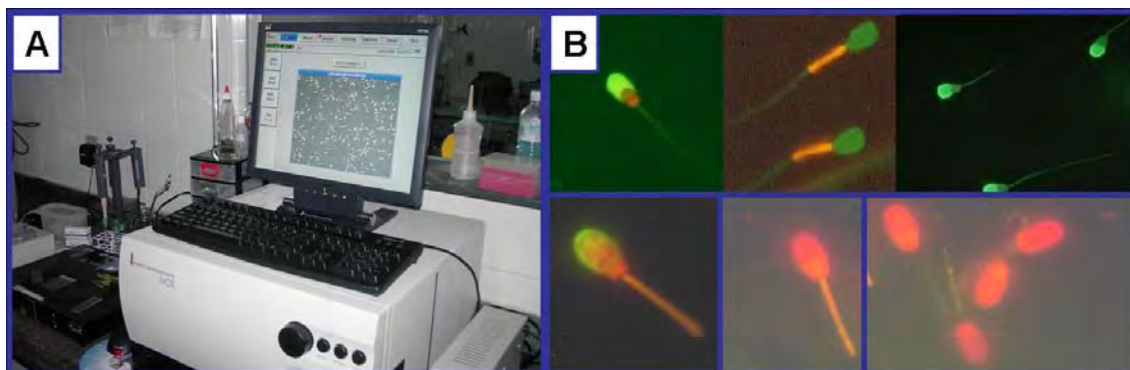


FIGURA 3: A: Analisador de sêmen modelo IVOS 12 do Laboratório de Estudos em Biotecnologia Aplicada aos Pequenos Ruminantes; B: Diversas subpopulações de espermatozoides sob microscopia de epifluorescência (1000x), em filtro I3 (excitação BP 450-490 e supressão LP515).

<sup>6</sup> IMV, L'Aigle, França

<sup>7</sup> Makler Counting Chamber, Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel

<sup>8</sup> Hamiton Thorn Biosciences, Beverly, MA, EUA

## 2.6.2. Avaliação das Membranas Plasmática, Acrossomal e Potencial da Membrana Mitocondrial

Para a avaliação da integridade das membranas espermáticas foi empregada a associação das sondas fluorescentes iodeto de proprídio - IP<sup>9</sup> (IMP, integridade de membrana plasmática), iodeto de 5,5',6,6'tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina - JC-1<sup>10</sup> (PMM, potencial de membrana mitocondrial) e aglutinina de *Pisum sativum* conjugada à fluoresceína de isotiocianato - FITC-PSA<sup>11</sup> (IAC, integridade da membrana acrossomal). Foi utilizada metodologia descrita por Celeghini (2005) e adaptada para ovinos por Azevedo (2006), com algumas modificações.

Uma amostra de 5µL de sêmen ( $2 \times 10^6$  espermatozoides) foi diluída em 120µL de meio X-CELL ( $16,6 \times 10^6$  espermatozoides/mL), ao qual foram adicionadas as soluções de trabalho das sondas fluorescentes (Anexos de IV a VI) nas seguintes proporções: 2µL de IP e 2µL de JC-1. A mistura foi homogeneizada, mantida protegida da luz e incubada a 37°C por 10 a 15 minutos. Após esse período, foram adicionados 25µL da solução de trabalho de FITC-PSA, procedendo-se novamente a homogeneização e logo em seguida uma alíquota dessa mistura de 10µL foi colocada entre lâmina e lamínula e 100 espermatozoides foram avaliados sob imersão, aumento de 1000x, em microscopia de epifluorescência<sup>12</sup> (Figura 3), usando filtro I3 (excitação BP 450-490 e supressão LP515). A classificação das células foi feita como descrita por Celeghini (2005): A ausência ou presença de fluorescência verde fosca e conseqüentemente a presença ou ausência de fluorescência vermelha na cabeça indicava respectivamente a lesão ou não da membrana plasmática. A presença ou ausência de fluorescência verde intenso no acrossomo indicava respectivamente lesão ou não da membrana acrossomal. Peças intermediárias com coloração vermelha ou vermelho-amarelada predominante em toda a cauda e coloração verde indicavam respectivamente, alto e baixo potencial da membrana mitocondrial. Seguindo-se este critério obtinham-se oito subpopulações espermáticas (SBP):

---

<sup>9</sup> Sigma, P4170 (St Louis, MO, EUA)

<sup>10</sup> Molecular Probes, T3168

<sup>11</sup> Sigma, L0770 (St Louis, MO, EUA)

<sup>12</sup> Leica DMLB – Leica Microsystems, Litz, Alemanha

**SBP 1** - membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial; **SBP 2** - membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial; **SBP 3** - membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado e baixo potencial de membrana mitocondrial; **SBP 4** - membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado e baixo potencial de membrana mitocondrial; **SBP 5** - membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial; **SBP 6** - membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial; **SBP 7** - membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e alto potencial de membrana mitocondrial; **SBP 8** - membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e baixo potencial de membrana mitocondrial.

As etapas de avaliação do sêmen descongelado encontram-se na Figura 4.

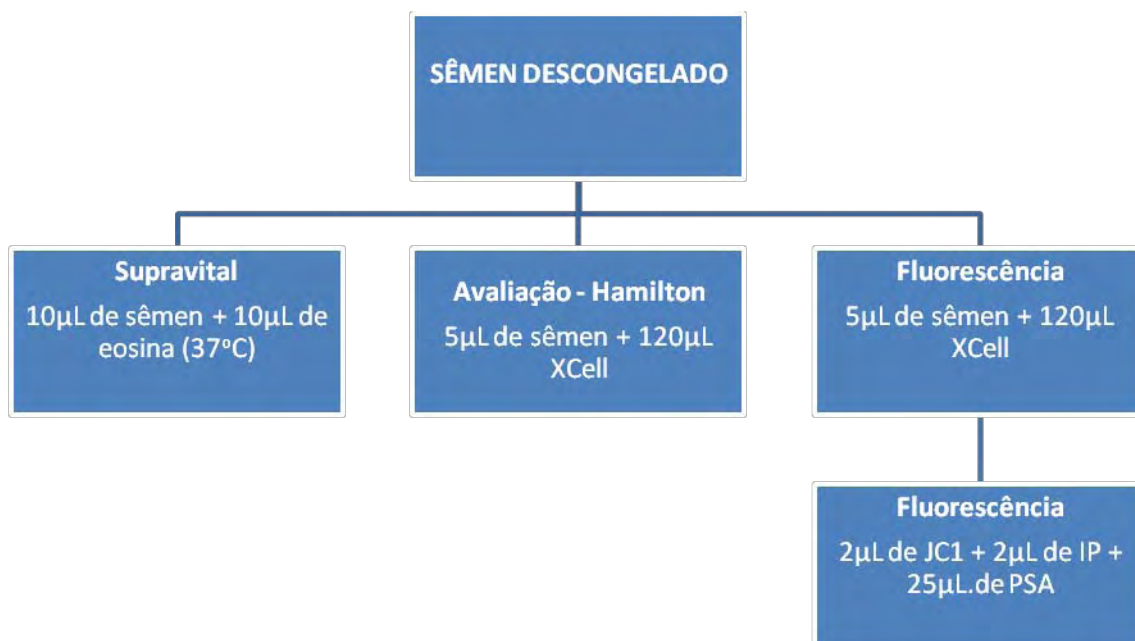


FIGURA 4: Fluxograma das etapas de avaliação do sêmen pós-descongelamento.

## 2.7. Delineamento e Análise Estatística

O delineamento estatístico empregado foi inteiramente casualizado (REIS, 2003), no qual os ejaculados foram considerados as repetições (n=20) e os

protocolos de processamento do sêmen (TRIS+GLI3%; TRIS+GLI6%; TRIS+GLI3%+TRE; TRIS+GLI6%+TRE; TRIS+GLI3%+TER+EDTA; TRIS+GLI6%+TRE+EDTA) mais o sêmen *In natura* foram considerados os tratamentos (n=7). Foram processados, separadamente, dois ejaculados por animal.

Para a análise estatística das características avaliadas, foi empregado o programa estatístico Statistical Analysis System (SAS) – versão 5.0 (1996). Assim, realizou-se a seguinte seqüência de análises:

1- A consistência dos dados e a análise descritiva (médias e desvio-padrão) das características de interesse (motilidade espermática total e progressiva subjetivas, vigor espermático, além dos parâmetros de cinética espermática e integridade das membranas espermáticas, obtidas, respectivamente, pela análise computadorizada e pela microscopia de fluorescência ao estudo foram realizadas mediante o emprego do Procedimento MEANS (PROC MEANS).

2- O efeito dos tratamentos e dos carneiros sobre os parâmetros de interesse ao estudo (motilidade espermática total e progressiva subjetivas, vigor espermático, além dos parâmetros de cinética espermática e integridade das membranas espermáticas, obtidas, respectivamente, pela análise computadorizada e pela microscopia de fluorescência) foi avaliado através da análise de variância (ANOVA) utilizando-se para tanto o Procedimento “General Linear Model” (PROC GLM). Para a comparação das médias empregou-se o teste de Student - Newman - Keuls (SNK), com nível de probabilidade de cinco por cento.

3- A relação entre os parâmetros espermáticos estudados foi avaliada pelo teste de correlação linear de *Pearson*, com nível de significância de cinco por cento.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos com a avaliação do sêmen *in natura* e pós-descongelação nos diferentes diluidores experimentais estão representados nas Tabelas de 2 a 6.

O resumo da análise de variância, com os valores de F e seus respectivos níveis de significância, referentes aos efeitos dos reprodutores e dos diferentes tratamentos experimentais sobre os parâmetros de cinética espermática subjetiva e computadorizada, viabilidade espermática avaliada pelo teste supravital e viabilidade das membranas espermáticas analisadas pela microscopia de fluorescência está representado no Anexo I.

Todos os parâmetros estudados, tanto para o sêmen *in natura* (motilidade total e progressiva subjetivas, vigor espermático e viabilidade espermática pelo supravital), quanto para o sêmen descongelado (cinética espermática subjetiva e computadorizada, viabilidade espermática através do supravital e integridade das membranas espermáticas analisadas pela microscopia de fluorescência), sofreram efeito significativo dos carneiros. Estes achados demonstram a heterogeneidade do grupo de doadores de sêmen utilizados no estudo, escolhidos aleatoriamente, representando condições individuais de congelabilidade diferenciadas, fator importante para representatividade deste estudo. De forma semelhante, foi observado efeito significativo dos tratamentos sobre quase todos os parâmetros de cinética espermática (exceto BCF e LIN) e integridade da membrana pelo supravital.

#### 3.1. Avaliação Subjetiva da Cinética Espermática

A análise de variância (ANOVA) demonstrou que as características subjetivas da cinética espermática avaliadas neste estudo, motilidade total (MTS), progressiva (MPS) e vigor espermático (VIG), apresentaram efeito significativo do tratamento.

Através da ANOVA também se pode verificar que o processo de congelação dos espermatozóides foi deletério e influenciou significativamente ( $P < 0,05$ ) a redução dos índices de motilidade total (MTS), progressiva (MPS) e vigor espermático (VIG). Em relação a estes parâmetros, pode-se observar na Tabela 2

que o sêmen *in natura* foi superior ao congelado em todos os protocolos experimentais.

A redução ( $P < 0,05$ ) dos índices de MTS após o processo de congelação-descongelação corrobora com diversos estudos como o de Rodello (2006) (de 86,3% para 50,3%), Azevedo (2006) (86,6 para 57,7%) e Valente et al. (2009) (de 67% e 68% para 46% e 36%, respectivamente, de acordo com o diluidor utilizado). Verificam-se valores semelhantes para a MTS do sêmen *in natura* deste estudo (89,6%), em relação aos dois primeiros trabalhos citados e superiores em relação ao estudo de Valente et al. (2009). Entretanto, a média de MTS pós-descongelação observada neste estudo, tanto para o grupo controle (TRIS+GLI6%; MTS= 75,5%) quanto para média geral dos tratamentos (60,5%), foram superiores às relatadas nos trabalhos citados.

TABELA 2. Médias e desvios-padrão dos parâmetros subjetivos da cinética espermática no sêmen *in natura* e pós-descongelação, nos diferentes diluidores estudados (TRIS+GLI3%, TRIS+GLI6%, TRIS+GLI3%+TRE, TRIS+GLI6%+TRE, TRIS+GLI3%+TRE+EDTA, TRIS+GLI6%+TRE+EDTA).

Parâmetros	TRATAMENTO						
	<i>In natura</i>	TRIS+GLI3%	TRIS+GLI6%	TRIS+GLI3%+TRE	TRIS+GLI6%+TRE	TRIS+GLI3%+TRE+EDTA	TRIS+GLI6%+TRE+EDTA
<b>MTS (%)</b>	89,6 a ± 04,4	60,5 c ± 15,2	75,5 b ± 10,6	61,7 c ± 14,9	56,7 c ± 16,8	52,8 c ± 13,5	55,2 c ± 12,0
<b>MPS (%)</b>	81,3 a ± 06,6	47,0 c ± 15,9	61,0 b ± 10,0	48,5 c ± 15,3	42,2 c ± 18,4	39,2 c ± 14,9	41,0 c ± 12,7
<b>VIG (0-5)</b>	04,3 a ± 00,2	03,8 b ± 00,2	03,9 b ± 00,2	03,6 c ± 00,3	03,4 c ± 00,4	03,5 c ± 00,3	03,5 c ± 00,3

▪ Motilidade total (MTS), motilidade progressiva (MPS) e vigor espermático (VIG).  
Valores seguidos de letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ).

Entre os diluidores testados, o TRIS+GLI6% obteve os melhores ( $P < 0,05$ ) percentuais de MTS (75,5%), MPS (61,0%) e VIG (3,95), sendo este último, porém, semelhante ( $P > 0,05$ ) ao obtido com o grupo TRIS+GLI3% (3,85).

Nota-se que o efeito do percentual de glicerol sobre a MTS e MPS observado entre os diluidores TRIS+GLI3% e TRIS+GLI6%, não foi verificado entre os grupos com trealose (TRIS+GLI3%+TRE, TRIS+GLI6%+TRE) ou trealose mais EDTA (TRIS+GLI3%+TRE+EDTA, TRIS+GLI6%+TRE+EDTA), demonstrando o efeito



negativo, sobre a MTS e MPS, quando a trealose ou esta associada ao EDTA foram adicionados ao meio com glicerol na concentração de 6% (Tabela 2).

Achados semelhantes foram observados por Becker (2004), em que a adição do dissacarídeo sacarose (375mOsmol) ao meio de congelação do sêmen caprino, com 6,8% de GLI reduziu ( $P < 0,05$ ) os índices de MTS pós-descongelação (37%), em relação ao meio isosmótico com o GLI na mesma concentração (52%). Estes resultados e as conclusões levantadas pela autora, contribuem para justificar os obtidos neste estudo, que sob as condições de intensa desidratação produzidas pelo diluente hiperosmótico, a citotoxicidade do glicerol seria exacerbada (BECKER, 2004), como provavelmente aconteceu nos diluidores hiperosmóticos com os maiores níveis de GLI deste estudo (TRIS+GLI6%+TRE, TRIS+GLI6%+TRE+EDTA) e como relatado por Valente et al. (2009) ao utilizar meio enriquecido com 88mOsmol de TRE e 5,3% de GLI ( $P < 0,05$ , MTS= 46% e 36%, respectivamente, para o grupo controle sem TRE e com TRE. Médias estas inferiores as deste experimento).

A toxicidade celular exercida pelo GLI a 6% no meio hiperosmótico, em uma segunda hipótese, pode explicar porque o efeito do percentual de glicerol (3% *versus* 6%) sobre a MTS e MPS, observado ( $P < 0,05$ ) entre os meios isosmóticos TRIS+GLI3% e TRIS+GLI6%, não foi verificado ( $P > 0,05$ ) entre os grupos hiperosmóticos com TRE ou TRE+EDTA.

De fato, os resultados positivos observados em ovinos com o uso de meio hiperosmótico a base de TRE tem se baseado em meios de congelação com no máximo 3% de GLI (AISEN et al., 2002, AISEN et al., 2005, BUCAK et al., 2007). Aisen et al. (2002) estudando os melhores níveis de TRE (50 a 400mOsmol) em meio isosmótico (Tris-citrato 10% de gema e 3% de GLI, 300mOsmol), observaram maior ( $P < 0,05$ ) índice de MTS com a adição de 100mOsmol de TRE, quando comparado ao meio isosmótico (52% *versus* 32%). Já Bucak et al. (2007) ao testarem a TRE nas concentrações de 50 e 100mOsmol obtiveram taxas de MTS, respectivamente, de 59 e 56%, sendo a primeira superior ( $P < 0,05$ ) à MTS obtida com o meio similar sem a TRE (igual ao utilizado por AISEN et al., 2002).

Neste trabalho, entretanto, a adição da TRE ao meio diluidor isosmótico com 3% de GLI não promoveu melhorias sobre os índices de MTS e MPS pós-descongelação, como relatado nos trabalhos anteriores (AISEN et al., 2002, AISEN et al., 2005, BUCAK et al., 2007). Provavelmente, variações nos protocolos de diluição (uma ou duas etapas), descongelação (curva de descongelação) e

rediluição, composição do meio diluidor (concentração de gema e glicerol), utilizados neste e nos demais trabalhos, além dos efeitos dos carneiros, podem ser responsáveis pelas diferenças observadas nos resultados, comprometendo o efeito comparativo.

Diferente do observado por Dhami e Sahni (1993) e Bittencourt et al. (2004), cuja adição de 0,1% de EDTA ao meio de congelação de sêmen, proporcionou índices de 10-12% a mais na MTS, em relação ao meio sem EDTA, neste trabalho não houve efeito da adição do quelante de cálcio EDTA ao meio de congelação. Resultados semelhantes foram relatados por Aisen et al. (2000), que não observaram melhoria da MTS pós-descongelação com uso do EDTA.

### 3.2. Avaliação da Viabilidade Espermática – Teste Supravital

Nesta avaliação foram observadas subpopulações de espermatozoides parcialmente corados e estes foram consideradas como células com lesão. Devido à nítida correspondência da região não corada com a região acrossomal é possível que a estreita justaposição da membrana plasmática como a membrana nuclear, logo após a porção posterior do acrossoma na região equatorial, tenha impedido a difusão do corante para a região anterior do citoplasma da cabeça espermática, o que os mantiveram parcialmente corados (BRITO et al., 2003).

O efeito significativo do tratamento (ANOVA, Anexo I, Tabela 2) também foi observado para a viabilidade espermática pelo teste supravital (SV). Entretanto, ao realizarmos o estudo da variância excluindo da análise o sêmen *in natura*, o efeito do tratamento não foi mais demonstrado.

Assim como observado para avaliações subjetivas da cinética espermática, o processo de congelação-descongelação dos espermatozoides afetou negativamente os índices de viabilidade celular no teste supravital (SV), que foram significativamente inferiores para o sêmen congelado nos diferentes diluidores experimentais em relação ao sêmen *in natura* (Tabela 3). No entanto, as taxas de SV não foram influenciadas ( $P > 0,05$ ) pela composição do diluidor utilizado, refletindo que os mesmos conferiram níveis semelhantes de proteção à membrana plasmática durante o processo de criopreservação, ou que os possíveis danos espermáticos originados deste processo não tenham sido detectados pelo teste supravital.

A redução dos índices de viabilidade espermática pós-descongelamento, também foi verificada em ovinos por Valente et al. (2009). Estes autores observaram quedas significativas ( $P < 0,05$ ) de SV de 84% e 85% no sêmen *in natura*, para 59% e 66%, respectivamente, pós-descongelamento, de acordo com o meio de congelamento testado. No presente estudo foram obtidas reduções nos índices de SV que variaram de  $\pm 18\%$  (TRIS+GLI6%) até  $\pm 26\%$  (TRIS+GLI6%+TRE), índices estes próximos aos obtidos por Valente et al. (2009), de  $\pm 19$  a 25%.

TABELA 3. Médias e desvios-padrão dos índices de viabilidade espermática, avaliados pelo teste supravital (SV) no sêmen *in natura* e pós-descongelamento, nos diferentes diluidores estudados (TRIS+GLI3%, TRIS+GLI6%, TRIS+GLI3%+TRE, TRIS+GLI3%+TRE, TRIS+GLI3%+TRE+EDTA, TRIS+GLI6%+TRE+EDTA).

Parâmetro	TRATAMENTO						
	<i>In natura</i>	TRIS+GLI3%	TRIS+GLI6%	TRIS+GLI3%+TRE	TRIS+GLI6%+TRE	TRIS+GLI3%+TRE+EDTA	TRIS+GLI6%+TRE+EDTA
SV	76,1 a $\pm 08,1$	52,6 b $\pm 10,6$	58,4 b $\pm 12,9$	50,9 b $\pm 11,1$	56,2 b $\pm 11,7$	51,6 b $\pm 10,0$	53,1 b $\pm 10,5$

Valores seguidos de letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ).

Bucak et al. (2007) relataram taxas de SV de 76,7%, 66,0% e 72,2%, para o sêmen ovino congelado respectivamente, em meio isosmótico e este acrescido de 50 e 100mOsmol de TRE. Estes índices não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre os grupos e foram superiores aos obtidos neste trabalho, para todos os grupos experimentais ( $\pm 53,8\%$ ).

O teste supravital como método complementar para avaliação da qualidade seminal vem sendo constantemente utilizado tanto na pesquisa como em condições de campo, em diferentes espécies (CEDENHO e TOKUNAGA 1995; FURST et al., 2005; BUKAK et al., 2007; VALENTE et al., 2009), devido a sua praticidade, baixo custo, melhores resultados quando comparados a outros corantes (VIGANÒ et al., 1990) e alta correlação ( $P < 0,05$ ) com as técnicas avançadas de avaliação da viabilidade espermática com sondas fluorescentes (IP mais carboxifluoresceína ou SYBR-14), embora com uma tendência para superestimar as alterações da membrana plasmática (BRITO et al., 2003) e apresente menor sensibilidade que as

sondas, para detectar essas alterações no sêmen *in natura* (CHALAH e BRILLARD, 1998).

### 3.3. Avaliação Computadorizada da Cinética Espermática

Na Tabela 4 encontram-se as médias dos parâmetros da cinética espermática pós-descongelamento, obtidas pela análise computadorizada e a comparação dessas entre os diferentes diluidores experimentais.

Quase todos os parâmetros da cinética espermática (exceto BCF e LIN) sofreram efeito significativo dos tratamentos e este foi claramente demonstrado pela superioridade ( $P < 0,05$ ) do grupo TRIS+GLI6%, em relação à motilidade espermática total (MTH) e progressiva (MPH), confirmando os resultados obtidos com a avaliação subjetiva da motilidade espermática total.

As médias de MTH e MPH observadas neste estudo foram de 62,3 e 41,3%. Essas médias foram superiores às obtidas em estudos anteriores realizados por Rodello (2006) (50,3% e 21,9%), Maia (2006) (51,2% e 31,4%) e Azevedo (2006) (60,1% e 25,5%).

Corroborando com achados obtidos na avaliação subjetiva da cinética espermática, verificou-se que o efeito ( $P < 0,05$ ) do percentual de glicerol sobre a MTH e MPH, observado entre os diluidores TRIS+GLI3% e TRIS+GLI6%, não se repetiu entre os grupos com trealose (TRIS+GLI3%+TRE, TRIS+GLI6%+TRE) ou trealose mais EDTA (TRIS+GLI3%+TRE+EDTA, TRIS+GLI6%+TRE+EDTA). A hipótese mais provável é a de que o glicerol na concentração de 6% tenha exercido toxicidade celular (BECKER, 2004), quando adicionado aos meios de alta osmolaridade (TRIS+GLI6%+TRE e TRIS+GLI6%+TRE+EDTA), influenciando negativamente os resultados e anulando as diferenças significativas para MTH e MPH observadas entre as concentrações testadas no meio isosmótico (TRIS+3% *versus* TRIS+6%).

Esta hipótese fica mais clara ao se constatar que nenhum efeito benéfico ( $P > 0,05$ ) foi verificado ao adicionar a TRE ao meio com glicerol na concentração de 3% (TRIS+GLI3%+TRE), sobre a MTH e MPH, sendo ainda, esta última característica comprometida ( $P < 0,05$ ) quando a TRE foi associada ao EDTA (TRIS+GLI3%+TRE+EDTA, MP=30,6%), em relação aos grupos TRIS+GLI3%

(MP=42,2%) e TRIS+GLI3%+TRE (MP=42,0%), além do grupo controle (MP=52,5%, TRIS+GLI6%).

TABELA 4. Médias e desvios-padrão dos parâmetros de cinética espermática pós-descongelamento, obtidos através da análise computadorizada, nos diferentes diluidores estudados (TRIS+GLI6%, TRIS+GLI3%, TRIS+GLI3%+TRE, TRIS+GLI6%+TRE, TRIS+GLI3%+TRE+EDTA, TRIS+GLI6%+TRE+EDTA).

Parâmetro	TRATAMENTO					
	TRIS+ GLI3%	TRIS+ GLI6%	TRIS+GLI 3%+TRE	TRIS+GLI 6%+TRE	TRIS+GLI 3%+TRE +EDTA	TRIS+GLI 6%+TRE +EDTA
<b>MTH (%)</b>	60,2 b ± 15,8	73,6 a ± 11,1	62,1 b ± 14,2	59,0 b ± 15,2	55,2 b ± 12,4	55,5 b ± 13,3
<b>MPH (%)</b>	42,2 b ± 14,9	52,5 a ± 09,7	42,0 b ± 17,7	34,4 bc ± 20,9	30,6 c ± 16,8	33,3 bc ± 16,9
<b>VAP (µm/s)</b>	144,7 a ± 16,1	149,0 a ± 15,5	113,6 b ± 20,6	97,4 c ± 27,4	98,3 c ± 27,0	101,8 c ± 21,7
<b>VSL (µm/s)</b>	129,1 a ± 17,8	132,4 a ± 15,9	103,6 b ± 20,7	88,6 c ± 27,4	89,4 c ± 26,4	92,6 c ± 22,0
<b>VCL (µm/s)</b>	211,4 a ± 25,9	219,5 a ± 22,9	162,5 b ± 16,1	141,7 c ± 23,1	141,8 c ± 23,8	146,0 c ± 16,9
<b>ALH (µm)</b>	06,7 a ± 00,9	06,5 a ± 00,8	04,9 b ± 00,5	04,7 b ± 00,5	04,5 b ± 00,3	04,7 b ± 00,6
<b>BCF (Hz)</b>	42,6 ± 02,5	42,1 ± 03,1	43,2 ± 03,0	42,0 ± 02,9	41,2 ± 02,6	41,3 ± 03,0
<b>STR (%)</b>	85,1 b ± 04,1	85,35 a ± 03,2	87,7 a ± 03,4	87,0 ab ± 03,9	87,2 ab ± 03,7	87,0 ab ± 04,2
<b>LIN (%)</b>	58,6 ± 07,8	59,7 ± 06,6	62,7 ± 08,5	60,6 ± 09,9	61,5 ± 08,9	61,8 ± 10,0
<b>RAP (%)</b>	49,5 b ± 16,2	63,0 a ± 11,5	46,9 b ± 18,9	37,9 c ± 22,3	33,8 c ± 17,7	37,0 c ± 18,3

▪ Motilidade total (MTH), motilidade progressiva (MPH), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), velocidade de trajeto (VAP), deslocamento lateral de cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar (BCF), retilinearidade (STR), linearidade (LIN) e espermatozóides rápidos (RAP).

Valores seguidos de letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ).

Os resultados obtidos neste experimento contradizem os relatos de Aisen et al. (2002) que demonstraram que a utilização de um diluidor hipertônico a base de trealose aumentou a viabilidade do sêmen ovino pós-descongelamento. Nesse estudo, a TRE a 100 mOsmol/L foi a concentração com os melhores resultados quando comparada a 50, 200 e 400mOsmol. E ao adicioná-la ao diluidor isotônico (Tris-gema de ovo-glicerol) possibilitou o aumento de 35% de motilidade espermática pós-

descongelamento, em relação ao sêmen congelado no diluidor sem o dissacarídeo. É importante ressaltar que no estudo de Aisen et al (2002) foi utilizado no meio isotônico base, o glicerol na concentração de 3%, semelhante ao grupo isotônico TRIS+3% deste trabalho. Ao compararem-se as médias de motilidade obtidas entre os meios isotônicos, dos respectivos estudos, verificam-se valores superiores para a MTH obtidas no presente estudo ( $\pm 60\%$  versus  $\pm 40\%$ ). Algumas diferenças na composição do diluidor podem justificar as diferenças encontradas entre os resultados. No trabalho de Aisen et al. (2002) foi utilizado um meio diluidor com 10% de gema de ovo, metade da utilizada neste trabalho, o que pode ter conferido ao diluidor menor capacidade crioprotetora. Assim, a adição da TRE ao meio isotônico do referido trabalho contribuiu para implementar a atividade de crioproteção desse, melhorando ( $P < 0,05$ ) os índices de MTH pós-descongelamento. Provavelmente, o meio diluidor isosmótico utilizado neste estudo já tenha propiciado as condições de crioproteção adequadas aos espermatozoides, de forma que a adição da TRE não exerceu nenhum efeito benéfico durante o processo preservação.

De uma forma geral, diversos trabalhos na literatura científica citam o efeito positivo que a adição da trealose aos meios de congelamento tem propiciado aos espermatozoides (AISEN et al., 2000; ABGOALA e TERADA, 2003; AISEN et al., 2005). Entretanto, existem relatos de insucesso com a utilização da trealose para a congelamento do sêmen ovino, como o estudo realizado por Valleriote et al. (2005) e Bittencourt et al. (2007), que não observaram benefício da adição da trealose ao diluidor de congelamento. Esses últimos encontraram, através da análise computadorizada, taxas inferiores ( $P < 0,05$ ) de MTH para o sêmen congelado com adição de 100mOsmol de TRE, comparado com o grupo controle Tris-gema de ovo (20%)-Glicerol (6%), respectivamente, 83% e 67%.

Evidentemente, variações nos protocolos de diluição, descongelamento e rediluição, composição do meio diluidor e concentração da trealose utilizada podem ser responsáveis pelas diferenças observadas na literatura científica.

A criopreservação do sêmen promove uma elevação dos níveis de cálcio intracelular (WATSON, 2000). Esse aumento resulta em disfunção e morte celular (AMANN e PICKETT, 1987; WATSON, 2000). Assim, visando minimizar o efeito deletério do cálcio durante o processo de congelamento, tem-se empregado o EDTA, cuja função principal é a de quelar o cálcio no meio extracelular, diminuindo seu

influxo para o meio intracelular (WATSON, 1981), inibindo, assim, o efeito deletério do cálcio sobre os espermatozóides (AMANN e PICKETT, 1987).

Bakás e Disalvo (1991) e Aisen et al. (2000) demonstraram que atividade de crioproteção da trealose pode ser potencializada quando a mesma é utilizada em conjunto com o EDTA, devido à existência de uma atividade sinérgica importante entre essas substâncias. Aisen et al. (2000) observaram que a adição da TRE (100mOsmol) associada ao EDTA (0,15%) proporcionou maior ( $P < 0,05$ ) taxa de motilidade espermática (59%) em relação ao meio sem os aditivos (48,8%). Os autores justificaram esses achados sugerindo que o  $Ca^{++}$  compete com a TRE, inibindo o seu efeito de estabilização sobre a membrana espermática. Assim, ao adicionar o EDTA ao diluidor este seqüestra o  $Ca^{++}$  no meio extracelular, deixando a TRE livre para exercer sua atividade crioprotetora. Estes resultados discordam dos obtidos no presente experimento, cuja adição do EDTA ao meio com TRE não melhorou ( $P > 0,05$ ) as taxas de MTH como também influenciou negativamente ( $P < 0,05$ ) as taxas de MPH, em relação aos diluidores sem EDTA (TRIS+GLI3%+; TRIS+GLI3%+TRE).

Essas divergências observadas entre os trabalhos, sobre a eficácia da utilização do EDTA para a criopreservação espermática esta relacionada à ocorrência de alguns fenômenos, e entre estes o principal seria o fator de interação entre os componentes do meio diluidor, uma vez que nem sempre a remoção do cálcio do meio extracelular é desejável. Este fato foi observado em estudo que, ao avaliar o efeito da associação EDTA e TRE (AISEN et al., 2005), demonstrou que o diluidor com EDTA ao retirar o cálcio do meio extracelular, inibiu a ação antioxidante da trealose, sugerindo a existência de um efeito positivo da interação entre a trealose e o cálcio, sobre a região polar dos fosfolipídios da membrana espermática.

As médias gerais obtidas neste trabalho para velocidade de trajeto (VAP) e velocidade curvilínea (VCL) foram respectivamente, 117,7 e 170,7 $\mu$ m/s, valores superiores se comparadas com as médias verificadas por Maia (2006) (93,9 e 165,6  $\mu$ m/s) e Azevedo (2006) (93,0; 164,5 $\mu$ m/s). Em relação à velocidade progressiva (VSL) o valor médio obtido entre os grupos deste estudo foi de 106,1 $\mu$ m/s, bem superior a VSL média de 73,2 $\mu$ m/s relatada por Maia (2006). A importância dessas velocidades para a capacidade espermática de fertilizar o oócito *in vivo* ainda não foi claramente evidenciada. Mais importante que a mensuração destes parâmetros é a determinação da relação existente entre eles (retilinearidade,  $STR = VAP/VSL$  e

linearidade,  $LIN = VCL/VSL$ ), que representa a progressividade dos movimentos espermáticos (VERSTEGEN et al. 2002), tendo esta alta correlação com a fertilidade *in vivo* (QARAWI et al., 2002).

O valor médio de deslocamento lateral da cabeça espermática (ALH), mensurado em micrometros ( $\mu m$ ), foi de 5,3 entre os protocolos estudados, inferior ao citado por Maia 2006 (7,5 $\mu m$ ) e Azevedo (2006) (7,4 $\mu m$ ). O ALH é um parâmetro importante, pois é uma das características que podem afetar a produção *in vitro* de embriões (BARLOW et al., 1991) e está relacionada à habilidade do espermatozóide humano em penetrar no muco cervical e de se fundir com o oócito (AITKEN et al., 1985). Entretanto, o aumento do ALH está relacionado à hiperativação espermática, que é uma etapa necessária para a fertilização do oócito (LAMBERT, 1981), sendo utilizada em associação ao VCL, VSL e LIN para mensurar o status de hiperativação dos espermatozóides (VERSTEGEN et al. 2002). Estudos com diferentes espécies (GRUNERT et al., 1989; MORTIMER e MORTIMER, 1990; BURKMAN et al., 1991; MORTIMER e MAXWELL, 1999) têm relatado valores médios de ALH de 7 $\mu m$  a 9 $\mu m$  para subpopulações de espermatozóides hiperativados, valor este superior aos obtidos no presente estudo. Em trabalho com ovinos (MORTIMER e MAXWELL, 1999), que estudou o padrão da cinética do espermatozóide ovino hiperativado, definiu para esta condição, valores médios de  $VCL > 250,0 \mu m/s$ ,  $VSL \leq 100,0 \mu m/s$  e  $ALH_{max} \geq 9,0$ . As médias obtidas neste estudo para VCL, VSL e ALH ficaram fora do padrão definido para os espermatozóides hiperativados. Este fato é importante para avaliação da fertilidade do sêmen congelado, já que a hiperativação espermática é uma etapa posterior do processo de capacitação celular, e este quando ocorrido prematuramente, reduz o tempo de vida útil dos espermatozóides e a sua capacidade de fecundar o oócito (MEDEIROS et al. 2002).

Através dos resultados obtidos pela análise computadorizada da cinética espermática (Tabela 3), pode-se observar que a adição da trealose ao meio de congelação, influenciou negativamente ( $P < 0,05$ ) a capacidade de deslocamento espermático, refletido nos menores índices ( $P < 0,05$ ) de ALH, VAP, VSL e VCL nos diluidores com TRE.

Esses dados vão de acordo com resultado obtido em projeto piloto que antecedeu este estudo (BITTENCOURT et al., 2007), cujos valores da MTH, VCL e ALH foram inferiores ( $P < 0,05$ ) para o sêmen congelado em meio hiperosmótico a base de TRE (100mOsmol), em relação ao meio isotônico (similar sem trealose).



Este fato pode estar relacionado a maior densidade do meio diluidor hipertônico, que influi sobre a capacidade de deslocamento espermático, reduzindo os movimentos (ALH) e as velocidades dos movimentos (VAP, VSL, VCL). Reforçando esta afirmação, Mortimer (1997) relatou que o aumento da densidade do meio externo dos espermatozoides resulta em diminuição da amplitude da onda flagelar. E Amirat et al. (2004) descreveram valores superiores para VCL e VAP em diluidor contendo lipoproteína de baixa densidade, em relação a meio com gema de ovo.

Dessa forma, os resultados das avaliações da cinética espermática ficam comprometidos no meio hipertônico, em relação aos meios isotônicos usados mais comumente, dificultando análises comparativas. Essas diferenças, no entanto, podem não representar alterações espermáticas importantes, como as relacionadas à membrana plasmática ou às organelas, especialmente as mitocôndrias, responsáveis pelo metabolismo energético e que é uma das causas da redução verificada nos parâmetros da cinética espermática. Para tanto, é necessária a utilização de técnicas complementares que possam contribuir para esta conclusão, como a avaliação da integridade e funcionalidade da membrana plasmática e mitocondrial.

Outro achado relevante é a superioridade ( $P < 0,05$ ) das três velocidades espermáticas avaliadas (VAP, VSL e VCL) para o grupo TRIS+GLI3%+TRE em relação aos diluidores com 6% de GLI (TRIS+GLI6%+TRE e TRIS+GLI6%+TRE+EDTA). Esses dados são justificáveis, já que o efeito deletério sobre a motilidade subjetiva e computadorizada, ocasionada pela citotoxicidade da combinação do GLI a 6% em meio hiperosmótico com TRE (Becker, 2004), também pode ter contribuído para a inferioridade ( $P < 0,05$ ) da VAP, VSL e VCL. Estas velocidades também foram inferiores ( $P < 0,05$ ) para o diluidor TRIS+GLI3%+TRE+EDTA, em relação ao TRIS+GLI3%+TRE. Possivelmente, para o diluidor utilizado, o sequestro do  $Ca^{++}$  no meio extracelular pelo EDTA, promoveu efeito indesejável, provavelmente inibindo a ação antioxidante da trealose, resultando nos índices inferiores ( $P < 0,05$ ) das respectivas velocidades (AISEN et al., 2002).

A retilinearidade (STR), uma relação direta entre VSL e VAP em percentagem, estima a proximidade do percurso da célula espermática a uma linha reta, com 100% de correspondência à ótima retilinearidade (VERSTEGEN et al., 2002). Este importante parâmetro, já que define a progressividade dos movimentos

espermáticos, foi a única variável influenciada positivamente ( $P < 0,05$ ) pela adição da TRE ao meio com 3% de GLI (TRIS+GLI3%, 87,7% *versus* TRIS+GLI3%, 85,1%). Essa característica não variou significativamente entre os demais grupos.

As variáveis frequência de batimento flagelar (BCF) e linearidade (LIN) mantiveram-se constantes entre os grupos experimentais, não diferindo estatisticamente. Os valores médios verificados para ambas as características foram de 42,1Hz e 60,8%. Tanto a BCF como LIN são características que sofrem alterações importantes do seu padrão no processo de hiperativação espermática. Além da elevação dos movimentos e da velocidade curvilínea (VCL) e do deslocamento lateral da cabeça (ALH) esse fenômeno é acompanhado por uma redução do batimento flagelar (BCF) e queda marcante da linearidade (LIN) para níveis inferiores ou iguais a 30% (MORTIMER e MAXWELL, 1999). O percentual médio de LIN observado entre os grupos do presente estudo foi quase o dobro desse valor de referência. Assim, baseando-se nos resultados da avaliação computadorizada para ALH, VSL, VCL e LIN, utilizados para traçar o perfil cinético das células hiperativadas, estes forneceram subsídios que sugerem que os diluidores testados neste trabalho proporcionaram níveis de congelabilidade satisfatórios, evitando a ocorrência prematura do processo hiperativação espermática.

#### 3.4. Avaliação Simultânea da Integridade das Membranas Plasmática e Acrossomal e do Potencial da Membrana Mitocondrial.

A associação das sondas fluorescentes FITC-PSA, IP e JC-1 permitiu obter a frequência das subpopulações espermáticas (SBP), verificadas pela avaliação simultânea da integridade das membranas (Tabela 5). Algumas das subpopulações espermáticas (SBP), visualizadas na avaliação em conjunto da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial da membrana mitocondrial do espermatozóide podem ser visualizadas na Figura 5.

As subpopulações encontradas com maior ocorrência foram SBP1 (membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial 11,5%); SBP2 (membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial; 14,6%); SBP5 (membrana plasmática lesada, acrossomo

intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial; 18,5%); SBP6 (membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial; 28,2%); SBP7 (membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e baixo potencial de membrana mitocondrial; 8,8%) e SB8 (membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e alto potencial de membrana mitocondrial; 18,3%). As SBP3 (membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado e alto potencial de membrana mitocondrial) e SBP4 (membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado e baixo potencial de membrana mitocondrial) foram raramente observadas (0,01% e 0,15%, respectivamente).

TABELA 5. Médias e desvios-padrão das frequências das subpopulações espermáticas (SBP), obtidas através da combinação das sondas fluorescentes iodeto de proprídio, aglutinina de *Pisum sativum* conjugada à fluoresceína de isotiocianato (FITC-PSA) e iodeto de 5,5',6,6'tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1), nos diferentes diluidores estudados (TRIS+GL6%, TRIS+GLI3%, TRIS+GLI6% TRIS+GLI3%+TRE, TRIS+GLI3%+TRE, TRIS+GLI3%+TRE+EDTA, TRIS+GLI6%+TRE+EDTA).

Parâmetro	TRATAMENTO					
	TRIS+GLI3%	TRIS+GLI6%	TRIS+GLI3%+TRE	TRIS+GLI6%+TRE	TRIS+GLI3%+TRE+EDTA	TRIS+GLI6%+TRE+EDTA
<b>SBP 1 (%)</b>	12,3 ± 11,3	17,1 ± 15,2	09,1 ± 08,5	11,8 ± 12,3	11,6 ± 13,0	07,2 ± 08,5
<b>SBP 2 (%)</b>	11,8 ± 12,9	18,5 ± 19,8	13,8 ± 10,9	15,5 ± 14,7	12,1 ± 10,6	16,1 ± 14,6
<b>SBP 3 (%)</b>	00,0 ± 00,0	00,0 ± 00,0	00,0 ± 00,2	00,0 ± 00,0	00,0 ± 00,0	00,0 ± 00,2
<b>SBP 4 (%)</b>	00,3 ± 01,1	00,0 ± 00,2	00,1 ± 00,4	00,0 ± 00,2	00,0 ± 00,0	00,3 ± 00,8
<b>SBP 5 (%)</b>	19,5 ± 17,4	15,3 ± 14,6	21,1 ± 22,1	19,0 ± 12,8	19,3 ± 13,9	16,6 ± 15,4
<b>SBP 6 (%)</b>	32,2 ± 18,0	22,6 ± 12,9	28,5 ± 14,8	26,3 ± 14,2	34,2 ± 18,1	24,8 ± 12,1
<b>SBP 7 (%)</b>	07,2 ± 07,1	09,2 ± 10,38	07,8 ± 07,2	10,7 ± 10,8	07,1 ± 07,2	10,6 ± 09,9
<b>SBP 8 (%)</b>	16,1 ± 10,0	17,62 ± 14,9	20,5 ± 13,2	16,7 ± 09,6	16,7 ± 09,7	22,2 ± 12,5

▪ Avaliação simultânea das membranas espermáticas. Subpopulações: **SBP 1** - membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial; **SBP 2** - membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial; **SBP 5** - membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial; **SBP 6** - membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial; **SBP 7** - membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e baixo potencial de membrana mitocondrial; **SBP 8** - membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e alto potencial de membrana mitocondrial;

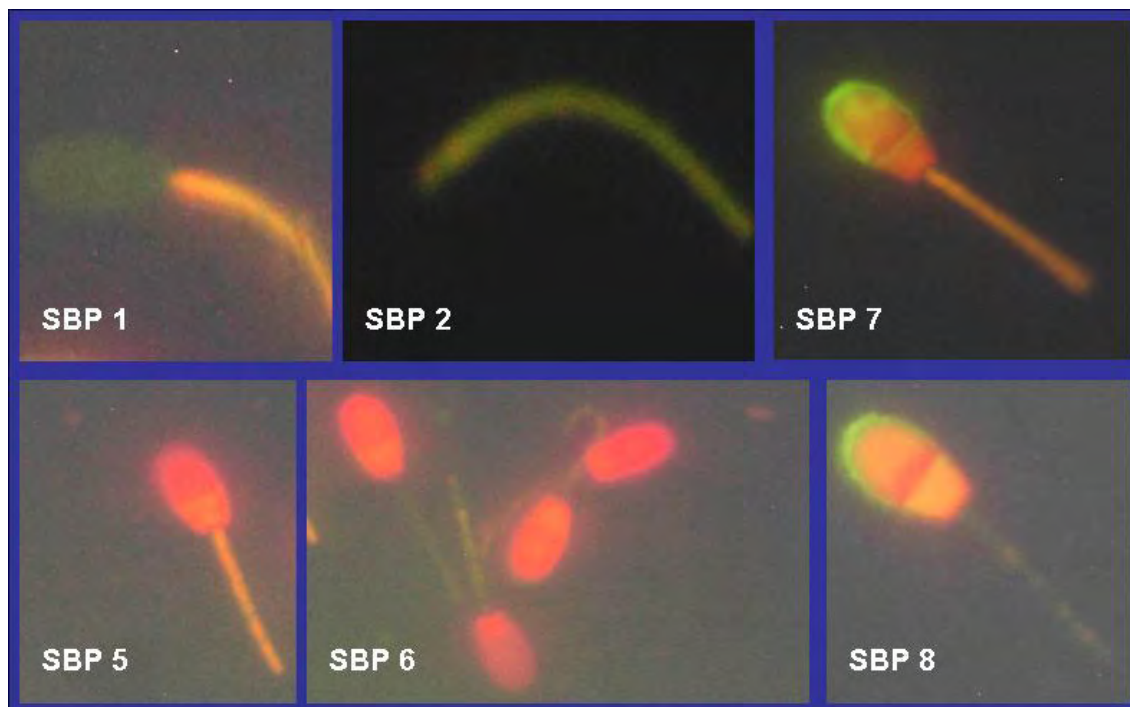
De uma forma geral, apesar das variações numéricas observadas para as SBP, estas não diferiram significativamente entre diferentes protocolos experimentais. Este fato pode ser justificado pela elevada variação da frequência das subpopulações observadas com os espermatozóides congelados nos diferentes diluidores. A ANOVA demonstrou, para as SBP de maior frequência, coeficientes de variação (CV) que se estenderam de 54,1% (SBP6) a 101,7% (SBP1), dentro dos tratamentos. O CV representa a magnitude das variações não controladas no estudo e quanto maior o seu valor maior a instabilidade real dos dados. Coeficientes de variação maiores ou iguais a 30% são considerados muito instáveis (REIS, 2003) e podem comprometer a ANOVA, pois para se obter resultados significativos ( $P < 0,05$ ), a variação das médias entre os tratamentos deve ser maior que dentro dos mesmos, caso contrário compromete-se a ANOVA e conseqüentemente a comparação das médias entre os grupos estudados.

A SBP1 (membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial) é a categoria mais representativa da viabilidade espermática, já que demonstra a integridade estrutural e funcional de todas as estruturas celulares estudadas e seria a subpopulação de espermatozóides em melhores condições de migrar pelo trato genital da fêmea e fertilizar o oócito. Através da ANOVA não foi verificada diferença significativa entre as médias de SBP1 no diferentes tratamentos (Tabela 5). A média geral obtida neste estudo para SBP1 foi de 11,5%, sem variação entre os grupos ( $P > 0,05$ ), um pouco inferior aos 14,9% verificados por Azevedo (2006) com ovinos e aos 16,0% por Celeghini (2005) com bovinos, mas superior aos 0,9% relatados por Maia (2006), também com ovinos. Assim como no presente experimento, todos os trabalhos citados utilizaram em seu protocolo de fluorescência as sondas FITC-PSA, IP e JC-1.

Azevedo (2006) relatou redução em torno de 60,3% de espermatozóides da SBP1 após a criopreservação. Este dado reflete o fato de que apesar da evolução dos protocolos de congelação do sêmen ovino, os níveis de manutenção da viabilidade celular após este processo ainda são muito baixos e devem ser melhorados.

A média geral de espermatozóides da SBP2 (membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial) encontrada foi de 14,6%, e suas respectivas médias entre os tratamentos não diferiram ( $P > 0,05$ ) (Tabela 5). O valor médio de SBP2 observado neste trabalho foi inferior aos 30,27%

citados por Maia (2006) em trabalho com ovinos, e superior aos 6,5% e 7,3% relatados por Azevedo (2006) e por Celeghini (2005) com ovinos e bovinos, respectivamente.



▪ **SBP 1** - membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial; **SBP 2** - membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial; **SBP 5** - membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial; **SBP 6** - membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial; **SBP 7** - membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e alto potencial de membrana mitocondrial; **SBP 8** - membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e baixo potencial de membrana mitocondrial.

**FIGURA 5:** Subpopulações espermáticas (SBP) obtidas na avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial do espermatozóide ovino, visualizadas sob microscopia de epifluorescência (1000x), pelo uso simultâneo da aglutinina de *Pisum sativum* conjugada à fluoresceína de isotiocianato - FITC-PSA), potencial da membrana mitocondrial (PMM, iodeto de 5,5',6,6'tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina - JC-1).

As categorias SPB 3 (membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado e alto potencial de membrana mitocondrial) e SBP4 (membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado e baixo potencial de membrana mitocondrial) tiveram uma baixa frequência neste estudo (0,01% e 0,15%). Relatos semelhantes foram descritos por

Azevedo (2006) (0,2% e 0,3%) e por Celeghini (2005) (0,1% e 0,1%). Como observado pelos autores anteriores, este resultado era esperado, pois usualmente, antes que haja uma lesão acrossomal deve-se ocorrer uma lesão da membrana plasmática (AZEVEDO, 2006). Ou ainda, a lesão do acrossomo ou a ocorrência da criocapacitação, pode ser seguida do processo de permeabilização da membrana plasmática, tornando bem curto o período em que a célula mantém-se impermeável ao IP, o que torna a observação dessas subpopulações raras (CELEGHINI, 2005). Os percentuais médios obtidos para SPB3 e SPB4 nos diferentes grupos experimentais não diferiram significativamente (Tabela 5).

Os achados relacionados ao percentual de SBP5 (membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial) deste estudo (18,5%) foram semelhantes ao verificados por Sousa (2007) (17,8%), (utilizando FITC-PSA; IP e Rodamina123) e bem superiores aos índices encontrados na literatura (com FITC-PSA; IP e JC-1), para diversas espécies e que variaram entre 0,5% (MAIA, 2006), 1,98% (GONZALEZS, 2004) 3,3% (AZEVEDO, 2006) e 5% (CELEGHINI, 2005). Celeghini (2005) sugere como justificativa para os baixos percentuais dessa categoria espermática no seu estudo, que após a lesão da membrana plasmática a homeostase celular é perdida e começam a ocorrer fenômenos que conduzem à morte celular e concluem com a hipótese de que células nesta categoria estariam em uma fase de transição, tendo como próxima etapa a perda da função mitocondrial e motilidade. Entretanto, a lesão mitocondrial pode ser derivada do processo evolutivo da degradação espermática, sendo uma etapa consequente à lesão da membrana plasmática, ou não, como demonstrado por Martinez-Pastor (2004) que não observarem pós-descongelação correlação positiva ( $P > 0,05$ ) entre integridade de membrana plasmática (Hoescht 33258) e redução da atividade mitocondrial (JC-1), sendo esta última realizada por citometria de fluxo com 50 mil eventos a uma taxa de fluxo de 1500 células por segundo.

Azevedo (2006) também demonstrou que os eventos que levam a ocorrência da lesão da MP e redução do PMM podem ocorrer de forma paralela e independente. Este autor observou que ao incubar o sêmen descongelado por duas horas a 37°, houve uma redução significativa ( $P < 0,05$ ) do potencial mitocondrial em alguns protocolos (redução média de 19,5% para 9,2%). O mesmo não foi observado com a integridade da membrana plasmática, que se manteve constante até o final (de 21,8 para 21,7%). Através desses achados pode-se sugerir que a

baixa incidência da SBP5 observada nos estudos citados pode estar mais associada ao protocolo de congelação do sêmen, que de uma forma geral proporcionou índices reduzidos de manutenção do PMM pós-descongelação (de 1,6% a 19,5%), como uma consequência direta das injúrias às mitocôndrias durante o processo de criopreservação (WINDSOR e WHITE, 1995).

De fato, tanto a membrana mitocondrial quanto a membrana plasmática dos espermatozóides são igualmente sensíveis às lesões provocadas pelo processo de criopreservação, fato este que justifica altas correlações positivas geralmente encontradas entre eles. Entretanto, os mecanismos de injúria podem ser independentes, apesar de correlatos, e esta afirmação pode ser confirmada pelas diferenças ( $P < 0,05$ ) observadas entre os índices de PMM e IMP em diferentes momentos pós-descongelação, mesmo com a existência de alta correlação positiva entre eles ( $r = 0,95$  e  $0,88$ ,  $P < 0,0001$ ) (BOLLWEIN, et al., 2008).

A porcentagem média de espermatozóides classificados na categoria SBP 6 (membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial) de 28,2% (Tabela 5) ficou bem próxima aos 22,8%; 28,6% e 26,8% relatados, respectivamente, por Sousa (2007), Maia (2006) e Azevedo (2006), todos em trabalho com ovinos.

Assim como verificado pra SPB 5, a taxa média de espermatozóides na SPB 6 foi numericamente ( $P > 0,05$ ) inferior para o grupo TRIS+GLI6%, em relação aos demais, chegando a valores percentuais próximos a 12% de diferença quando comparado com os espermatozóides congelados no diluidor TRIS+GLI3%+TRE+EDTA (Tabela 5). A elevada instabilidade das médias dentro dos grupos experimentais justifica a ausência de significância estatística, apesar das importantes diferenças numéricas.

As categorias SPB 7 (membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e alto potencial de membrana mitocondrial) e SBP 8 (membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e baixo potencial de membrana mitocondrial) tiveram frequências neste estudo de 8,8% e 18,3% e assim como as demais subpopulações espermáticas o efeito tratamento não foi observado (Tabela 5).

O mesmo comportamento conflitante observado pela SPB 5 neste estudo, em relação ao grande número de relatos na literatura científica, foi observado também para a SPB 7. Os trabalhos citam, para esta subpopulação espermática, percentuais próximos ou abaixo de 1%. Azevedo (2006) sugeriu que quando os níveis de dano

chegam à membrana plasmática, dificilmente a membrana mitocondrial consiga manter concomitantemente sua potencialidade funcional elevada. No entanto, essa afirmação discorda dos achados de Sousa (2007) que encontraram 28,9% e 14,9% de células com lesão da membrana plasmática e espermatozóides com atividade mitocondrial (usando, respectivamente, Rodamina123 e Mototracker Green FM), embora os índices dessa categoria espermática observados com JC-1 tenham sido abaixo de 1%. Papaioannou et al. (1997), através de citometria de fluxo, encontraram um grande percentual de espermatozóides com membrana plasmática lesada emitindo fluorescência moderada à Rodamina 123. Os autores, no entanto, sugeriram ser este achado uma consequência da incapacidade das mitocôndrias lesadas em reter o corante que, em excesso, passa pela membrana lesada, corando o citoplasma celular e emitindo fluorescência de grau moderado. Em contraponto, assim como no presente estudo, também observaram um percentual de células com membrana plasmática lesada e com alta atividade mitocondrial, próximo a 10%. Os autores classificaram esta subpopulação espermática como células moribundas, que inicialmente tinham a capacidade de acumular o corante nas mitocôndrias e de retê-lo durante o processo seguinte de degeneração e morte celular.

A subpopulação classificada como SBP 8 representa a pior configuração do status estrutural e funcional do espermatozóide, já que contém injúrias em todas as estruturas analisadas (membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial). A sua frequência média de 18,8% neste estudo ficou abaixo do verificado em trabalhos anteriores com ovinos de 25,8%; 39,7% e 46,9%, para Maia (2006), Sousa (2007) e Azevedo (2006), respectivamente, e 46,6% (GONZALEZ, 2005) e 36,0% (CELEGHINI, 2005), para bovinos. Os índices inferiores obtidos para esta categoria neste estudo podem ser justificados, pois quase 9% das células com lesão da membrana plasmática e acrossomal foram classificadas na SPB 7, devido o PMM, enquanto que nos trabalhos citados o índice de células com lesão das membranas plasmática e acrossomal ficaram concentradas na categoria SBP8.

O grupo experimental TRIS+GLI6%+TRE+EDTA obteve os piores resultados numericamente ( $P>0,05$ ), o, já que propiciou os menores percentuais de espermatozóides classificadas na SPB 1, que são as células com melhor status funcional e/ou estrutural, como também proporcionou os maiores percentuais de espermatozóides da categoria SPB 8, célula de maior representatividade da



inviabilidade espermática, pois apresenta lesões em todas as estruturas estudadas. Esses resultados podem vir a confirmar as observações feitas nas análises anteriores, que foram afetadas de forma negativa, provavelmente, pela citotoxicidade da combinação do GLI a 6% em meio hiperosmótico com TRE (BECKER, 2004), como também pelo efeito prejudicial do EDTA ao captar o  $\text{Ca}^{++}$  do meio, inibindo a ação antioxidante da trealose, o que resultou em índices inferiores da cinética espermática, bem como da integridade das membranas espermáticas.

### 3.5. Avaliação Individual da Integridade das Membranas Plasmática e Acrossomal e do Potencial da Membrana Mitocondrial

Para esta avaliação, os resultados obtidos com a associação das sondas fluorescentes FITC-PSA, IP e JC-1 foram individualizados em três categorias distintas: integridade de membrana plasmática (IMP), composta pelo percentual de espermatozóides com membrana plasmática íntegra (soma das subpopulações SBP 1, SBP 2, SBP3 e SBP4); integridade acrossomal (IAC) representando o percentual de espermatozóides com membrana acrossomal íntegra (soma das subpopulações SBP 1, SBP 2, SBP5 e SBP6) e potencial de membrana mitocondrial (PMM) que representou o percentual de espermatozóides com alto potencial de membrana mitocondrial (soma das subpopulações SBP 1, SBP 3, SBP5 e SBP7).

Diferentemente do observado para a ANOVA das SBP, os valores médios obtidos para IMP e IAC dentro dos grupos se comportaram de forma mais estáveis (CV = 39,3% e 14,4%) e refletiram no efeito significativo ( $P < 0,05$ ) dos tratamentos sobre essas variáveis (Anexo I). O PMM foi mais instável (CV= 62,5%) e as diferenças numéricas das médias obtidas não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre os grupos experimentais.

Os percentuais médios obtidos para IMP, IAC e PMM e a comparação destes entre os grupos estudados podem ser visualizados na Tabela 6. Através desta, pode-se observar que o diluidor convencional TRIS+GLI6% proporcionou os melhores ( $P < 0,05$ ) índices de integridade da membrana plasmática entres os grupos testados (35,8%).

Este índice foi superior aos 29,7% (MAIA, 2006) e 21,8% (AZEVEDO, 2006) em trabalhos com ovinos, utilizando meio diluidor semelhante (Tris-gema de ovo glicerol)

e inferior aos 50,9% relatados por Sousa (2007), também com ovinos, mas utilizando meio de congelação a base de glicina-gema-leite. Os autores anteriores também utilizaram para a avaliação, a associação das sondas fluorescentes IP, FITC-PSA e JC-1.

Os resultados de IMP verificados neste estudo se comportaram de forma semelhante aos observados pela MTS, MPS, MTH e MPH, os quais foram significativamente superiores para o diluidor TRIS+GLI6%, em relação a todos os demais grupos, aditivados ou não de TRE e TRE+EDTA (Tabela 6).

TABELA 6. Médias e desvios-padrão das frequências de espermatozoides com membrana plasmática (IMP) e acrossomal íntegras (IAC) e com alto potencial da membrana mitocondrial (PMM), obtidas através da combinação das sondas fluorescentes iodeto de proprídio, aglutinina de *Pisum sativum* conjugada à fluoresceína de isotiocianato (FITC-PSA) e iodeto de 5,5',6,6'tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1), nos diferentes diluidores estudados (TRIS+GLI3%, TRIS+GLI6%, TRIS+GLI3%+TRE, TRIS+GLI6%+TRE, TRIS+GLI3%+TRE+EDTA, TRIS+GLI6%+TRE+EDTA).

Parâmetro	TRATAMENTO					
	TRIS+GLI3%	TRIS+GLI6%	TRIS+GLI3%+TRE	TRIS+GLI6%+TRE	TRIS+GLI3%+TRE+EDTA	TRIS+GLI6%+TRE+EDTA
IMP (%)	24,5 b ± 13,3	35,8 a ± 16,1	23,1 b ± 08,0	27,4 b ± 12,6	23,7 b ± 10,5	23,7 b ± 09,5
IAC (%)	76,0 a ± 10,6	73,8 ab ± 14,7	72,67 ab ± 11,5	72,7 ab ± 13,2	77,3 a ± 11,5	65,5 b ± 10,3
PMM (%)	39,1 ± 29,2	41,7 ± 32,3	38,1 ± 32,4	41,6 ± 28,9	38,1 ± 27,9	33,9 ± 31,1

Valores seguidos de letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ).

No entanto, trabalhos têm relatado que a adição da trealose melhora os índices de manutenção da integridade da membrana plasmática. Abgoala e Terada (2003) observaram que a substituição integral do meio Tris-gema de ovo por uma solução de TRE (375mOsmol) aumentou significativamente as taxas de fluidez de membrana, melhorando os índices de congelabilidade do sêmen caprino. Hu et al. (2009) com suínos, ao adicionar diferentes concentrações de TRE (25 a 200mOsmol/Kg) ao meio isotônico, obteve melhor nível manutenção da IMP (teste hiposmótico) com 100mOsmol de TRE, em relação ao meio isotônico e aos demais grupos. Da mesma forma e utilizando o mesmo método de avaliação, Aisen et al. (2002) verificaram uma melhoria dos níveis de IMP dos espermatozoides ovinos, além de taxas de nascimento duas vezes e meia superior com um meio

hiperosmótico enriquecido com de 100mOsmol de TRE (semelhante ao grupo TRIS+GLI3%+TRE), em relação ao grupo isosmótico sem TRE (semelhante ao grupo TRIS+GLI3%). Em trabalho posterior utilizando os mesmos grupos experimentais (meio isosmótico *versus* TRE 100mOsmol), Aisen et al. (2005) encontraram maiores níveis de IMP, avaliada por microscopia eletrônica, com o diluidor com TRE, em relação ao sem TRE (72,6% *versus* 33,4%). É importante ressaltar que o diluidor isosmótico utilizado no estudo citado era diferente ao utilizado no presente estudo, com metade (10%) dos percentuais de gema de ovo, o que pode ter conferido menor proteção espermática e justificar a congelabilidade inferior entre os diluidores testados. E a ausência da diferença significativa entre os grupos com 3% de GLI, com e sem TRE (TRIS+GLI3% *versus* TRIS+GLI3%+TRE) verificado no presente estudo, provavelmente, estaria no fato de que composição do meio isosmótico testado aqui tenha proporcionado níveis de proteção à membrana plasmática que substituem a utilização da TRE, não justificando o seu uso.

Resultados conflitantes no mesmo trabalho também têm sido reportados, como os de Valente et al. (2009), que apesar de ter obtido com a eosina nigrosina índices superiores ( $P < 0,05$ ) de integridade de membrana plasmática (66,5% *versus* 59,8%), para o sêmen ovino congelado em meio hiperosmótico com trealose e menores níveis de gema de ovo (G1: 15% de gema *versus* G2: 4,5% de gema mais 88mOsmol de TRE), verificou para este, taxas inferiores ( $P < 0,05$ ) de integridade da membrana plasmática pelo teste hiposmótico (32,1% *versus* 40,6%). E os resultados com a TRE foram ainda piores ( $P < 0,05$ ) no teste *in vivo*, refletido nos baixos índices de fertilidade das fêmeas inseminadas (3,8% *versus* 20,5%).

A ausência de efeito positivo ou negativo da adição da TRE ao meio de congelamento isosmótico, sobre os níveis de IMP, já foi relatado anteriormente (VALLERIOTE et al., 2005, BITTENCOURT et al., 2007, BUCAK et al., 2007).

O efeito deletério da combinação do GLI a 6% em meio hiperosmótico com TRE (TRIS+GLI6%+TRE; TRIS+GLI6%+TRE+EDTA), assim como observado para a maioria dos parâmetros da cinética espermática, também se refletiu sobre os índices inferiores de IMP ( $P < 0,05$ ), em relação ao meio isotônico com a mesma concentração de GLI (TRIS+GLI6). O efeito negativo do GLI em altas concentrações no meio hiperosmótico já havia sido reportado por Becker (2004) que observou maiores ( $P < 0,05$ ) níveis de IMP, no sêmen caprino congelado em meio

hiperosmótico com sacarose a 375mOsmol e 1,7 ou 3,4% de GLI, comparados a 6,8%.

Bakás e Disalvo (1991) defendem a hipótese que o  $\text{Ca}^{++}$ , por competir com a TRE pelos mesmos sítios de ligação na membrana plasmática, inibe a sua atividade crioprotetora. Desta forma, a atividade de crioproteção da TRE poderia ser potencializada quando a mesma é utilizada em conjunto com o EDTA, pois este seqüestra o  $\text{Ca}^{++}$  extracelular, deixando a TRE livre para exercer em plenitude a sua atividade crioprotetora (BAKÁS e DISALVO, 1991; AISEN et al., 2000). Contudo, a atividade sinérgica entre a TRE e o EDTA observada por Aisen et al. (2000) não foi demonstrada neste estudo, cuja adição do EDTA aos diluidores com TRE, independente da concentração de GLI, não proporcionou melhoras significativas ( $P>0,05$ ) na IMP. Em trabalho posterior, Aisen et al. (2005) obtiveram resultados que contradisseram os seus achados anteriores, cujos percentuais de células com IMP, obtidos por microscopia eletrônica e teste hiposmótico, foram inferiores para o diluidor com a associação TRE+EDTA (72,6 % *versus* 40% e 64% *versus* 40,3%). Os autores sugeriram, como justificativa para os dados verificados neste último estudo, que o EDTA, ao retirar o cálcio do meio extracelular, inibiu a ação antioxidante da trealose, que é favorecida pela interação com o  $\text{Ca}^{++}$ .

Os índices de integridade da membrana acrossomal (IAC) ficaram bem próximos entre os diluidores estudados (de 65,5 a 77,3%), mas sofreu influência do tratamento pela ANOVA (Anexo I). O percentual médio de IAC obtido neste experimento (71,3%) foi semelhante ao observado por Sousa (2007) (73,3%) e superior aos encontrados por Maia (2006) e Azevedo (2006) de 59,9% 51,5%, respectivamente. Todos esses estudos foram com ovinos e utilizaram a associação FITC-PSA para avaliação da IAC.

As médias de IAC foram superiores ( $P<0,05$ ) para os grupos TRIS+GLI3% e TRIS+GLI3%+TRE+EDTA, em relação ao TRIS+GLI6%+TRE+EDTA e semelhante entre os demais (Tabela 6). Os menores níveis de IAC observados pelo TRIS+GLI6%+TRE+EDTA devem estar relacionados à soma de dois fatores negativos já discutidos nos itens anteriores deste trabalho. A citotoxicidade exercida pela combinação do GLI a 6% em meio hiperosmótico, como também o efeito prejudicial do EDTA, quando associado ao meio diluidor com TRE.

Ao compararem-se os índices de IMP e IAC, indiferentemente dos tratamentos, pode-se constatar ser este último parâmetro mais resistente às injúrias

provocadas pelo processo de criopreservação. Essa afirmação corrobora com os diversos achados na literatura, com diferentes espécies, que relatam reduções muito inferiores nos níveis de IAC em relação à IMP, após o processo de congelação-descongelação (MAIA, 2006; AZEVEDO, 2006; CELEGHINI et al., 2008; VALENTE et al., 2009) o que justifica seus índices superiores.

A adição a TRE, exceto para o grupo TRIS+GLI6%+TRE+EDTA, não exerceu efeito sobre os níveis de IAC nos diluidores testados (Tabela 6). Relatos similares foram feitos por Aisen et al. (2000); Aisen et al. (2002) e Valente et al. (2009) que não observaram diferenças nos percentuais de células com lesões acrossomais na microscopia de contraste de fase, após congelação em meio hiperosmótico com TRE ou em meio isotônico. Estes achados discordam dos relatados por Hu et al. (2009), que utilizando a FITC-PNA detectaram maiores níveis de IAC nos espermatozoides congelados com diferentes concentrações de TRE (25 a 200mOsmol) que no meio sem TRE.

Os altos níveis de cálcio estão relacionados à ocorrência de alterações no acrossomo espermático e exercem papel importante no processo de reação acrossomal (ROLDAN et al., 1994), que pode ser inibido na presença do EDTA, ao quelar o  $Ca^{++}$  no meio extracelular impedindo seu influxo. No entanto, a adição do EDTA aos diluidores de congelação testados não influenciou ( $P>0,05$ ) os índices de IAC. Bittencourt et al. (2008) utilizando microscopia de contraste de fase, também não verificaram melhorias nas taxas de integridade acrossomal com a utilização de 0,1% de EDTA no meio de congelação do sêmen caprino, embora tenha obtido uma redução do número de defeitos espermáticos totais. Da mesma forma Aisen et al. (2000) obtiveram índices similares de lesão de acrossomo no sêmen congelado em meio com ou sem EDTA, tendo verificado apenas efeito positivo do EDTA sobre a integridade acrossomal, quando associado à TRE. As diferenças obtidas entre os trabalhos podem estar relacionadas a diversos fatores como a composição do meio diluidor, já discutido anteriormente. A qualidade e taxa do processo de resfriamento também podem influenciar na eficácia da utilização do quelante de cálcio EDTA, já que o aumento do influxo de  $Ca^{++}$  para a célula é maximizado na proporção em que se reduz a temperatura (ROBERTSON e WATSON, 1986). Provavelmente, taxas de resfriamento adequadas, que minimizem o processo de estresse térmico pelo frio, podem evitar o influxo exacerbado de  $Ca^{++}$ , de forma que a adição do quelante EDTA não surte efeito positivo.

Não foi verificado efeito significativo do tratamento pela ANOVA sobre o parâmetro PMM (Anexo I).

O percentual médio de PMM obtido neste trabalho foi de 38,8%, índice superior aos verificados por Martinez-Pastor et al. (2004) – 23,3%; Maia (2006) – 1,6% e Azevedo (2006) – 19,5%, todos trabalhando com ovinos e aos obtidos por Gonzalez (2004) – 18,03%, Bollwein et al. (2008) – 23,8% e Celeghini (2005) – 1 a 5%, com bovinos. Índices superiores de PMM aos deste estudo foram relatados por Connell et al (2002) – 39,8% com humanos e Nascimento (2006) – 44,6% com equinos. Ressalta-se que todos os estudos citados utilizaram a JC-1 para avaliação do PMM, exceto Connell et al. (2002) que trabalhou com Rodamina123.

Os percentuais médios obtidos nos diferentes tratamentos foram semelhantes entre si ( $P>0,05$ ) e podem ser observados na Tabela 6. Assim como aconteceu para a IMP e IAC, a adição da TRE não implementou ( $P>0,05$ ) os índices de PMM. De forma semelhante, a associação TRE+EDTA não exerceu efeito ( $P>0,05$ ) sobre a PMM, o que também não era esperado, já que o influxo de cálcio intracelular derivado do processo de resfriamento do sêmen promove a ativação das fosfolipases, ocorrendo hidrólise dos fosfolipídios da membrana espermática. Tanto as alterações provocadas aos fosfolipídios, como a formação de ácidos graxos livres, acarretam um aumento da permeabilidade e lesão da membrana mitocondrial (AMANN e PICKETT, 1987). A adição do EDTA ao diluidor de congelação deveria minimizar esse processo, melhorando os níveis de PMM, pois captaria o cálcio extracelular impedindo seu influxo. As justificativas utilizadas anteriormente para ausência de efeito da utilização do EDTA nos diluidores aqui testados, também se adequam para os níveis de PMM.

De forma semelhante à IAC, os menores valores numéricos ( $P>0,05$ ) de PMM ocorreram para o sêmen congelado com o grupo TRIS+GLI6%+TRE+EDTA, reforçando a baixa congelabilidade conferida pela combinação dos seus componentes nas concentrações utilizadas.

### 3.6. Correlações Entre os Parâmetros Espermáticos Estudados

Os coeficientes de correlação linear obtidos pelo teste de *Pearson*, entre todos os parâmetros de cinética espermática e os de integridade das membranas espermáticas podem ser observados nas Tabelas 7 a 9.

Como esperado, os parâmetros subjetivos da cinética espermática apresentaram elevadas correlações e altamente significativas com os parâmetros da cinética espermática obtidos pela análise computadorizada (Tabela 7). É interessante ressaltar a alta correlação entre o VIG e as velocidades espermáticas VSL, VAP e VCL ( $r \geq 0,65$ ;  $P < 0,0001$ ). Isso demonstra que a análise subjetiva ainda é uma ferramenta importante de avaliação, principalmente em condições em que o custo do analisador seminal computadorizado é um fator limitante.

TABELA 7. Coeficientes de correlação de Pearson verificados entre os parâmetros de cinética espermática.

	MTS	MPS	VIG	MTH	MPH	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
<b>MTS</b>	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>MPS</b>	0,97***	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>VIG</b>	0,52***	0,50***	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>MTH</b>	0,94***	0,93***	0,41***	1,00***	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>MPH</b>	0,87***	0,86***	0,65***	0,82***	1,00***	-	-	-	-	-	-	-
<b>VAP</b>	0,54***	0,52***	0,80***	0,41***	0,73***	1,00***	-	-	-	-	-	-
<b>VSL</b>	0,54***	0,53***	0,80***	0,42***	0,76***	0,99***	1,00	-	-	-	-	-
<b>VCL</b>	0,46***	0,46***	0,65***	0,36***	0,54***	0,89***	0,84***	1,00	-	-	-	-
<b>ALH</b>	0,19*	0,20*	0,25**	0,14	0,08	0,47***	0,37***	0,77***	1,00	-	-	-
<b>BCF</b>	0,08	0,09	-0,14	0,06	0,10	0,03	0,33	0,18*	0,20	1,00	-	-
<b>STR</b>	0,35***	0,34***	0,27**	0,31**	0,59***	0,27	0,38***	-0,07	-0,52***	0,02	1,00	-
<b>LIN</b>	0,38***	0,38***	0,25***	0,31**	0,67***	0,48	0,58***	0,08	-0,48***	-0,20*	0,88***	1,00
<b>RAP</b>	0,89***	0,88***	0,66***	0,84***	0,98***	0,33**	0,77***	0,62***	0,20	0,09	0,48***	0,58***

▪ Coeficientes de correlação obtidos pelo teste de correlação linear de *Pearson*. Na linha e na coluna: Motilidade total subjetiva (MTS, %), motilidade progressiva subjetiva (MPS, %), motilidade total computadorizada (MTH), motilidade progressiva computadorizada (MPH), velocidade progressiva (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade curvilínea (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade de trajeto (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), deslocamento lateral de cabeça (ALH,  $\mu\text{m}$ ), freqüência de batimento flagelar (BCF, Hz), retilinearidade (%) e linearidade (%).

\*  $P < 0,05$

\*\*  $P < 0,01$

\*\*\*  $P < 0,0001$

Também foram verificadas correlações positivas e significativas ( $P < 0,05$ ) entre as motilidades subjetivas e computadorizadas (MTS, MPS, MTH e MPH), em relação às velocidades espermáticas (VAP, VSL e VCL) e os parâmetros que indicam a progressividade dos movimentos (STR e LIN). Fato semelhante foi descrito por Al-Qarawi et al. (2002). Entretanto, diferente deste estudo, os autores encontraram correlações positivas ( $P < 0,05$ ) entre o ALH e as motilidades obtidas pela análise computadorizada (CASA). Esse fato pode ser justificado, pois o padrão de ALH é fortemente influenciado pelo meio diluidor utilizado, como ocorreu neste estudo com os diluidores hiperosmóticos e como observado por Mortimer e Maxwell (2004) que relataram maior ALH para os espermatozoides ovinos descongelados e resuspendidos em PBS com BSA. Com o padrão de ALH alterado, a relação existente entre este e os demais parâmetros podem ser influenciados. O ALH guarda relação inversa com a qualidade e progressividade do movimento espermático e este fato ficou caracterizado pelas correlações negativas e altamente significativas entre este e o STR e LIN. Na verdade não se sabe até que ponto esta afirmação pode ser feita, pois não existem limites estabelecidos para se determinar padrão ideal de ALH e em que níveis podem interferir no movimento progressivo do espermatozoide ou mesmo na capacidade deste de atravessar o trato reprodutivo feminino e alcançar o sítio de fertilização (CELEGHINI, 2005). Esta afirmação pode ser reforçada pelos resultados de Al-Qarawi et al. (2008) ao relatar correlação positiva entre o ALH e as variáveis LIN e STR no sêmen *in natura* de bovinos.

A frequência de batimento flagelar apresentou apenas uma discreta correlação positiva ( $P < 0,05$ ) com o VCL e negativa com a LIN.

A interação entre os parâmetros de cinética e integridade das membranas espermáticas foi estudada (Tabela 8) e algumas observações importantes devem ser feitas. A integridade da membrana plasmática, verificada pelo teste supravital com corante eosina (SV) demonstrou correlação positiva e altamente significativa ( $P < 0,0001$ ) com as motilidades espermáticas subjetivas e computadorizadas, demonstrando ser este um teste eficaz para avaliação do percentual de células móveis e que, pelo seu baixo custo e praticidade, pode ser facilmente implementada nas atividades de campo e pesquisa.

O mesmo pôde ser verificado para o parâmetro IMP avaliada pela microscopia de fluorescência, que também apresentou correlações positivas, com ambas as motilidades subjetivas (MTS e MPS) e com a motilidade total



computadorizada (MTH), embora não tenha apresentado correlação com a MPH. Correlações positivas entre motilidade espermática total e IMP também foram citadas por Celeghini et al. (2008), os quais verificaram coeficientes de correlação de 91% ( $P < 0,05$ ). Estas correlações são esperadas, já que a integridade estrutural e funcional da membrana plasmática dos espermatozoides é fundamental para a manutenção da sua viabilidade e do metabolismo celular, que é refletido no percentual de células móveis.

TABELA 8. Coeficientes de correlações de Pearson observados entre os parâmetros de cinética espermática e os de integridade das membranas espermáticas.

	MTS	MPS	VIG	MTH	MPH	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
<b>SV</b>	0,49***	0,47***	0,02	0,56***	0,36***	0,01	0,02	-0,04	-0,09	-0,05	0,17*	0,10
<b>IMP</b>	0,27**	0,27**	-0,02	0,30**	0,09	0,002	-0,02	0,14	0,22*	0,06	-0,18*	-0,24**
<b>IAC</b>	0,21*	0,18*	0,08	0,26**	0,23*	0,07	0,10	-0,01	-0,14	-0,15	0,24**	0,21*
<b>PMM</b>	-0,04	-0,09	0,32**	-0,08	0,15	0,33**	0,35***	0,19*	-0,09	-0,15	0,23*	0,37***

▪ Coeficientes de correlação obtidos pelo teste de correlação linear de *Pearson*. Na linha: Motilidade total subjetiva (MTS, %), motilidade progressiva subjetiva (MPS, %), motilidade total computadorizada (MTH), motilidade progressiva computadorizada (MPH), velocidade progressiva (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade curvilínea (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade de trajeto (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), deslocamento lateral de cabeça (ALH,  $\mu\text{m}$ ), frequência de batimento flagelar (BCF, Hz), retilinearidade (%) e linearidade (%). Na coluna integridade da membrana plasmática pelo teste supravital eosina (SV) e integridade da membrana plasmática (IMP) e acrossomal (IAC) e alto potencial da membrana mitocondrial (PMM), observados pela associação das sondas fluorescentes IP, FITC-PSA e JC-1 (aumento de 1000X).

\*  $P < 0,05$

\*\*  $P < 0,01$

\*\*\*  $P < 0,0001$

Um fato observado neste estudo que chama a atenção é a correlação negativa ( $P < 0,05$ ) entre a IMP e os parâmetros que estimam a progressividade do movimento celular LIN e STR. Esses achados contradizem os resultados obtidos neste mesmo estudo, que revelaram correlação positiva ( $P < 0,05$ ) entre a IMP e as motilidades progressiva subjetiva e computadorizada. De qualquer forma essa correlação negativa pode ser entendida como um fator negativo, já que as variáveis LIN e STR são utilizadas para caracterizar qualidade do movimento espermático e a

IMP para determinar viabilidade estrutural e funcional dos espermatozoides, de forma que seus valores deveriam se comportar de forma diretamente proporcional.

Como ocorreu com o SV e a IMP a integridade da membrana acrossomal (IAC) apresentou correlação significativa com as motilidades espermáticas subjetivas e computadorizadas ( $P < 0,05$ ). Este resultado também era esperado e justificável, já que para que ocorram as alterações na membrana acrossomal, possivelmente a membrana plasmática já foi lesada, pois esta é muito mais sensível às injúrias provocadas pelo processo de criopreservação que a membrana acrossomal, comprometendo o metabolismo celular e interferindo na motilidade espermática. E ao contrário do verificado para IMP observou-se para IAC correlações positivas ( $P < 0,05$ ) com a STR e LIN.

O PMM correlacionou-se positivamente ( $P < 0,05$ ) com o VIG, VSL, VCL, STR e LIN. Correlações entre do PMM com VSL, VCL e LIN também foram descritas anteriormente por Connell et al. (2002) para o sêmen *in natura* de homens. Entretanto, após a criopreservação essas correlações na sua maioria desapareceram e restringiram-se a MP, LIN e uma tendência para VCL ( $P = 0,06$ ), revelando que o sêmen congelado, após as alterações sofridas durante a preservação comporta-se de forma diferente em relação as suas características e as respectivas interações entre elas. Assim como Connell et al. (2002), Martinez-Pastor et al. (2004), em trabalho com ovinos, Gonzalez (2005) e Celeghini et al. (2008) com bovinos, encontraram correlações significativas entre PMM e as motilidades espermáticas, discordando dos achados apresentados neste trabalho. Essa diferença entre os trabalhos pode-se explicar, pois no presente estudo as células com PMM não se restringiram às subpopulações espermáticas com membrana plasmática íntegra e conseqüentemente com motilidade espermática, como verificado na grande parte dos trabalhos consultados. De forma que a correlação entre o percentual de células móveis e PMM pode ter sido influenciada.

A correlação positiva ( $P < 0,05$ ) entre PMM e a avaliação subjetiva VIG verificada neste experimento também foi observada por Gonzalez (2004) e Celeghini (2005), com elevado coeficiente e alta significância ( $r = 0,66$ ;  $P < 0,0001$ ). Este dado é importante, pois faz da avaliação subjetiva do VIG um bom parâmetro para estimar, em condições de restrições estruturais e de equipamentos, o status funcional mitocondrial.

As correlações positivas ( $P < 0,05$ ) verificadas entre PMM e STR e PMM e LIN evidenciam a hipótese de que as células que conseguiram passar pelo processo deletério da criopreservação e mantiveram um adequado status funcional das mitocôndrias, conseguem de forma mais adequada, manter o padrão de motilidade celular fisiológico da espécie, com predominância da progressividade.

Na Tabela 9 estão descritos os coeficientes de correlação obtidos entre os parâmetros da integridade das membranas espermáticas (SV, IMP, IAC e PMM). Pode-se verificar a ocorrência de correlação positiva ( $P < 0,05$ ) entre SV e IMP. As correlações positivas e significativas de SV com as motilidades espermáticas e verificadas também entre SV e IMP reafirmam a importância desse teste para estimar a viabilidade espermática, principalmente pelo baixo custo e praticidade do mesmo.

A correlação positiva ( $P < 0,05$ ) evidenciada entre SV e IAC também foi demonstrada entre IMP e IAC. Os mecanismos de ocorrência das alterações acrossomais estão intimamente relacionados aos da membrana plasmática, sejam eles relacionados às injúrias diretas provocadas pelo processo de criopreservação (variação osmótica, desidratação e formação de macrocristais intracelulares) ou pelo processo cronológico de degradação celular, relacionados à criocapacitação (GREEN e WATSON, 2001). Isso explicaria a correlação positiva entre esses parâmetros, já relatada anteriormente (GONZALEZ, 2004).

TABELA 9. Coeficientes de correlações de Pearson, observados entre os parâmetros de integridade das membranas espermáticas.

	SV	IMP	IAC	PMM
SV	1,00	-	-	-
IMP	0,24**	1,00	-	-
IAC	0,32**	0,43***	1,00	-
PMM	-0,13	-0,14	0,03	1,00

▪ : Coeficientes de correlação obtidos pelo teste de correlação linear de *Pearson*. Na linha e na coluna: Integridade da membrana plasmática pelo teste supravital eosina (SV) e integridade da membrana plasmática (IMP) e acrossomal (IAC) e alto potencial da membrana mitocondrial (PMM), observados pela associação das sondas fluorescentes IP, FITC-PSA e JC-1 (1000X).

\*  $P < 0,05$

\*\*  $P < 0,01$

\*\*\*  $P < 0,0001$

Não foi observada neste estudo, correlação significativa entre o PMM e os demais parâmetros de integridade das membranas espermáticas (Tabela 9). Martinez-Pastor et al. (2004) também reportaram a ausência de correlação entre PMM e IMP, avaliados pela combinação do Hoescht 258 e JC-1. Entretanto, discordando desses achados Gonzalez (2004) e Bollwein et al. (2008) verificaram elevadas correlações positivas ( $r > 0,90$ ,  $P < 0,05$ ) entre IMP e PMM. No presente trabalho, assim como relatado por Sousa (2007), um importante percentual das células com PMM também apresentavam lesão da membrana plasmática, sendo estas classificadas por Papaioannou et al. (1997) como células moribundas (em degeneração), o que pode ter influenciado a ausência de correlação entre PMM e IMP.

#### 4. CONCLUSÕES

Levando-se em consideração os resultados obtidos com este experimento podem-se chegar às seguintes conclusões:

O diluidor isosmótico, com glicerol na concentração de 6%, foi mais eficaz para a manutenção da viabilidade espermática de ovinos, quando comparado ao diluidor similar, com o glicerol na concentração de 3%;

A adição da trealose ao meio com glicerol a 6% influenciou negativamente os parâmetros espermáticos pós-descongelamento.

Os meios diluidores adicionados de trealose ou desta associada ao EDTA não melhoraram os índices de congelabilidade do sêmen ovino e promoveram efeito deletério sobre os parâmetros da cinética espermática ovina;

Os resultados obtidos com os testes *in vitro* permitem concluir com segurança que o diluidor isosmótico com glicerol a 6% foi o mais eficaz para manutenção dos índices de viabilidade do sêmen ovinos pós-descongelamento;

A análise subjetiva da cinética espermática e o estudo da integridade da membrana plasmática através do teste supravital com eosina podem ser utilizadas como técnicas de análise da qualidade seminal, quando há limitação da utilização de métodos mais avançados, pois, apresentam correlações significativas com diversos métodos de avaliação da viabilidade da célula espermática ovina.

## 5. REFERÊNCIAS:

ABOAGLA, E.M., TERADA, T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1245–1250, 2003.

AITKEN, R.J., SUTTON M., WANER P., RICHARSON, D.W. Relationship between the movements characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona free hamster oocytes. **J. Reprod. Fertil.** 73:441-449, 1985.

AISEN, E.G.; ALVAREZ, H.L.; VENTURINO A.; GARDE, J.J. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. **Theriogenology**, v.53, n.5, p.1053-61, 2000.

AISEN, E.G.; MEDINA V.; VENTURINO A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. **Theriogenology**, v.57, n.7, p.1801-1808, 2002

AISEN, E.G., QUINTANA M, MEDINA V, MORELLO H, VENTURINO A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. **Cryobiology**, v.50, n.3 , p.239-249, 2005.

AI-QARAWI, A. A; ABDEL-RAHMAN, H. A.; EI-MOUGY, S.A. and EI-BELELY, M.S. Use of a new computerized system for evaluation of spermatozoa motility and velocity characteristics in relation to fertility levels in dromedary bulls **Animal Reproduction Science**, v.74, Issues 1-2, p. 1-9, 15 November 2002.

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

AMIRAT, L.; TAINURIER, D.; JEANNAU, L.; THORN, C.; GERARD, O.; COUNTERS, J.L.; ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL. A comparison with Optidyl<sup>®</sup>, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, v.61, p.895-907, 2004.

AZEVEDO, H.C. **Integridade e funcionalidade dos espermatozoides ovinos submetidos à criopreservação após a incorporação de colesterol, demosterol, ácido oléico-linoléico e  $\alpha$ -Lactoalbumina.** 2006, 195p Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

BAKAS, L.S.; DISALVO, E.A. Effect of Ca<sup>2+</sup> on the cryoprotective action of trehalose. **Cryobiology**, n.28, p.347-353, 1991.

BARLOW P, DELVIGNE A, VAN DROMME J. Predictive value of classical and automated sperm analysis for in vitro fertilization. **Human Reproduction**, v.6, p.119-124, 1991.

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

BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO FILHO, A. de L.; ALVES, S.G.G.; VASCONCELOS, M.F.; BISCARDE, C.E.; LEAL, L.S.; OBA, E. O efeito de um quelante de cálcio, de um detergente e da lecitina de soja sobre a congelabilidade do sêmen caprino. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, p. 305-312, 2008.

BITTENCOURT, R.F.; BICUDO, S.D.; PAPA, F.O.; VASCONCELOS, M.F.; SIQUEIRA, J.B.; BISCARDE, C.E.A.; RESENDE, J.; OBA, E. Avaliação da congelabilidade do sêmen de carneiros e caprinos, criopreservado com um meio hiperosmótico a base de trealose. In: XXI REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2007, Costa do Sauípe. **Acta Scientiae Veterinariae**. Porto Alegre : UFRGS, v.35, p.999, 2007.

BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO FILHO, A. de L.; SANTOS, A.D.F.; FURST, R.; TEIXEIRA, R.B.S.; CHALHOUB, M.; PORTELA, A.P.; ALVES, S.G.G.; ALMEIDA, A.K.; GUIMARÃES, J.D. Utilização de glicerol ou etilenoglicol como crioprotetores na congelação de sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v.5, n.1, p.27-32, 2004.

BECKER, C.S.S. **Limites de tolerância do espermatozóide caprino a soluções hiperosmóticas de sacarose e taxa de sobrevivência após criopreservação em diluidores contendo sacarose e concentrações reduzidas de crioprotetores permeantes**. 2004, 121p Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordic Veterinary Medicine**, v. 25, p. 383 – 391, 1973.

BOLLWEIN, H.; FUCHS, I.; KOESS, C. Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in cryopreserved bovine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**. V.43, p.189-195, 2008.

BRITO, L.F., BARTH, A.D., BILODEAU-GOESEELS, S., PANICH, P.L., KASTELIC, J.P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v.60, n.8, p.1539-51, 2003.

BUCAK, M.; ATEŞŞAHİN A.; VARIŞLI, O.; YÜCE, A.; TEKİN, N.; AKÇAY, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: Microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. **Theriogenology**, v.67, n.5, p.1060-1067, 2007.

BURKMAN, L.J. Discrimination between non hyperactivated and classical hyperactivity motility patterns in human spermatozoa using computerized image analysis. **Fertil Steril**, v.55, p.363-371,

CEDENHO, A.P.; TOKUNAGA, I. M. Coloração supravital para espermatozoides: comparação entre as técnicas de eosina e eosina-nigrosina / Comparison of supravital staining techniques for spermatozoa: eosin and eosin-nigrosin. **Journal Brasileiro de Urologia**; v.16, n.4, p.234-236, 1995.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do semen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes.** 2005. 186p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

CELEGHINI, E.C.C. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.119-131, 2008.

CHALAH, T.; BRILLARD, J. Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescence (SYBR-14/PI). **Theriogenology**, v.50, n.3, p.487-493, 1998.

CONNELL, M.; McClure., N.; LEWIS, S.E. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Human Reproduction**, v.17, n.3, p.704-709, 2002.

DHAMI, A.J.; MOHAN, G.; SAHNI, K.L. Effect of extenders and additives on preservability of cattle and buffalo semen at 5°C and -196°C. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.63, n.5, p.492-498, 1993.

FÜRST, R.; CARVALHO, G.R.; FÜRST, M.C.O.; RUAS, J.R.M.; BORGES, A.M.; MAFILLI, V. Efeito do resfriamento do sêmen eqüino sobre sua congelabilidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. [online]**, v.57, n.5, pp. 599-607, 2005.

GONZALEZ, R.A.F. **Efeito da criopreservação usando diversas técnicas de congelação e crioprotetores sobre os parâmetros espermáticos e a interidade de membranas do espermatozóide bovino.** 2004, 92p Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

GREEN, C.E.; WATSON, F.P. Comparison of the capacitation state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. **Reproduction**, v.122, p.889-898, 2001.

GRUNERT, J.H.; GEYTER de C.; BORDT, J.; SCHNEIDER, H.P.; NIESCHLAG, E. Does computerized image analysis of sperm movement enhance the predictive value of semen analysis for in-vitro fertilization results? **Internationa Journal of Andrology**, v.12, p.329-338, 1989.

HANCOCH, J. L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal of the Royal Microscopical Society**, n. 76, p. 84-97, 1957.

HENRY, M.; NEVES, J.P. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, 1998. 49p.

HU, J.H.; LI, Q.W; JIANG, Z.L.; YANG, H.; ZHANG, S.S.; ZHAO, H.W; The Cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. **Animal Reproduction Science**, v.112 (1-2), p.107-118, 2009.

LAMBERT, H. Temperature dependence of capacitation in bat spermatozoa monitored by zona-free hamster ova. **Gamete Research**, v.4, p.525-533, 1981.

MAIA, M.S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase**. 2006, 149f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu-SP.

MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GÜNZEL, A.R. Centrifugation of stallion semen and storage in large volumes straws. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.27, p.47-51, 1979.

MARTINES-PASTOR, F.; JOHANNISSON, A.; GIL, J.; KAABI, M.; ANEL, L.; PAZ, P.; RODRIGUEZ-MARTINEZM H. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.84, n.1-2, p.121-133, 2004.

MARTINS-BESSA, A.; ROCHA, A.; MAYENCO-AGUIRRE, A. Incorporation of taurine and hypotaurine did not improve the efficiency of the Uppsala Equex II extender for dog semen freezing. **Theriogenology**, v.68, n.8, p.1088-1096, 2007.

MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M.; CARMO, M.T.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Cryopreservation of stallion sperm using different amides, **Theriogenology**, v.58, p.273-276, 2002.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, n.1, p.327-344, 2002.

MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Humand Reproduction Update**, v.3, n.5, p.403-439, 1997.

MORTIMER, S.T., MAXWELL, W.M. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. **Reproduction Fertility and Development**, v.11, n.1, p.25-30, 1999.

MORTIMER, S.T.; MORTIMER, D. Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. **Journal of Andrology**, v.11, p.195-203, 1990.

NASCIMENTO, J. **Efeito da concentração espermática sobre as características do movimento espermático e sobre membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides equinos criopreservados**. 2006, 107p



Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PAPAIIOANNOU, K.Z.; MURPHY, R.P.; MONKS, R.S.; HYNES, N.; RYAN, M.P.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. **Theriogenology**, v.48, p.299-312, 1997.

REIS, J.C.; Delineamentos experimentais. In: **Estatística aplicada à pesquisa em ciência veterinária**. Pernambuco: Independente, 2003. chap.21, p.397-411.

ROBERTS, S. J. **Veterinary obstetrics and genital diseases (Theriogenology)**. 3.ed. Michigan, Edwards Brothers, 1986, 981p.

ROBERTSON, L., WATSON, P.F. Calcium transport in diluted or cooled ram semen. **Journal Reproduction Fertility**, v.77, n.1, p.177-85, 1986.

RODELLO, L. **Validação do sistema automatizado de refrigeração e congelamento de sêmen ovino**. 2006, 70p Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

ROLDAN, E.R.S., MURASE, T., SHI, Q.X. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. **Science**, n.266, p.1578-1581, 1994.

SAS. **User`s guide: Statistcs**, version 5. Cary: SAS Institute Inc., 1996. 956p.

SOUSA, D.B. de. **Viabilidade das subpopulações de espermatozoides avaliadas pela cinética em sistema computadorizado e combinação de sondas fluorescentes como parâmetro qualitativo do sêmen congelado de ovinos**. 2007, 123p Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

TAKADA, L. **Avaliação da resposta ovariana na sincronização do estro e da ovulação utilizando protocolo de curta duração em ovelhas da raça Suffolk**. 2004. 151. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 2004.  
VALLERIOTE, P.S.; DIAS, A.J.B.; PAES DE CARVALHO, F.; PAES SOBRINHO, C. Criopreservação de sêmen ovino em solução de trealose. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, Supl.1, p.310, 2005

VALENTE, S.S., PEREIRA, R.M., BAPTISTA, M.C.; MARQUES, C.C., VASQUES, M.I., PEREIRA, M.V., HORTA, A.E., BARBAS, J.P. In vitro and in vivo fertility of ram semen cryopreserved in different extenders. **Animal Reproduction Science**, v.117, n.1-2, p.74-77, 2009.

VERSTEGEN, J. IGUER-OUADA, M. ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**. v.57, n.1, p.149-179, 2002.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.482-492, 2000.

WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: MORRIS, G.J.; CLARKE, A. (Eds.) **Effects of low temperatures on biological membranes**. London: Academic Press, p.189, 1981.

WINDSOR, D.P., WHITE, I.G. Mitochondrial injury to ram sperm during procedures associated with artificial insemination or frozen storage. **Animal Reproduction Science**, v. 40, n.1-2, p.43-58, 1995.

# CAPÍTULO 3

**EXPERIMENTO 2:**

Viabilidade dos espermatozoides ovinos criopreservados com a utilização da dimetilacetamida em duas concentrações, em meio diluidor com e sem trealose, associada ou não ao edta

Trabalho a ser enviado para o periódico *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*

ISSN: 15199940

Normas para publicação disponível em:

[http://revistas.ufba.br/forms/Normas\\_RBSPA.pdf](http://revistas.ufba.br/forms/Normas_RBSPA.pdf)

BITTENCOURT, R.F. Viabilidade dos espermatozóides ovinos criopreservados com a utilização da dimetilacetamida em duas concentrações, em meio diluidor com e sem trealose, associada ou não ao EDTA. Botucatu, 2008. 201p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## RESUMO

Dezoito amostras de sêmen de nove carneiros da raça Santa Inês foram submetidas à criopreservação, com o objetivo de avaliar a eficácia da concentração da dimetilacetamida (DMA, 3% e 6%) em um meio hiperosmótico com trealose (TRE, 100mOsmol) ou TRE mais EDTA e seu efeito sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento. Assim, foram formados sete grupos experimentais: TRIS+GLI6%; TRIS+DMA3%; TRIS+DMA6%; TRIS+DMA3%+TRE; TRIS+DMA6%+TRE; TRIS+DMA3%+TRE+EDTA e TRIS+DMA6%+TRE+EDTA. Logo após da avaliação, o sêmen foi diluído nos diferentes meios e congelado com dose inseminante de  $80 \times 10^6$  espermatozóides. Após a descongelamento, realizada em banho-maria à 38°C por 50s, o sêmen foi diluído (1/20) e os parâmetros da cinética espermática avaliados subjetivamente e pela análise computadorizada (CASA). A análise da viabilidade espermática foi realizada através da associação das sondas fluorescentes iodeto de proprídio (IMP, integridade de membrana plasmática), JC-1 (PMM, potencial de membrana mitocondrial) e aglutinina de *Pisum sativum* conjugada à fluoresceína de isotiocianato - FITC-PSA (IAC, integridade acrossomal). Para a análise estatística das características avaliadas, foi empregado o programa estatístico (SAS), versão 5.0 (1996). A DMA a 6% foi tóxica e apresentou baixo efeito crioprotetor sobre o espermatozóide ovino. A adição da trealose promoveu efeito negativo sobre a cinética espermática, entretando melhorou os níveis de IMP e IAC pós-descongelamento. O diluidor com GLI a 6% sozinho foi o protocolo mais eficaz para a manutenção da integridade espermática.

Suporte Financeiro: FAPESP- Brasil proc. 05/59530-2.

BITTENCOURT, R.F. Ram sperm viability cryopreserved with the dimethyl acetamide in two grades in extender with or without trehalose, associated or not with EDTA. Botucatu, 2008. 201p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista

Eighteen semen samples of nine rams of the Santa Inês breed were cryopreserved with the objective of verifying the effect of the dimethyl acetamide grade (DMA, 3 and 6%) in a hyperosmotic extender with trehalose (TRE, 100mOsmol) or TRE plus EDTA and its effect on the post-thaw sperm viability. Then, they were formed seven experimental groups: TRIS+GLI6%; TRIS+DMA3%; TRIS+DMA6%; TRIS+DMA3%+TRE; TRIS+DMA6%+TRE; TRIS+DMA3%+TRE+EDTA and TRIS+DMA6%+TRE+EDTA. After evaluation, the semen was diluted in the different extenders and frozen with of  $80 \times 10^6$  sperm/0,25mL. After the thawing accomplished in 38°C water bath for 50s, the thawed semen was diluted (1/20) and the kinetic sperm parameters were analyzed subjectively and by computer analyses system (CASA). The sperm viability evaluation was performed by using the multiple sperm parameter staining with propidium iodide (PMI, plasmatic membrane integrity), JC-1 (MMP, mitochondrial membrane potential) and Pisum sativum agglutinin conjugates with fluorescein isothiocyanate – FITC-PSA (ACI, acrosomal integrity). All the statistical analyses were performed using the SAS software version 5.0 (1996). The DMA at 6% was toxic and had a poor cryoprotective effect for ram semen. The addition of trehalose promoted negative effect on sperm kinetics, entertain improved levels of IMP and IAC post-thawing. The extender with GLI at 6% alone was the best protocol for maintaining the sperm integrity was the most effective protocol to maintain the integrity sperm.

Financial support: FAPESP- Brazil proc. 05/59530-2

## 1. INTRODUÇÃO

O glicerol tem sido o crioprotetor mais usado para a congelação de sêmen ovino em concentrações que variam de 3 a 8% (SALAMON e MAXWELL, 2000). Entretanto, autores afirmam que a sua atividade crioprotetora sobre o espermatozóide é prejudicada pelo seu efeito negativo sobre a viabilidade e fertilidade pós-descongelação (FAHY, 1986). Seus efeitos deletérios aos espermatozoides incluem estresse osmótico, mudanças na organização, fluidez e permeabilidade da membrana plasmática, assim como desorganização da sua composição lipídica (WATSON, 1995).

Esse efeito tóxico do glicerol tem acarretado a pesquisa e utilização de outros crioprotetores intracelulares em diluidores de congelação de sêmen.

Medeiros et al. (2002) ao testar a dimetilacetamida em concentração de 5% obtiveram bons índices de congelabilidade do sêmen de garanhões, com taxas de motilidade total e progressiva pelo CASA, semelhantes quando comparado ao glicerol (GLI) a 5% (46,6% e 10% versus 27,9% e 8,75%,  $P > 0,05$ ). E Gomes et al. (2002) verificarem a superioridade das motilidades subjetivas e computadorizadas obtidas com a dimetilformamida (DMF) a 5%, comparada ao GLI na mesma concentração. Estes autores relataram que as amidas são efetivas para a criopreservação de sêmen de garanhões com baixa tolerância ao glicerol ("bad freezers"), sendo uma alternativa importante para a preservação do sêmen desses reprodutores.

Taxas de prenhez semelhantes foram por Vidament et al. (2002) ao utilizar o sêmen congelado com GLI (2%) e a diimetilformamida (DMF, 2%), de, respectivamente 46% e 50%.

Para espécie ovina os dados são escassos com a utilização das amidas como crioprotetores seminais. Skeff et al. (2008) testou a metilformamida (MF) para a preservação do sêmen ovino em diferentes concentrações (3, 5, 7 e 9%) e comparou ao glicerol (5,3%). A MF na concentração de 3% proporcionou índices de MTS e integridade de membrana pós-descongelação, e após o teste de termo-resistência lento (3h), semelhantes ( $P > 0,05$ ) ao obtido com o GLI. Os autores sugeriram que também para a espécie ovina, as amidas podem representar uma alternativa importante para a preservação espermática, sendo necessário, no entanto, estudos para analisar sua fertilidade *in vivo*.

Diversos trabalhos têm relatado bons resultados com o uso de meio hiperosmótico à base de TRE para a congelação do sêmen ovino (AISEN et al., 2002, ABGOALA e TERADA, 2004; AISEN et al., 2005, BUCAK et al., 2007). Aisen et al. (2002) estudando os melhores níveis de TRE (50 a 400mOsmol) em meio isosmótico de Tris observaram maior ( $P < 0,05$ ) índice de MTS com a adição de 100mOsmol de TRE, quando comparado ao meio isosmótico (52% *versus* 32%). Já Bucak et al. (2007) ao testarem a TRE nas concentrações de 50 e 100mOsmol obtiveram taxas de MTS, respectivamente, de 59 e 56%, sendo a primeira superior ( $P < 0,05$ ) à MTS obtida com o meio similar sem a TRE.

De fato a TRE exerce atividade crioprotetora sobre a membrana plasmática, devido à sua capacidade de estabelecer pontes de hidrogênio com as cabeças polares dos fosfolipídios da membrana, substituindo as moléculas de água durante o processo de desidratação o que inibe a ocorrência dos eventos de fusão das membranas plasmáticas (BAKÁS E DISALVO et al., 1991). Além deste fato, Bakás e Disalvo (1991) e Aisen et al. (2000) demonstraram atividade sinérgica importante entre o EDTA e a trealose, com efeitos benéficos observados nas taxas de motilidade e preservação da morfologia espermática pós-descongelção.

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de testar a capacidade de crioproteção da dimetilacetamida em duas concentrações, sobre o espermatozóide ovino, e a sua interação com a trealose ou deste associado ao EDTA.

Também objetivou-se verificar a ocorrência de correlações entre os diversos métodos de avaliação espermática *in vitro*.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. O local e o Período**

As atividades de colheita, avaliação do sêmen *in natura* dos reprodutores ovinos e criopreservação foram realizadas na Tertúlia Central Genética (TCG), situada no município de Santo Antônio de Jesus, Estado da Bahia. Esta etapa foi desenvolvida em Novembro de 2008. As análises laboratoriais foram conduzidas no Laboratório de Estudos em Biotecnologia Aplicada à Reprodução de Ovinos e Caprinos e no Centro de Diagnóstico e Biotecnologia em Reprodução Animal



(CERAN), pertencentes ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), município de Botucatu, Estado de São Paulo. Esta etapa foi realizada entre os meses de Dezembro de 2008 e Fevereiro de 2009.

## 2.2. Animais Experimentais

Foram utilizados 9 carneiros Santa Inês Puros de Origem (PO) com registro na Associação Brasileira de Criadores de Ovinos (ARCO) (estes foram os mesmos utilizados no Experimento 1, sendo que um foi retirado do programa devido ocorrência de urolitíase). Todos os reprodutores utilizados foram submetidos a programa de controle sanitário, através de vermifugação iniciada 30 dias antes do início das colheitas. A alimentação era baseada em 1Kg de concentrado balanceado, formulado na própria central, com média de 18% de proteína bruta e sal mineral para ovinos, água e feno de alfafa à vontade. Os reprodutores tinham idades entre 12 a 40 meses e foram submetidos a um regime de colheitas de sêmen e exames andrológicos. Aqueles considerados aptos, conforme preconizado por Henry e Neves (1998), foram mantidos no programa. Destes animais foram colhidos pelo menos dois ejaculados diários, por período de dois a três dias consecutivos, previamente o início das colheitas com fins experimentais.

## 2.3. Colheita e Avaliação do Sêmen Pré-Congelação

As colheitas de sêmen foram realizadas com a utilização de vagina artificial com água aquecida entre 42 a 50°C, tendo como manequim uma fêmea em estro natural. O ejaculado foi colhido em tubos graduados, protegidos da luz e da temperatura ambiente por um protetor térmico. Após a colheita a amostra de sêmen foi encaminhada imediatamente para o laboratório de processamento, colocado em banho-maria a temperatura de 37°C e avaliada quanto ao volume, aspecto, turbilhonamento, vigor e motilidade espermática.

O volume do ejaculado foi verificado por visualização direta do sêmen no tubo graduado e registrado em mililitros (mL), e o turbilhonamento (escala de 0-5) observado através de uma gota de sêmen sobre uma lâmina pré-aquecida em mesa aquecedora a 37°C, em microscopia óptica com aumento de 100x. Para observação do vigor (escala de 0-5) e da motilidade total e progressiva (0-100%), foi procedida a diluição (1:50) do sêmen no meio diluidor Tris-gema de ovo (ROBERTS, 1986), utilizado como o grupo controle deste experimento (descrito a seguir no item 2.4). Na sequência 10µL desta amostra eram colocados entre lâmina e lamínula e observada em microscopia óptica com aumento de 200x, tal como preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) (HENRY e NEVES, 1998).

Para o cálculo da concentração espermática, empregou-se a câmara de Neubauer, com sêmen diluído na proporção de 10µL para 4mL (1:400) de solução de formol-salina tamponada (HANCOCK, 1957). A contagem foi realizada em microscopia óptica com aumento de 200x.

A mesma amostra de sêmen em formol-salina tamponada usada para cálculo da concentração foi usado para avaliação da morfologia espermática, por isso teve-se o cuidado de manter o tubo com formol salina sobre a placa aquecedora para que fossem evitadas alterações na célula espermática, provocadas por choque-térmico. O estudo da morfologia espermática foi realizado posteriormente através de preparação úmida, colocando-se 10 µL da amostra diluída sob lâmina e lamínula e observando os espermatozóides em microscopia de contraste de fase (aumento de 1.000X), computando e classificando 100 células de acordo com as anormalidades encontradas. Estas foram classificadas conforme descritas por Blom (1973).

O teste supravital foi empregado para avaliação da integridade da membrana plasmática do sêmen *in natura*. Entretanto, diferente do preconizado na técnica original (BARTH e OKO, 1989), pela praticidade foi utilizado apenas o corante eosina amarela<sup>1</sup>, sem a nigrosina (Figura 2), baseado em relatos de Cedenho e Tokunaga, (1995) que não encontraram diferença ( $P>0,05$ ) para a avaliação realizada com ambas as formulações. Dessa forma, foi feito sobrepondo em lâmina uma gota de sêmen (10µL) com uma gota da eosina (10µL), previamente aquecida (37°C) e elaboração de esfregaço, deixando secar sobre placa aquecedora. Imediatamente após seca, a amostra foi observada em microscopia óptica com

---

<sup>1</sup> Vetec Ltda (Duque de Caxias-RJ, Brasil)

aumento de 400x. As células coradas (vermelhas) foram consideradas com membrana plasmática lesada e as sem coloração com membrana íntegra.

Os reprodutores foram submetidos às colheitas de sêmen e aqueles ejaculados com mais de 60% de integridade de membrana plasmática (supravital) e 75% de motilidade espermática eram aproveitados para o experimento. Assim, foram utilizados dois ejaculados de cada reprodutor, totalizando 18 amostras de sêmen para este experimento.

#### 2.4. Grupos Experimentais

A solução de Tris-gema de ovo-glicerol (ROBERTS, 1986) foi o diluidor base utilizado neste trabalho e que serviu como o grupo controle. Todos os reagentes químicos que o compuseram (2,42g de Tris, 1,5g de ácido cítrico, 1,25g de glicose e glicerol, para 100mL), bem como os aditivos EDTA e a trealose, utilizados nos grupos experimentais, foram fabricadas pelo laboratório VETEC<sup>14</sup>, exceto o sulfato de gentamicina<sup>2</sup> (13,4 mg) e o crioprotetor dimetilacetamida<sup>3</sup> (Sigma-Aldrich).

Para o desenvolvimento do experimento foram formados sete grupos experimentais, conforme descrito na Tabela 1.

TABELA 1. Composição, pH e osmolaridade dos diferentes diluidores estudados (TRIS+GL6%, TRIS+DMA3%, TRIS+DMA6%, TRIS+DMA3%+TRE, TRIS+DMA6%+TRE, TRIS+DMA3%+TRE+EDTA, TRIS+DMA6%+TRE+EDTA).

Grupo	Diluidor base	% GLI	% DMA	TRE (mOsmol)	% EDTA	pH/Osmolaridade (mOsmol/Kg)
<b>TRIS+GLI6% (controle)</b>	TRIS	6	6	-	-	6,25/359
<b>TRIS+DMA3%</b>	TRIS	-	3	-	-	6,21/356
<b>TRIS+DMA6%</b>	TRIS	-	6	-	-	6,27/351
<b>TRIS+DMA3%+TRE</b>	TRIS	-	3	300	-	6,21/455
<b>TRIS+DMA6%+TRE</b>	TRIS	-	6	300	-	6,27/460
<b>TRIS+DMA3%+TRE+EDTA</b>	TRIS	-	3	300	0,1	6,09/435
<b>TRIS+DMA6%+TRE+EDTA</b>	TRIS	-	6	300	0,1	6,17/446

▪ Glicerol (GLI), dimetilacetamida (DMA) e trealose (TRE).

<sup>2</sup> Schering-Plough S/A (São Paulo-SP, Brasil)

<sup>3</sup> Sigma Aldrich - D5511 (St Louis, MO, EUA)

## 2.5. Resfriamento e Congelação do Sêmen

Após as avaliações iniciais e cálculo da concentração espermática, um total de  $400 \times 10^6$  de espermatozoides foram adicionados a tubos pré-aquecidos contendo 1mL de cada um dos sete diluidores (descritos na Tabela 1), já com o percentual final do crioprotetor (diluição em uma etapa), compondo quatro doses inseminantes de  $80 \times 10^6$  de espermatozoides com motilidade em 0,25mL, para cada grupo experimental. Assim, o ejaculado teve que ter no mínimo  $2.800 \times 10^6$  de espermatozoides móveis.

Após a diluição nos diferentes meios, o sêmen foi novamente avaliado, envasado em palhetas de 0,25mL e resfriado até 5°C em câmara refrigerada com temperatura estabilizada<sup>4</sup>, a uma taxa de resfriamento médio de 0,46°C/min, segundo metodologia descrita por Furst (2005). Após duas horas de resfriamento e tempo equilíbrio à temperatura de 5°C, a congelação foi efetuada mantendo-se as palhetas por 20min a uma altura de 5cm da lâmina de nitrogênio líquido (N<sup>2</sup>) e posteriormente mergulhadas no N<sup>2</sup>.

## 2.6. Avaliação do Sêmen Pós-Descongelação

As amostras dos diferentes grupos experimentais foram descongeladas em banho-maria à 38°C por 50 segundos, de trinta a noventa dias após a congelação. Após a descongelação, o sêmen de cada grupo era depositado em microtubos de 1,5mL<sup>5</sup>, previamente aquecidos e mantidos à 37°C, dos quais retiravam-se amostras para as avaliações *in vitro*. Para a avaliação subjetiva da motilidade e vigor espermático e teste supravital, procedeu-se como descrito para o sêmen *in natura* (item 2.3).

---

<sup>4</sup> Minitub do Brasil, Rio Grande do Sul, Brasil

<sup>5</sup> Microtubos MCT-150-C, 1,5mL, Axygen Scientific INC

### 2.6.1. Avaliação Computadorizada da Cinética Espermática

Uma alíquota de 5 $\mu$ L (2 X 10<sup>6</sup> espermatozóides) dos diferentes grupos experimentais foi diluída em 120 $\mu$ L de meio X-CELL<sup>6</sup> (16,6 x 10<sup>6</sup> espermatozóides/mL), previamente aquecido à 37°C, e mantida nesta temperatura por cinco a dez minutos. A seguir 10 $\mu$ L desta mistura foram transferidos para câmaras de Makler<sup>7</sup> e levadas para avaliação da cinética espermática através do analisador de sêmen modelo IVOS 12<sup>8</sup> (*set up* no Anexo IV). Esta análise foi feita com a contagem mínima de quatro campos diferentes e mínimo de 300 células. As características avaliadas foram: as percentagens de espermatozóides com motilidade total (MTH, %), motilidade progressiva (MPH, %) e de espermatozóides rápidos (RAP, %), velocidade progressiva (VSL,  $\mu$ m/s), velocidade curvilínea (VCL,  $\mu$ m/s), velocidade de trajeto (VAP,  $\mu$ m/s), deslocamento lateral de cabeça (ALH,  $\mu$ m), frequência de batimento flagelar (BCF, Hz), linearidade (LIN, %) e retilinearidade (STR, %).

### 2.6.2. Avaliação das Membranas Plasmática, Acrossomal e Potencial da Membrana Mitocondrial

Para a avaliação da integridade das membranas espermáticas foi empregada a associação das sondas fluorescentes iodeto de proprídio - IP<sup>9</sup> (IMP, integridade de membrana plasmática), iodeto de 5,5',6,6'tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina - JC-1<sup>10</sup> (PMM, potencial de membrana mitocondrial) e aglutinina de *Pisum sativum* conjugada à fluoresceína de isotiocianato - FITC-PSA<sup>11</sup> (IAC, integridade da membrana acrossomal). Para esta avaliação 5 $\mu$ L de sêmen (2 x 10<sup>6</sup> espermatozóides) foram diluídos em 120 $\mu$ L de meio X-CELL, ao qual foram adicionadas as soluções de trabalho das sondas fluorescentes (Anexo IV a VI) nas seguintes proporções: 2 $\mu$ L de IP e 2 $\mu$ L de JC-1. A mistura foi homogeneizada, mantida protegida da luz e incubada a 37°C por 10 a 15

---

<sup>6</sup> IMV, L'Aigle, França

<sup>7</sup> Makler Counting Chamber, Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel

<sup>8</sup> Hamiton Thorn Biosciences, Beverly, MA, EUA

<sup>9</sup> Sigma, P4170 (St Louis, MO, EUA)

<sup>10</sup> Molecular Probes, T3168

<sup>11</sup> Sigma, L0770 (St Louis, MO, EUA)

minutos. Após esse período, foram adicionados 25µL da solução de trabalho de FITC-PSA, procedendo-se novamente a homogeneização e logo em seguida uma alíquota dessa mistura de 10µL foi colocada entre lâmina e lamínula e 100 espermatozóides foram avaliados sob imersão, aumento de 1000x, em microscopia de epifluorescência<sup>12</sup>, usando filtro I3 (excitação BP 450-490 e supressão LP515). A classificação das células foi feita como descrita por Celeghini (2005): A ausência ou presença de fluorescência verde fosca e conseqüentemente a presença ou ausência de fluorescência vermelha na cabeça indicava respectivamente a lesão ou não da membrana plasmática. A presença ou ausência de fluorescência verde intenso no acrossomo indicava respectivamente lesão ou não da membrana acrossomal. Peças intermediárias com coloração vermelha ou vermelho-amarelada predominando em toda a cauda e coloração verde indicavam, respectivamente, alto e baixo potencial da membrana mitocondrial. Seguindo-se este critério obtinham-se oito subpopulações espermáticas (SBP):

**SBP 1** - membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial; **SBP 2** - membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial; **SBP 3** - membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado e baixo potencial de membrana mitocondrial; **SBP 4** - membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado e baixo potencial de membrana mitocondrial; **SBP 5** - membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial; **SBP 6** - membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial; **SBP 7** - membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e alto potencial de membrana mitocondrial; **SBP 8** - membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e baixo potencial de membrana mitocondrial.

## 2.7. Delineamento e Análise Estatística

O delineamento estatístico empregado foi inteiramente casualizado (REIS, 2003), no qual os ejaculados foram considerados repetições (n=18) e os protocolos de processamento do sêmen (TRIS+GLI6%; TRIS+DMA3%; TRIS+DMA6%;

---

<sup>12</sup> Leica DMLB – Leica Microsystems, Litz, Alemanha

TRIS+DMA3%+TRE; TRIS+DMA6%+TRE; TRIS+DMA3%+TRE+EDTA; TRIS+DMA6%+TRE+EDTA) mais o sêmen *In natura* foram considerados os tratamentos (n=8).

Para a análise estatística das características avaliadas, foi empregado o programa estatístico Statistical Analysis System (SAS) – versão 5.0 (1996). Deste modo, realizou-se a seguinte seqüência de análises:

1- A consistência dos dados e a análise descritiva (médias e desvio-padrão) das características de interesse ao estudo foram realizadas mediante o emprego do Procedimento MEANS (PROC MEANS).

2- O efeito dos tratamentos e dos carneiros sobre os parâmetros de interesse ao estudo (motilidade espermática total e progressiva subjetivas, vigor espermático, além dos parâmetros de cinética espermática e integridade das membranas espermáticas, obtidas, respectivamente, pela análise computadorizada e pela microscopia de fluorescência) foi avaliado através da análise de variância (ANOVA), utilizando-se para tanto o Procedimento “General Linear Model” (PROC GLM). Para a comparação das médias empregou-se o teste de Student - Newman - Keuls (SNK), com nível de probabilidade de cinco por cento.

3- A relação entre os parâmetros espermáticos estudados foi avaliada pelo teste de correlação linear de *Pearson*, com nível de significância de cinco por cento.

### 3. RESULTADOS

Os resultados obtidos com a avaliação do sêmen *in natura* e pós-descongelamento nos diferentes diluidores experimentais estão representados nas Tabelas de 2 a 6.

O resumo da análise de variância, com os valores de F e seus respectivos níveis de significância, referentes aos efeitos dos reprodutores e dos diferentes tratamentos experimentais sobre os parâmetros de cinética espermática subjetiva e computadorizada, viabilidade espermática avaliada pelo teste supravital e viabilidade das membranas espermáticas analisadas pela microscopia de fluorescência está representado no Anexo II.

A maioria dos parâmetros estudados, tanto para o sêmen *in natura* (motilidade total e progressiva subjetivas, vigor espermático e viabilidade espermática pelo supravital), quanto para o sêmen descongelado (cinética espermática subjetiva e computadorizada, exceto BCF, viabilidade espermática através do supravital e integridade das membranas espermáticas analisadas pela microscopia de fluorescência, exceto IMP), sofreram efeito significativo dos carneiros (Anexo II, Tabela 3). Estes achados demonstram a heterogeneidade do grupo de doadores de sêmen utilizados no estudo, escolhidos aleatoriamente, representando condições individuais de congelabilidade diferenciadas, fator importante para representatividade deste estudo. De forma semelhante, foi observado efeito significativo dos tratamentos sobre quase todos os parâmetros de cinética espermática (exceto BCF) e integridade da membrana pelo supravital (Anexo II, Tabelas 3 e 4).

#### 3.1. Avaliação Subjetiva da Cinética Espermática

A análise de variância (ANOVA) demonstrou que as características subjetivas da cinética espermática avaliadas neste estudo, motilidade total (MTS), progressiva (MPS) e vigor espermático (VIG), sofreram efeito significativo do tratamento (Anexo II).



Através da ANOVA também se verificou que o processo de congelação dos espermatozóides foi deletério e influenciou significativamente ( $P < 0,05$ ) na redução dos índices de MTS, MPS e VIG. Em relação a MTS e VIG, pode-se observar na Tabela 2 que o sêmen *in natura* foi superior ao congelado em todos os protocolos experimentais. A semelhança do VIG entre sêmen *in natura* e o congelado em alguns dos protocolos experimentais pode ser justificado pelo método de avaliação do sêmen *in natura*, que foi diluído no meio diluidor controle (TRIS+GLI6%), que tem o crioprotetor na sua composição e promove uma redução do vigor espermático nos momentos iniciais, até que ocorra o equilíbrio osmótico entre meio externo e interno da célula.

TABELA 2. Médias e desvios-padrão dos parâmetros subjetivos da cinética espermática no sêmen *In natura* e pós-descongelação, nos diferentes diluidores estudados (TRIS+GLI6%, TRIS+DMA3%, TRIS+DMA6%, TRIS+DMA3%+TRE, TRIS+DMA3%+TRE, TRIS+DMA3%+TRE+EDTA, TRIS+DMA6%+TRE+EDTA).

Parâmetro	TRATAMENTOS							
	<i>In natura</i>	TRIS+GLI6%	TRIS+DMA3%	TRIS+DMA6%	TRIS+DMA3%+TRE	TRIS+DMA6%+TRE	TRIS+DMA3%+TRE+EDTA	TRIS+DMA6%+TRE+EDTA
<b>MTS (%)</b>	85,6 a ± 04,5	76,9 b ± 09,2	61,6 c ± 13,9	34,4 e ± 20,3	58,6 cd ± 09,8	40,2 e ± 16,3	51,7 d ± 09,9	38,8 e ± 13,8
<b>MPS (%)</b>	75,2 a ± 04,9	60,8 b ± 10,1	44,1 c ± 13,0	21,1 e ± 16,5	38,3 cd ± 11,7	21,1 e ± 10,3	32,0 d ± 11,8	22,2 e ± 10,1
<b>VIG (0-5)</b>	03,8 a ± 00,2	04,0 a ± 00,1	03,9 a ± 00,2	03,4 b ± 00,3	03,3 b ± 00,3	03,0 c ± 00,3	3,1 c ± 00,2	03,0 c ± 00,3

▪ Motilidade total (MTS), motilidade progressiva (MPS) e vigor espermático (VIG).

Valores seguidos de letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ).

A redução ( $P < 0,05$ ) dos índices de MTS após o processo de congelação-descongelação do sêmen ovino corrobora com diversos estudos anteriores como o de Rodello (2006) (de 86,3% para 50,3%), Azevedo (2006) (86,6 para 57,7%) e Valente et al. (2009) (de 67% e 68% para 46% e 36%, respectivamente, de acordo com o diluidor utilizado). Verifica-se valor semelhante para a MTS do sêmen *in natura* deste estudo (85,6%), em relação aos dois primeiros trabalhos citados e superior comparado ao estudo de Valente et al. (2009). Entretanto, a média de MTS pós-descongelação observada neste estudo, tanto para o grupo controle (TRIS+GLI6%; MTS= 76,9%) quanto para média geral dos tratamentos (56,0%), foram superiores às relatadas nos trabalhos citados.

Entre os diluidores testados, o TRIS+GLI6% obteve os melhores ( $P<0,05$ ) percentuais de MTS (76,9%), MPS (60,8%) e VIG (4,05), sendo este último, porém, semelhante ( $P>0,05$ ) ao obtido com o grupo TRIS+DMA3% (3,94).

Nota-se que o a dimetilacetamida (DMA), na concentração de 6% (comparada a 3%), influenciou negativamente ( $P<0,05$ ) tanto os índices de MTS quanto MPS (Tabela 2), independente da presença dos aditivos trealose (TRE) e EDTA.

A TRE ou esta associada ao EDTA não promoveram nenhum efeito benéfico sobre as avaliações espermáticas subjetivas. E quando acrescentados juntos ao diluidor com 3% de DMA (TRIS+DMA3%+TRE+EDTA), deprimiram de forma significativa os percentuais de MTS e MPS ( $P<0,05$ ), comparando-se com o grupo sem esses aditivos (TRIS+DMA3%) (61,6 e 44,1% *versus* 51,7 e 32,0%).

### 3.2 Avaliação Computadorizada da Cinética Espermática

Na Tabela 3 encontram-se as médias dos parâmetros da cinética espermática pós-descongelção, obtidas pela análise computadorizada e a comparação dessas entre os diferentes diluidores experimentais.

Quase todos os parâmetros da cinética espermática da avaliação computadorizada (exceto BCF) sofreram efeito significativo do tratamento e este foi claramente demonstrado pela superioridade ( $P<0,05$ ) do grupo TRIS+GLI6%, em relação à maioria das características estudadas (motilidade espermática total (MTH) e progressiva (MPH), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), velocidade de trajeto (VAP), linearidade (LIN) e espermatozóides rápidos (RAP)), confirmando os resultados obtidos com a avaliação subjetiva da motilidade espermática.

A análise computadorizada demonstrou que a DMA na concentração de 6%, independente da presença ou não do EDTA ou EDTA+TRE (TRIS+DMA6%, TRIS+DMA6%+TRE e TRIS+DMA6%+TRE+EDTA), comprometeu de forma importante a cinética espermática ovina, refletida nos índices inferiores de MT, MP, VAP, VSL, VCL, LIN e RAP, quando comparada ao diluidor isosmótico com 3% de DMA (TRIS+DMA3%).

O efeito negativo da adição da TRE sozinha, verificada na avaliação subjetiva também foi constatada na análise computadorizada. Na Tabela 3 pode-se verificar que os diluidores TRIS+DMA3%+TRE e TRIS+DMA3%+TRE+EDTA acarretaram índices de MPH, VAP, VSL, VCL, RAP bem inferiores ( $P < 0,05$ ) aos obtidos pelo diluidor similar sem TRE.

TABELA 3. Médias e desvios-padrão dos parâmetros de cinética espermática pós-descongelamento, obtidos através da análise computadorizada, nos diferentes diluidores estudados (TRIS+GL6%, TRIS+DMA3%, TRIS+DMA6% TRIS+DMA3%+TRE, TRIS+DMA3%+TRE+EDTA, TRIS+DMA6%+TRE+EDTA).

Parâmetro	TRATAMENTO						
	TRIS+GL6%	TRIS+DMA3%	TRIS+DMA6%	TRIS+DMA3%+TRE	TRIS+DMA6%+TRE	TRIS+DMA3%+TRE+EDTA	TRIS+DMA6%+TRE+EDTA
MTH (%)	75,2 a ± 08,7	60,6 b ± 14,2	32,2 c ± 20,5	56,7 b ± 11,5	40,0 c ± 17,4	52,1 b ± 10,7	38,4 c ± 14,9
MPH (%)	55,7 a ± 08,9	41,3 b ± 11,1	19,1 d ± 13,3	33,0 c ± 10,0	20,5 d ± 10,1	27,7 c ± 08,7	19,4 d ± 07,5
VAP(µm/s)	147,9 a ± 11,4	132,1 b ± 08,1	104,9 c ± 17,3	98,2 c ± 16,5	87,9 d ± 10,6	88,7 d ± 11,8	88,7 d ± 10,5
VSL (µm/s)	133,8 a ± 10,6	118,2 b ± 07,8	92,5 c ± 15,2	87,9 c ± 14,9	76,6 d ± 09,0	79,3 d ± 11,8	78,5 d ± 08,4
VCL(µm/s)	202,1 a ± 24,0	184,4 b ± 19,2	162,0 c ± 26,8	143,3 d ± 20,6	140,7 d ± 19,6	132,3 d ± 13,5	138,1 d ± 15,5
ALH (µm)	06,1 a ± 00,9	05,9 ab ± 00,8	06,0 ab ± 00,9	05,2 c ± 00,6	05,5 bc ± 00,8	05,2 c ± 00,65	05,4 bc ± 00,6
BCF (Hz)	41,3 ± 02,3	41,6 ± 02,1	40,6 ± 03,0	40,7 ± 01,2	41,1 ± 01,8	41,0 ± 01,7	41,3 ± 01,8
STR (%)	86,4 a ± 03,6	84,1 ab ± 02,8	81,9 b ± 04,4	85,0 a ± 03,1	82,2 b ± 03,9	85,0 a ± 02,9	83,7 ab ± 02,0
LIN (%)	65,2 a ± 06,5	61,5 b ± 05,9	54,6 cd ± 06,5	59,8 b ± 04,21	53,2 d ± 05,1	58,5 bc ± 05,5	55,4 cd ± 03,8
RAP (%)	64,4 a ± 09,2	48,1 b ± 13,1	22,5 d ± 15,6	35,8 c ± 13,3	23,3 d ± 11,3	31,2 c ± 09,7	22,1 d ± 07,0

▪ Motilidade total (MTH), motilidade progressiva (MPH), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), velocidade de trajeto (VAP), deslocamento lateral de cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar (BCF), retilinearidade (STR), linearidade (LIN) e espermatozoides rápidos (RAP).

Valores seguidos de letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ).

Observou-se também, que ao incorporar o EDTA ao diluidor hiperosmótico com 3% de DMA (TRIS+DMA3%+TRE+EDTA) houve uma redução nos valores de VAP e VSL.

### 3.3. Avaliação da Viabilidade Espermática – Teste Supravital

O efeito significativo do tratamento (ANOVA) também foi observado para a viabilidade espermática pelo teste supravital (SV).

Assim como observado para avaliações subjetivas da cinética espermática, o processo de congelação-descongelação dos espermatozóides afetou negativamente os índices de viabilidade celular no teste supravital (SV), que foram significativamente inferiores para o sêmen congelado nos diferentes diluidores experimentais em relação ao sêmen *in natura* (Tabela 4).

TABELA 4. Médias e desvios-padrão dos índices de viabilidade espermática, avaliados pelo teste supravital (SV) no sêmen *In natura* e pós-descongelação, nos diferentes diluidores estudados (TRIS+GLI6%, TRIS+DMA3%, TRIS+DMA6% TRIS+DMA3%+TRE, TRIS+DMA3%+TRE+EDTA, TRIS+DMA6%+TRE+EDTA).

Parâmetro	TRATAMENTO							
	<i>In natura</i>	TRIS+GLI6%	TRIS+DMA3%	TRIS+DMA6%	TRIS+DMA3%+TRE	TRIS+DMA6%+TRE	TRIS+DMA3%+TRE+EDTA	TRIS+DMA6%+TRE+EDTA
<b>SV (%)</b>	78,9 a ± 04,5	57,2 b ± 12,8	49,8 b ± 12,6	24,3 d ± 16,5	53,2 b ± 12,8	37,5 c ± 18,4	52,7 b ± 08,9	37,2 c ± 13,1

Valores seguidos de letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ).

As taxas de SV foram influenciadas ( $P < 0,05$ ) pela composição do diluidor utilizado e vieram a reforçar os resultados verificados através da avaliação da cinética espermática, cujos espermatozóides criopreservados com 6% de DMA tiveram maiores ( $P < 0,05$ ) danos de membrana plasmática, verificados pelo teste supravital com o corante eosina. E entre estes grupos, houve uma influência benéfica da TRE, que proporcionou uma maior ( $P < 0,05$ ) manutenção de SV, comparado com o diluidor com 6% de DMA e sem TRE, grupo este que obteve os menores ( $P < 0,05$ ) índices de SV entre todos os meios testados (Tabela 4).

O percentual de SV não variou ( $P > 0,05$ ) entre os espermatozóides congelados com o grupo controle TRIS+GLI6% e com os diluidores com 3% de DMA, independente da presença ou não dos aditivos TRE e EDTA.

### 3.4. Avaliação da Integridade das Membranas Plasmática e Acrossomal e do Potencial da Membrana Mitocondrial

Para esta avaliação, os resultados obtidos com a associação das sondas fluorescentes FITC-PSA, IP e JC-1 foram individualizados em três categorias distintas: integridade de membrana plasmática (IMP), composta pelo percentual de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (soma das subpopulações espermáticas SBP 1, SBP 2, SBP3 e SBP4); integridade acrossomal (IAC) representando o percentual de espermatozoides com membrana acrossomal íntegra (soma das subpopulações SBP 1, SBP 2, SBP5 e SBP6) e potencial de membrana mitocondrial (PMM) que representou o percentual de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial (soma das subpopulações SBP 1, SBP 3, SBP5 e SBP7) (Tabela 5).

Os valores médios obtidos para IMP e IAC dentro dos grupos se comportaram de forma estável (CV = 45,5% e 16,7%) e refletiram no efeito significativo ( $P < 0,05$ ) dos tratamentos sobre essas variáveis (Anexo II). O PMM foi mais instável (CV= 63,8%) e as diferenças numéricas das médias obtidas entre os grupos experimentais apresentaram apenas uma tendência a significância ( $P = 0,06$ ).

Os percentuais médios obtidos para IMP, IAC e PMM dos diferentes grupos estudados podem ser visualizados na Tabela 5.

Ao compararmos os meios isosmóticos, a DMA na concentração de 6% (TRIS+DMA+6%), assim como verificado para os parâmetros espermáticos avaliados anteriormente, influenciou negativamente ( $P < 0,05$ ) os índices de integridade da membrana plasmática (IMP), avaliada pela microscopia de fluorescência. O mesmo aconteceu com o meio hiperosmótico com TRE apenas (TRIS+DMA6%+TRE), que proporcionou índices inferiores de IMP, em relação ao meio similar com 3% de DMA.

O efeito positivo da TRE para a manutenção da viabilidade da membrana plasmática verificada pelo corante eosina (SV) não foi confirmada pela microscopia de fluorescência (IMP). E nenhum efeito benéfico ( $P > 0,05$ ) sobre a membrana plasmática foi verificado pela associação TRE+EDTA (Tabela 5).

TABELA 5. Médias e desvios-padrão das frequências de espermatozoides com membrana plasmática (IMP) e acrossomal íntegras (IAC) e com alto potencial da membrana mitocondrial (PMM), obtidas através da combinação das sondas fluorescentes iodeto de proprídio, aglutinina de *Pisum sativum* conjugada à fluoresceína de isotiocianato - FITC-PSA e iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina - JC-1, nos diferentes diluidores estudados (TRIS+GLI6%, TRIS+DMA3%, TRIS+DMA6% TRIS+DMA3%+TRE; TRIS+DMA3%+TRE, TRIS+DMA3%+TRE+EDTA, TRIS+DMA6%+TRE+EDTA).

Parâmetro	TRATAMENTO						
	TRIS+GLI6%	TRIS+DMA3%	TRIS+DMA6%	TRIS+DMA3%+TRE	TRIS+DMA6%+TRE	TRIS+DMA3%+TRE+EDTA	TRIS+DMA6%+TRE+EDTA
<b>IMP (%)</b>	29,0 a ± 16,6	18,2 bc ± 10,2	08,3 d ± 08,9	25,2 ab ± 04,9	09,8 cd ± 06,1	20,7 ab ± 05,0	15,4 bcd ± 05,1
<b>IAC (%)</b>	76,6 a ± 10,0	69,2 a ± 16,5	45,0 c ± 18,3	72,2 a ± 09,1	55,2 bc ± 13,2	70,1 a ± 12,5	64,5 ab ± 10,8
<b>PMM (%)</b>	51,2 ± 33,4	16,6 ± 25,0	31,0 ± 33,2	48,5 ± 27,1	40,4 ± 38,4	42,7 ± 31,4	52,0 ± 25,6

Valores seguidos de letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ).

Os índices de integridade da membrana acrossomal (IAC) variaram consideravelmente entre os diluidores estudados (de 45,0 a 76,6%) e essas diferenças entre os tratamentos foram verificadas pela ANOVA (Anexo II). O percentual médio de IAC obtido neste experimento (65,4%) foi inferior ao observado por Sousa (2007) (73,3%) e superior aos encontrados por Maia (2006) e Azevedo (2006) de 59,9% 51,5%, respectivamente. Todos esses estudos foram com ovinos e utilizaram a associação FITC-PSA para avaliação da IAC.

As médias de IAC foram fortemente influenciadas pela concentração de DMA no meio, cujos grupos com 6% de DMA (TRIS+DMA6% e TRIS+DMA6%+TRE) obtiveram os piores ( $P < 0,05$ ) índices em relação ao grupo controle e aos com 3% de DMA. Dentro dos meios com 6% de DMA, observou-se para a IAC o efeito positivo da associação TRE+EDTA, que o melhorou numericamente, em relação ao diluidor só com TRE, fazendo-o diferir do meio similar sem aditivos (TRIS+DMA6%) e igualando-o ao grupo controle e aos outros com 3% de DMA. Os demais grupos não diferiram entre si ( $P > 0,05$ ) para esta variável.

Não foi verificado efeito significativo do tratamento pela ANOVA sobre o parâmetro PMM (Anexo II).

O percentual médio de PMM obtido neste trabalho foi de 40,4%, índice superior aos verificados por Martinez-Pastor et al. (2004) – 23,3%; Maia (2006) -

1,6% e Azevedo (2006) – 19,5%, todos trabalhando com ovinos e ao obtidos por Gonzalez (2004) – 18,03%, Bollwein et al. (2008) – 23,8% e Celeghini (2005) – 1 a 5%, com bovinos. Índices superiores de PMM aos deste estudo foram relatados por Connell et al (2002) – 39,8% com humanos e Nascimento (2006) – 44,6% com equinos. Todos os estudos citados utilizaram a JC-1 para avaliação do PMM, exceto Connell et al. (2002) que trabalhou com Rodamina123.

Os percentuais médios obtidos nos diferentes tratamentos foram semelhantes entre si ( $P>0,05$ ) e podem ser observados na Tabela 5. Apesar da nítida diferença numérica entre os percentuais de PMM nos diferentes tratamentos, essa não passou de uma tendência estatística, principalmente quando comparados os grupos TRIS+GLI6% e TRIS+DMA3% (51,2% versus 16,6%,  $P=0,08$ ) e TRIS+DMA6%+TRE+EDTA com o TRIS+DMA3% (52,0% versus 16,6%,  $P=0,07$ ).

Os resultados obtidos com este estudo sugerem que, apesar das tendências numéricas, o PMM não foi influenciado ( $P>0,05$ ) pela adição da TRE ou desta associada ao EDTA, como também não sofreu efeito do percentual de DMA testado.

### 3.5. Correlações Entre os Parâmetros Espermáticos Estudados

Os coeficientes de correlação linear obtidos pelo teste de *Pearson*, entre os parâmetros de cinética espermática (MPH, VAP, VSL e LIN) e os de integridade das membranas espermáticas (SV, IMP, IAC e PMM) podem ser observados na Tabela 6.

Foram verificadas correlações positivas elevadas e altamente significativas entre os parâmetros da cinética espermática obtidos pela análise computadorizada (Tabela 6). Pode-se observar a alta magnitude ( $r=0,77$  e  $r=0,80$ ,  $P<0,0001$ ) das correlações entre a MPH e as velocidades espermáticas (VAP, VSL) e entre a MPH e a LIN ( $r=0,64$ ,  $P<0,0001$ ), estas duas últimas, características que indicam a progressividade do movimento espermático.

A interação entre os parâmetros de cinética e integridade das membranas espermáticas também foi analisada (Tabela 6) e verificou-se que a taxa de integridade da membrana plasmática, obtida pelo teste supravital com corante

eosina (SV) demonstrou correlações positivas e altamente significativas ( $P < 0,001$ ) com quase todos os parâmetros estudados aqui (exceto PMM).

TABELA 6. Coeficientes de correlações observados entre os parâmetros de cinética espermática e os de integridade das membranas espermáticas.

	SV	IMP	IAC	PMM	MPH	VAP	VSL	LIN
SV	1,00	-	-	-	-	-	-	-
IMP	0,57***	1,00	-	-	-	-	-	-
IAC	0,59***	0,68***	1,00	-	-	-	-	-
PMM	0,002	0,06	0,01	1,00	-	-	-	-
MPH	0,66***	0,60***	0,57***	0,11	1,00	-	-	-
VAP	0,31**	0,34*	0,28*	0,14	0,77***	1,00	-	-
VSL	0,32**	0,37*	0,31*	0,14	0,80***	0,99***	1,00	-
LIN	0,34**	0,48***	0,48***	0,19	0,64***	0,51***	0,60***	1,00

• : Coeficientes de correlação obtidos pelo teste de correlação linear de *Pearson*. Integridade da membrana plasmática pelo teste supravital eosina (SV), integridade da membrana plasmática (IMP) e acrossomal (IAC) e alto potencial da membrana mitocondrial (PMM), observados pela associação das sondas fluorescentes IP, FITC-PSA e JC-1 (1000X). Motilidade progressiva computadorizada (MPH), velocidade progressiva (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade de trajeto (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), e linearidade (%).

\*  $P < 0,05$

\*\*  $P < 0,01$

\*\*\*  $P < 0,0001$

O mesmo pode ser verificado para o parâmetro IMP, avaliada pela microscopia de fluorescência, que correlacionou-se positivamente ( $P < 0,05$ ) com as características da cinética espermática e com a integridade da membrana acrossomal, IAC ( $r=0,59$ ,  $P < 0,0001$ )

Como ocorreu com o SV e a IMP a integridade da membrana acrossomal (IAC) apresentou correlação significativa ( $P < 0,05$ ) com todos os parâmetros da cinética espermática.

Na Tabela 6 observa-se que PMM não apresentou correlação com nenhum dos parâmetros da cinética espermática confrontados pelo teste de *Pearson* ( $P > 0,05$ ).



Os coeficientes de correlação obtidos entre os parâmetros da integridade das membranas espermáticas (SV, IMP, IAC e PMM) estão descritos na Tabela 6. Pode-se verificar a ocorrência de correlação positiva ( $P < 0,05$ ) entre SV e IMP ( $r = 0,57$ ) e SV e IAC ( $r = 0,59$ ).

A correlação positiva ( $P < 0,05$ ) evidenciada entre SV e IAC também foi demonstrada entre IMP e IAC ( $r = 0,68$ ,  $P < 0,0001$ ).

Não foi observada neste estudo, correlação significativa entre o PMM e os demais parâmetros de integridade das membranas espermáticas (Tabela 6).

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Avaliação Subjetiva e Computadorizada da Cinética Espermática

O efeito tóxico da DMA na concentração de 6% verificado no presente trabalho discorda dos resultados obtidos por Medeiros et al. (2002) com equinos, ao testarem a DMA em concentração bem próxima a utilizada aqui (5%). Os autores obtiveram bons índices de congelabilidade do sêmen de garanhões, com taxas de MTH e MPH semelhantes quando comparado ao glicerol a 5% (46,6% e 10% *versus* 27,9% e 8,75%,  $P > 0,05$ ). Os valores de VCL ( $\mu\text{m/s}$ ) e RAP (%) também foram semelhantes (56,0 e 24,9 *versus* 60,2 e 16,7,  $P > 0,05$ ) entre os dois grupos. É diferente do observado no presente trabalho, o estudo citado verificou que a DMA a 3% propiciou melhores ( $P < 0,05$ ) índices de MP em relação ao sêmen congelado com GLI a 5% (15,2% *versus* 8,7). Os autores, no entanto, relatam que a superioridade das amidas frente ao GLI pode ser explicada, pelo fato de boa parte dos garanhões utilizados no trabalho apresentavam baixa congelabilidade ao GLI (*bad freezers*). Resultado semelhante foi obtido por Gomes et al. (2002) ao verificarem a superioridade das motilidades subjetivas e computadorizadas obtidas com a dimetilformamida a 5%, comparada ao GLI na mesma concentração. Os autores relataram se tratar de garanhões com baixa congelabilidade ao GLI, já que apenas dois dos 17 machos apresentaram boa qualidade do sêmen pós-descongelação, utilizando este crioprotetor. Entretanto, ao se trabalhar com machos com boa congelabilidade ao GLI, tem-se obtido índices semelhantes de viabilidade espermática pós-

descongelamento com a utilização do GLI ou das amidas (GRAHAM, 2002; SQUIRES et al., 2004).

BIANCHI et al. (2008) com suínos relataram a superioridade da DMA (5%) frente ao GLI (3%), em relação a MTS pós-descongelamento (53,8 *versus* 38,1%). E diferentemente do verificado no presente estudo, a DMA não apresentou efeito deletério sobre a cinética espermática em concentrações de até 7%.

É importante ressaltar a existência de diferenças intrínsecas importantes entre os espermatozoides das espécies estudadas, que provavelmente levam às respostas diferentes de acordo com o crioprotetor utilizado e seus níveis de tolerância. Um exemplo claro disto é que diferente do que ocorre com os ruminantes, a alta toxicidade apresentada pelo GLI aos espermatozoides equinos exige que os seus níveis devam ser bem baixos no meio de congelamento ( $\pm 3\%$ ), para que o sêmen desta espécie promova índices satisfatórios de fertilidade pós-descongelamento (VIDAMENT et al., 2008).

Para espécie ovina os dados são escassos com a utilização das amidas como crioprotetores. Skeff et al. (2008) testaram a metilformamida (MF) para a preservação do sêmen ovino em diferentes concentrações (3, 5, 7 e 9%) e comparou ao glicerol (5,3%). A MF na concentração de 3% proporcionou índices de MTS e integridade de membrana pós-descongelamento, e após o teste de termo-resistência lento (3h), semelhantes ( $P > 0,05$ ) ao obtido com o GLI. E assim como observado neste trabalho, também verificaram efeito deletério sobre os parâmetros espermáticos com a amida nas concentrações mais elevadas. Os autores sugeriram que também para a espécie ovina, as amidas podem representar uma alternativa importante para a preservação espermática, sendo necessário, no entanto, estudos para analisar sua fertilidade *in vivo*.

Diversos trabalhos têm relatado bons resultados com o uso de meio hiperosmótico a base de TRE para a congelamento do sêmen ovino (AISEN et al., 2002, ABGOALA e TERADA, 2004; AISEN et al., 2005, BUCAK et al., 2007). Aisen et al. (2002) estudando os melhores níveis de TRE (50 a 400mOsmol) em meio isosmótico a base de Tris observaram maior ( $P < 0,05$ ) índice de MTS com a adição de 100mOsmol de TRE, quando comparado ao meio isosmótico (52% *versus* 32%). Já Bucak et al. (2007) ao testarem a TRE nas concentrações de 50 e 100mOsmol obtiveram taxas de MTS, respectivamente, de 59 e 56%, sendo a primeira superior ( $P < 0,05$ ) à obtida com o meio similar sem a TRE.

Neste trabalho, entretanto, a adição da TRE ao meio diluidor não promoveu melhorias sobre os índices de cinética espermática pós-descongelção, como relatado nos trabalhos anteriores.

O efeito deletério da adição da TRE (100mOsmol) ao meio isosmótico pode estar ligado ao efeito osmótico proporcionado pela mesma e ao tempo de exposição dos espermatozoides ovinos ao ambiente hiperosmótico. Este trabalho seguiu metodologia descrita em trabalhos anteriores (AISEN et al., 2000; AISEN et al., 2002, BUCAK et al., 2007) que preconiza a diluição do sêmen no meio hiperosmótico de congelação previamente o processo de resfriamento e estabilização à 5°C, que ocorreu em duas horas, assim como indicado nos trabalhos.

A osmolaridade do meio hiperosmótico utilizado no presente trabalho foi de 460mOsmol/Kg, estando esta abaixo dos níveis de tolerância do espermatozoide ovino, que segundo Peris et al. (2000) suporta sem danos osmolaridades de até 910mOsmol. Entretanto, trabalho conduzido por Becker (2004) verificou que a exposição dos espermatozoides caprinos por 30 minutos em solução hiperosmótica de sacarose a 490mOsmol provocou uma elevada redução no percentual de espermatozoides móveis (45,7% do controle). Em outro estudo da mesma autora pode-se verificar que períodos de exposição inferiores a 10 minutos em meio Tris-gema de ovo, adicionado de 375mOsmol de sacarose, proporcionaram melhores índices de MTS pós-descongelção, levando a autora a reduzir para apenas cinco minutos o tempo de exposição do sêmen caprino ao meio hiperosmótico, previamente a congelação. Protocolo semelhante foi descrito por Abgoala e Terada (2004), utilizando um tempo de exposição de apenas 15 minutos à solução hiperosmótica de TRE previamente a congelação.

Com essas observações pode-se sugerir que os índices negativos obtidos com os meios hiperosmóticos de TRE ( $\pm 460$ mOsmol/Kg) desse estudo estariam relacionados à excessiva exposição do sêmen ovino ao meio hiperosmótico enriquecido com 100mOsmol de TRE, o que também pode explicar outros relatos de insucesso com a utilização da trealose para a congelação do sêmen ovino, como o estudo realizado por Valleriote et al. (2005) e Bittencourt et al. (2007), que não observaram benefício da adição da trealose ao diluidor de congelação. Esses últimos encontraram, através da análise computadorizada, taxas inferiores ( $P < 0,05$ ) de MTH, VCL e ALH para o sêmen congelado com adição de 100mOsmol de TRE, comparado com o grupo controle Tris-gema de ovo (83% e 67%, respectivamente).

Diferenças entre os resultados obtidos neste estudo e os demais, referente ao efeito da TRE, podem estar ligadas a outros fatores como variações nos protocolos de diluição (uma ou duas etapas), descongelamento (curva de descongelamento) e rediluição, composição do meio diluidor (concentração de gema e glicerol), comprometendo o efeito comparativo.

Outro fator que pode ter contribuído para a redução nos valores da cinética espermática, verificada nos meios hiperosmóticos, é a maior densidade do meio hipertônico, que pode prejudicar a capacidade de deslocamento espermático, reduzindo as velocidades dos movimentos (VAP, VSL, VCL). Concordando com esta afirmação, Mortimer (1997) relatou que o aumento da densidade do meio externo dos espermatozoides resultou em diminuição da amplitude da onda flagelar. E Amirat et al. (2004) descreveram valores superiores para VCL e VAP em diluidor contendo lipoproteína de baixa densidade, em relação a meio com gema de ovo.

Diferente do observado por Dhami e Sahni (1993) e Bittencourt et al. (2004), cuja adição de 0,1% de EDTA ao meio de congelamento de sêmen, proporcionou índices de 10-12% a mais na MTS, neste trabalho não houve efeito da adição EDTA ou este foi negativo, como verificado para VAP e VSL que tiveram menores valores no meio TRIS+DMA3%+TRE+EDTA comparado ao TRIS+DMA3%+TRE. Resultados semelhantes foram relatados por Aisen et al. (2000), que não observaram melhora da cinética espermática ovina pós-descongelamento com uso do EDTA.

Essas divergências observadas entre os trabalhos sobre a eficácia da utilização do EDTA para a criopreservação espermática esta relacionada à ocorrência de alguns fenômenos, e entre estes o principal seria o fator de interação entre os componentes do meio diluidor, uma vez que nem sempre a remoção do cálcio do meio extracelular é desejável. Este fato foi observado em estudo que, ao avaliar o efeito da associação EDTA e TRE (AISEN et al., 2005), demonstrou que o diluidor com EDTA ao retirar o cálcio do meio extracelular, inibiu a ação antioxidante da trealose, sugerindo a existência de um efeito positivo da interação entre a trealose e o cálcio, sobre a região polar dos fosfolipídios da membrana espermática.

#### 4.2. Avaliação da Viabilidade Espermática – Teste Supravital

A redução dos índices de viabilidade espermática pós-descongelção, pelo teste supravital, também foi verificada em ovinos por Valente et al. (2009). Estes autores observaram quedas significativas ( $P < 0,05$ ) de SV de 84% e 85% no sêmen *in natura*, para 59% e 66%, respectivamente, pós-descongelção, de acordo com o meio de congelação testado. No presente estudo foram obtidas reduções nos índices de SV que variaram de  $\pm 21,7\%$  (TRIS+GLI6%) até  $\pm 54,6\%$  (TRIS+GLI6%), índices estes próximos aos obtidos por Valente et al. (2009), de  $\pm 19$  a 25%.

Bucak et al. (2007) relataram taxas de SV de 76,7%, 66,0% e 72,2%, para o sêmen ovino congelado respectivamente, em meio isosmótico e este acrescido de 50 e 100mOsmol de TRE. Estes índices não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre os grupos e foram superiores a média obtida neste trabalho, para todos os grupos experimentais ( $\pm 49,0\%$ ).

Os resultados verificados para SV refletiram o efeito deletério proporcionado pela DMA na concentração de 6%, que reduziu significativamente os índices de SV. Os maiores ( $P < 0,05$ ) percentuais de danos de membrana plasmática, determinados pelo teste supravital com o corante eosina, com a DMA a 6%, reforça os resultados obtidos através da avaliação da cinética espermática. E entre estes grupos, houve uma influência benéfica da TRE, que proporcionou uma maior ( $P < 0,05$ ) manutenção de SV, comparado com o diluidor com 6% de DMA e sem TRE (TRIS+DMA6%), grupo este que obteve os menores ( $P < 0,05$ ) índices de SV entre todos os meios testados (Tabela 4).

De fato a TRE exerce atividade crioprotetora sobre a membrana plasmática, devido à sua capacidade de estabelecer pontes de hidrogênio com as cabeças polares dos fosfolipídios da membrana, substituindo as moléculas de água durante o processo de desidratação o que inibe a ocorrência dos eventos de fusão das membranas plasmáticas (BAKÁS E DISALVO et al., 1991).

O percentual de SV não variou ( $P > 0,05$ ) entre os espermatozoides congelados com o grupo controle TRIS+GLI6% e com os diluidores com 3% de DMA. Resultados semelhantes foram descritos por Medeiros et al. (2000) com equinos que não observaram diferença para a integridade de membrana espermática, avaliada por fluorescência (IP e CFDA), entre o sêmen congelado com 3% de DMA ou 5% e GLI. Da mesma forma Henry et al. (2002) não verificaram diferença para a taxa de integridade da membrana plasmática ovina (IP e CFDA e teste hiposmótico) para o sêmen congelado com 3,5% de acetamida e 5% de GLI, evidenciando que os

crioprotetores a base de amida são uma alternativa segura para a criopreservação de sêmen de garanhões.

#### 4.3. Avaliação da Integridade das Membranas Plasmática e Acrossomal e do Potencial da Membrana Mitocondrial

O percentual médio de IMP obtido entre os grupos deste experimento foi de 18,0%. Este índice foi inferior aos 29,7% (MAIA, 2006), 21,8% (AZEVEDO, 2006) e 50,9% relatados por Sousa (2007), todos em trabalhos com ovinos e utilizando para a avaliação, a associação das mesmas sondas fluorescentes IP, FITC-PSA e JC-1, utilizadas aqui. Este índice foi comprometido pela baixa congelabilidade do sêmen nos grupos com 6% de DMA que ficaram abaixo de 15,5% (8,3% para TRIS+DMA6%; 9,8% para TRIS+DMA6%+TRE e 15,4% para TRIS+DMA6%+TRE+EDTA).

A ineficácia da TRE verificada neste estudo contradiz os achados da literatura, cuja adição da trealose ao diluidor isosmótico promoveu melhoria nos índices de manutenção da integridade da membrana plasmática. Abgoala e Terada (2003) observaram que a substituição integral do meio Tris-gema e ovo por uma solução de TRE (375mOsmol) melhorou significativamente as taxas de fluidez de membrana, melhorando os índices de congelabilidade do sêmen caprino. Ho et al. (2009) com suínos, ao adicionar diferentes concentrações de TRE (25 a 200mOsmol/Kg) ao meio isotônico, obteve melhor nível manutenção da IMP (teste hiposmótico) com 100mOsmol de TRE, em relação ao meio isotônico e aos demais grupos. Da mesma forma e utilizando o mesmo método de avaliação, Aisen et al. (2002) verificaram uma melhoria dos níveis de IMP dos espermatozoides ovinos, além de taxas de nascimento duas vezes e meia superior com um meio hiperosmótico enriquecido com de 100mOsmol de TRE (semelhante ao grupo TRIS+GLI3%+TRE), em relação ao grupo isosmótico sem TRE (semelhante ao grupo TRIS+GLI3%). Em trabalho posterior utilizando com os mesmos grupos experimentais (meio isosmótico *versus* TRE 100mOsmol), Aisen et al. (2005) encontraram maiores níveis de IMP, avaliada por microscopia eletrônica com o diluidor com TRE, em relação ao sem TRE (72,6% *versus* 33,4%).

Entretanto, é importante chamar atenção ao fato de que ao introduzir a TRE no meio com 3% de DMA, a taxa de IMP aumentou numericamente ( $P>0,05$ ) em relação ao similar sem TRE, igualando-se ( $P>0,05$ ) a obtida com o grupo controle (TRIS+GLI6%). Fato semelhante ocorreu com a adição da TRE ao meio com 6% de DMA, que promoveu a elevação ( $P>0,05$ ) dos valores de IMP, em relação ao meio sem TRE (TRIS+DMA6%), que se tornaram semelhantes ( $P>0,05$ ) a obtida com o meio isosmótico com DMA a 3% (TRIS+DMA3%) Este fato sugere que a TRE de certa forma melhorou os índices de IMP, mesmo que discretamente.

O uso da TRE tem resultado em achados conflitantes, tanto entre trabalhos diferentes como no mesmo. Valente et al. (2009), que apesar de ter obtido com a eosina nigrosina índices superiores ( $P<0,05$ ) de integridade de membrana plasmática (66,5% *versus* 59,8%), para o sêmen ovino congelado em meio hiperosmótico com trealose e menores níveis de gema de ovo (G1: 15% de gema *versus* G2: 4,5% de gema mais 88mOsmol de TRE), verificou para este, taxas inferiores ( $P<0,05$ ) de integridade da membrana pelo teste hiposmótico (32,1% *versus* 40,6%). E os resultados com a TRE foram ainda piores ( $P<0,05$ ) no teste *in vivo*, refletido nos baixos índices de fertilidade das fêmeas inseminadas (3,8% *versus* 20,5%).

A ausência de efeito positivo ou negativo da adição da TRE ao meio de congelamento isosmótico, sobre os níveis de IMP, já foi relatado anteriormente (VALLERIOTE et al., 2005, BITTENCOURT et al., 2007, BUCAK et al., 2007).

O efeito deletério da utilização do DMA a 6%, assim como observado para a maioria dos parâmetros da cinética espermática e SV, também se refletiu sobre os índices inferiores de IMP ( $P<0,05$ ), em relação aos meios a DMA a 3%, cujos grupos TRIS+DMA6% e TRIS+DMA6%+TRE, acarretaram os menores índices de IMP, quando comparados aos diluidores com apenas metade do crioprotetor (Tabela 5). Em outras espécies as amidas, como a DMA, têm sido utilizadas para a criopreservação do sêmen em níveis semelhantes ao utilizado neste estudo (5%) (MEDEIROS et al., 2002; BIANCHI et al., 2008) até percentuais acima de 11% (TSELUTIN et al, 1999; ZEE et al., 2008), sem exercer nenhum efeito tóxico sobre os espermatozoides. Para a espécie ovina não se tem relatos dos níveis de tolerância e toxicidade que as amidas exercem sobre o espermatozoide desta espécie. Entretanto, Skeff et al. (2008) verificaram que as concentrações de 7 e 9% da acetamida proporcionaram piores taxas de MP pós-descongelamento que esta a 3 e

5%, o que faz sugerir que os níveis de tolerância do sêmen ovina às amidas, provavelmente sejam inferiores aos observados em outras espécies.

Ao compararmos os índices de IMP e IAC, indiferentemente dos tratamentos, pode-se constatar ser este último parâmetro mais resistente às injúrias provocadas pelo processo de criopreservação. Essa afirmação corrobora com os diversos achados na literatura, com diferentes espécies, que relatam reduções muito inferiores nos níveis de IAC em relação à IMP, após o processo de congelação-descongelação (MAIA, 2006; AZEVEDO, 2006; CELEGHINI et al., 2008; VALENTE et al., 2009) o que justifica seus índices superiores.

A adição a TRE sozinha não exerceu efeito sobre os níveis de IAC nos diluidores testados (Tabela 5). Relatos similares foram feitos por Aisen et al. (2000); Aisen et al. (2002) e Valente et al. (2009) que não observaram diferenças nos percentuais de células com lesões acrossomais na microscopia de contraste de fase, após congelação em meio com e sem TRE. Discordando destes relatos Hu et al. (2009), utilizando a sonda fluorescente FITC-PNA, detectaram maiores níveis de IAC nos espermatozoides congelados com diferentes concentrações de TRE (25 a 200mOsmol) que no meio sem TRE.

Entretanto, quando em associação com o EDTA (TRIS+DMA6%+TRE+EDTA) a TRE proporcionou uma melhoria dos índices de IAC no sêmen congelado com 6% de DMA.

Os altos níveis de cálcio estão relacionados à ocorrência de alterações no acrossomo espermático e exercem papel importante no processo de reação acrossomal (ROLDAN et al., 1994), que pode ser inibido na presença do EDTA, ao quelar o  $Ca^{++}$  no meio extracelular impedindo seu influxo. Além disto, os níveis excessivos de  $Ca^{++}$  competem a TRE pelos mesmos sítios de ligação na membrana plasmática, inibindo a sua atividade crioprotetora (BAKÁS e DISALVO, 1991). Desta forma, a atividade de crioproteção da TRE pode ser potencializada quando a mesma é utilizada em conjunto com o EDTA, que seqüestra o  $Ca^{++}$  extracelular, deixando a TRE livre para exercer em plenitude a sua atividade crioprotetora (BAKÁS e DISALVO, 1991; AISEN et al., 2000). Estas observações podem explicar o ocorrido com o diluidor com 6% de DMA, cujos valores numéricos de IAC foram melhorados com a adição do EDTA (TRIS+DMA6%+TRE+EDTA), o fazendo superar ( $P < 0,05$ ) dos obtidos com o diluidor similar isosmótico (TRIS+DMA6%) e se igualar ao grupo controle e demais com 3% de DMA. Relato semelhante foi feito Aisen et al. (2000)



que observaram efeito positivo do EDTA sobre a integridade acrossomal, quando associado à TRE.

Diferente do observado neste experimento, LANDIN-ALVARENGA et al. (2002) em trabalhos com equinos e utilizando a associação FITC-PNA, observaram melhores ( $P < 0,05$ ) índices de IAC com a utilização do DMA a 5%, em relação ao GLI na mesma concentração (55,6% *versus* 34,4%). Os autores concluíram que a superioridade das amidas sobre o GLI está relacionada à menor toxicidade, ao menor peso molecular, além de serem mais permeáveis às células e com maior capacidade coligativa com a água, favorecendo sua atividade crioprotetora sobre os parâmetros espermáticos avaliados. Entretanto, fica claro pelos resultados apresentados pelos autores anteriores, que o estudo foi conduzido com cavalos que apresentavam baixa congelabilidade ao GLI, o que pode ter influenciado na superioridade das amidas.

Era esperado um efeito positivo do EDTA sobre a PMM, já que o influxo de cálcio intracelular derivado do processo de resfriamento do sêmen promove a ativação das fosfolipases, ocorrendo hidrólise dos fosfolipídios da membrana espermática. Tanto as alterações provocadas aos fosfolipídios, como a formação de ácidos graxos livres, acarretam um aumento da permeabilidade e lesão da membrana mitocondrial (AMANN e PICKETT, 1987). A adição do EDTA ao diluidor de congelação deveria minimizar esse processo, melhorando os níveis de PMM, pois captaria o cálcio extracelular impedindo seu influxo. As justificativas utilizadas anteriormente para ausência de efeito da utilização do EDTA nos diluidores aqui testados, também se adequam para os níveis de PMM.

Os parâmetros da cinética espermática estão intimamente relacionados a atividade mitocondrial e refletem, de acordo com a suas magnitudes, o estatus funcional das mitocôndrias e a sua capacidade metabólica para fornecimento de energia à célula. Correlações positivas entre PMM e a cinética espermática foram descritos por diversos autores com diferentes espécies (Connell et al., 2002; Martinez-Pastor et al., 2004; Gonzalez, 2005; Celeghini et al., 2008).

Seguindo esse raciocínio a baixa taxa de PMM observada com o diluidor TRIS+DMA3% (16,6%) que tendeu a significância ( $P \geq 0,06$ ), em relação ao TRIS+GLI6% e TRIS+DMA6%+TRE+EDTA, não condiz com os achados da cinética espermática para este grupo, que obteve os maiores ( $P < 0,05$ ) valores de MP, VAP, VSL, VCL e RAP em relação aos demais diluidores com amidas, apesar de

inferiores ( $P < 0,05$ ), quando comparados ao grupo controle com GLI. Porém, os maiores valores obtidos na cinética espermática para o TRIS+DMA3%, em relação aos demais grupos congelados com amida, podem ser justificados pelo fato deste não estar sobre influência da densidade do meio, aumentada com a adição da TRE e que como já citado anteriormente pode interferir na magnitude das características da cinética espermática. E a comparação com o outro diluidor isosmótico sem TRE (TRIS+DMA6%) fica prejudicada pela atividade tóxica da DMA na concentração de 6%, que deprimiu a atividade espermática ovina.

#### 4.4. Correlações Entre os Parâmetros Espermáticos Estudados

Foram verificadas correlações altas e positivas entre todos os parâmetros da cinética espermática. Resultados semelhantes foram descritos por Al-Qarawi et al. (2002) ao observarem correlações positivas ( $P < 0,05$ ) entre MPH e VSL, VAP, VCL, ALH, LIN e STR. Assim como neste trabalho, Al-Quarawi também obteve correlações positivas entre VAP, VSL e LIN ( $P < 0,05$ ).

As correlações positivas e altamente significativas entre SV e todos os parâmetros confrontados (exceto PMM), demonstra ser este um teste eficaz para avaliação do percentual de células móveis e do status morfofuncional das mesmas e que, pelo seu baixo custo e praticidade, pode ser facilmente implementada nas atividades de rotina de campo e pesquisa.

A existência de correlação entre IMP e a MPH também foram citadas por Celeghini et al. (2008), os quais verificaram para esta coeficientes acima de 91% ( $P < 0,05$ ). Estas correlações são esperadas, já que a integridade estrutural e funcional da membrana plasmática dos espermatozoides é fundamental para a manutenção da sua viabilidade e do metabolismo celular, que é refletido no percentual de células móveis.

A correlação positiva observada entre IMP e LIN é um achado importante, pois este último é utilizado para caracterizar qualidade do movimento espermático (VERSTEGEN et al., 2002) e a IMP para determinar viabilidade estrutural e funcional dos espermatozoides, de forma que seus valores devem se comportar de forma diretamente proporcional.

A Integridade da membrana acrossomal e a MPH apresentaram elevadas correlações positivas e significativas e isso já era esperada e justificável, já que para que ocorram as alterações na membrana acrossomal, possivelmente a membrana plasmática já foi lesada (AZEVEDO, 2006), pois esta é muito mais sensível às injúrias provocadas pelo processo de criopreservação que a membrana acrossomal, o que compromete o metabolismo celular e interfere na motilidade espermática.

Diferente dos achados do presente estudo, Connell et al. (2002) e Martinez-Pastor et al. (2004), em trabalho com ovinos, Gonzalez (2005) e Celeghini et al. (2008) com bovinos, encontraram correlações significativas entre PMM e as motilidades espermáticas.

Correlações positivas entre o PMM e VSL, VCL e LIN foram descritas anteriormente por Connell et al. (2002) para o sêmen in natura de homens. Entretanto, após a criopreservação essas correlações na sua maioria desapareceram e restringiram-se a MP, LIN, revelando que o sêmen congelado, após as alterações sofridas durante a preservação comporta-se de forma diferente em relação às suas características e às respectivas interações entre elas.

Os resultados conflitantes entre os resultados observados da literatura e os obtidos no presente trabalho, sobre o PMM e sua correlação com a motilidade espermática pode-se explicar, pois no presente estudo as células com PMM não se restringiram às subpopulações espermáticas com membrana plasmática íntegra e conseqüentemente com motilidade espermática, como verificado na grande parte dos trabalhos consultados. De forma que a correlação entre o percentual de células móveis e PMM pode ter sido influenciada.

O parâmetro SV além de apresentar correlações positivas ( $P < 0,05$ ) com as características da cinética espermática, também demonstrou estar correlacionada com a IMP ( $r=0,57$ ,  $P < 0,0001$ ) e IAC ( $r=0,59$ ,  $P < 0,0001$ ), reafirmando a importância desse teste para estimar a viabilidade espermática, principalmente pelo baixo custo e praticidade do mesmo.

A forte interação observada entre IMP e IAC ( $r=0,68$ ,  $P < 0,0001$ ) é explicada já que mecanismos de ocorrência das alterações acrossomais estão intimamente relacionados aos da membrana plasmática, sejam eles relacionados às injúrias diretas provocadas pelo processo de criopreservação (variação osmótica, desidratação e formação de macrocristais intracelulares) ou pelo processo cronológico de degradação celular, relacionados à criocapacitação (GREEN e

WATSON, 2001). Isso explicaria a correlação positiva entre esses parâmetros, já relatada anteriormente (GONZALEZ, 2004).

Como verificado no presente trabalho, Martinez-Pastor et al. (2004) reportaram a ausência de correlação entre PMM e IMP, avaliados pela combinação do Hoescht 258 e JC-1. Entretanto, discordando desses achados Gonzalez (2004) e Bollwein et al. (2008) verificaram elevadas correlações positivas ( $r > 0,90$ ,  $P < 0,05$ ) entre IMP e PMM.

Como relatado por Sousa (2007), no presente estudo observou-se um importante percentual das células com PMM que também apresentava lesão da membrana plasmática, já descritas e classificadas anteriormente por Papaioannou et al. (1997) como células moribundas (em degeneração), o que pode ter influenciado a ausência de correlação entre PMM e IMP.

## 5. CONCLUSÕES

Levando-se em consideração os resultados obtidos com este experimento podem-se chegar às seguintes conclusões:

O diluidor isosmótico com glicerol na concentração de 6%, utilizado como grupo controle do experimento, foi o mais eficaz para a manutenção das características espermáticas, quando comparado aos demais que continham a dimetilacetamida como crioprotetor

A dimetilacetamida na concentração de 6% revelou efeito deletério importante sobre os parâmetros de viabilidade espermática pós-descongelção, quando comparada a concentração de 3%.

A adição da trealose aos meios de congelação deprimiu os parâmetros da cinética espermática, embora tenha proporcionado em alguns diluidores efeito positivo sobre a integridade da membrana plasmática e acrossomal, reforçando a hipótese de que a influência negativa sobre a cinética espermática esteja restrita ao fato do meio hiperosmótico, devido a sua maior densidade, promover maior resistência ao deslocamento celular.

Foi verificado efeito sinérgico entre a trealose e o EDTA para a manutenção dos índices de integridade acrossomal, quando adicionado ao diluidor com 6% de dimetilacetamida.

Os resultados obtidos com os testes *in vitro* permitem concluir com segurança que o diluidor isosmótico com glicerol a 6% foi o mais eficaz para manutenção dos índices de viabilidade do sêmen ovinos pós-descongelção;

O estudo da integridade da membrana plasmática através do teste supravital com eosina pode ser utilizada como técnica de análise da qualidade seminal, quando há limitação da utilização de métodos mais avançados, pois, apresenta correlações significativas com diversos métodos de avaliação da viabilidade da célula espermática ovina.

## 6. REFERÊNCIAS

AZEVEDO, H.C. **Integridade e funcionalidade dos espermatozoides ovinos submetidos à criopreservação após a incorporação de colesterol, demosterol, ácido oléico-linoléico e  $\alpha$ -Lactoalbumina.** 2006, 195p Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

ABOAGLA, E.M., TERADA, T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1245–1250, 2003.

AISEN, E.G., QUINTANA M, MEDINA V, MORELLO H, VENTURINO A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. **Cryobiology**, v.50, n.3 , p.239-249, 2005.

AISEN, E.G.; MEDINA V.; VENTURINO A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. **Theriogenology**, v.57, n.7, p.1801-1808, 2002.

AISEN, E.G.; ALVAREZ, H.L.; VENTURINO A.; GARDE, J.J. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. **Theriogenology**, v.53, n.5, p.1053-61, 2000.

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

AMIRAT, L.; TAINURIER, D.; JEANNAU, L.; THORN, C.; GERARD, O.; COUNTERS, J.L.; ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL. A comparison with Optidyl<sup>®</sup>, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, v.61, p.895-907, 2004.

BAKAS, L.S.; DISALVO, E.A. Effect of Ca<sup>2+</sup> on the cryoprotective action of trehalose. **Cryobiology**, n.28, p.347-353, 1991.

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

BIANCHI, I.; CALDERAM, K.; MASCHIO, E.F.; MADEIRA, E.M.; DA ROSA ULGUIM, R.; CORCINI, C.D.; BONGALHARDO, D.C.; CORRÊA, E.K.; LUCIA, T. J.R.; DESCHAMPS, J.C.; CORRÊA, M.N. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. **Theriogenology**. v.15, n.69(5), p.632-638, 2008.

BITTENCOURT, R. F.; BICUDO, S. D. ; PAPA, F.O. ; VASCONCELOS, Marta Freitas ; Siqueira, J.B. ; BISCARDE, Carmo Emanuel A ; RESENDE, José ; OBA, Eunice . Avaliação da congelabilidade do sêmen de carneiros e caprinos, criopreservado com um meio hiperosmótico a base de trealose. In: XXI REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2007,

Costa do Sauípe. **Acta Scientiae Veterinariae**. Porto Alegre : UFRGS, 2007. v.35. p.999.

BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO FILHO, A. de L.; SANTOS, A.D.F.; FURST, R.; TEIXEIRA, R.B.S.; CHALHOUN, M.; PORTELA, A.P.; ALVES, S.G.G.; ALMEIDA, A.K.; GUIMARÃES, J.D. Utilização de glicerol ou etilenoglicol como crioprotetores na congelação de sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v.5, n.1, p.27-32, 2004.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordic Veterinary Medicine**, v. 25, p. 383 – 391, 1973.

BOLLWEIN, H.; FUCHS, I.; KOESS, C. Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in cryopreserved bovine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.189-195, 2008.

BUCAK, M.; ATEŞŞAHIN A.; VARIŞLI, O.; YÜCE, 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**, v.67, n.5, p.1060-1067, 2007.

CEDENHO, A.P.; TOKUNAGA, I. M. Coloração supravital para espermatozoides: comparação entre as técnicas de eosina e eosina-nigrosina / Comparison of supravital staining techniques for spermatozoa: eosin and eosin-nigrosin. **Jornal Brasileiro de Urologia**; v.16, n.4, p.234-236, 1995.

CELEGHINI, E.C. **Efeito da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatinados espermatozóides usando sondas fluorescentes**. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CELEGHINI, E.C.C. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.119-131, 2008.

CONNELL, M.; McClure., N.; LEWIS, S.E. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Humand Reproduction**, v.17, n.3, p.704-709, 2002.

DHAMI, A.J.; SAHNI, K.L.S.O. Effect of extenders, additives and deep freezing on the leakage of lactic dehydrogenase from cattle and buffalo spermatozoa. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.63, n.3, p.251-56, 1993.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. **Cryobiology**, v.23, n.1, p.1-13, 1986.

FÜRST, R.; CARVALHO, G.R.; FÜRST, M.C.O.; RUAS, J.R.M.; BORGES, A.M.; MAFILLI, V. Efeito do resfriamento do sêmen equino sobre sua congelabilidade.

**Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. [online].** v.57, n.5, pp. 599-607, 2005.

GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. In: 14TH INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 2000, **Anais...** 2000. p.307.

GREEN, C.E.; WATSON, F.P. Comparison of the capacitation state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. **Reproduction**, v.122, p.889-898, 2001.

GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F.; MEDEIROS, A.S.L.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Machador breed. **Theriogenology**, v.58, p.277-279, 2002.

GONZALEZ, R.A.F.; **Efeito da criopreservação usando diversas técnicas de congelação e crioprotetores sobre os parâmetros espermáticos e a interidade de membranas do espermatozóide bovino.** 2004, 92p Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

HANCOCH, J. L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal of the Royal Microscopical Society**, n. 76, p. 84-97, 1957.

HENRY, M. SNOECK, P.P.N.; COTTORELLO, A.C.P. Post-thaw spermatozoa plasma membrane integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants, **Theriogenology**, v.58, p.245–248, 2002.

HENRY, M.; NEVES, J.P. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2.ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49p.

HU, J.H.; LI, Q.W; JIANG, Z.L.; YANG, H.; ZHANG, S.S.; ZHAO, H.W; The Cryoprotective Effect of Trehalose Supplementation on Boar Spermatozoa Quality. **Animal Reproduction Science**, v.112, n.(1-2, p.107-118, 2009.

LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Evaluation of acrosomal integrity of stallions cryopreserved with amides and glycerol. **Animal Reproduction Science**, v.89, n.1-4, p.288-91, 2005.

MAIA, M.S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase.** 2006, 149f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu-SP.

MARTINES-PASTOR, F.; JOHANNISSON, A.; GIL, J.; KAABI, M.; ANEL, L.; PAZ, P.; RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.84, n.1-2, p.121-133, 2004.



MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, n.1, p.327-344, 2002.

MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M.; CARMO, M.T.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Cryopreservation of stallion sperm using different amides, **Theriogenology**, v.58, p.273–276, 2002.

MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Humand Reproduction Update**, v.3, n.5, p.403-439, 1997.

NASCIMENTO, J. **Efeito da concentração espermática sobre as características do movimento espermático e sobre membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides equinos criopreservados**. 2006, 107p Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PAPAIIOANNOU, K.Z.; MURPHY, R.P.; MONKS, R.S.; HYNES, N.; RYAN, M.P.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. **Theriogenology**, v.48, p.299-312, 1997.

PERIS, S.; SOLANES, D.; PENA, A, GIL, J.E.R.; RIGAU, T. Ion mediated resistance to osmotic changes of ram spermatozoa: the role of amiloride and ouabain. **Theriogenology**, v.54, n.1, p.1453-1467, 2000.

REIS, J.C.; Delineamentos experimentais. In: **Estatística aplicada à pesquisa em ciência veterinária**. Pernambuco: Independente, 2003. chap.21, p.397-411.

ROBERTS, S. J. **Veterinary obstetrics and genital diseases (Theriogenology)**. 3.ed. Michigan, Edwards Brothers, 1986, 981p.

RODELLO, L. **Validação do sistema automatizado de refrigeração e congelamento de sêmen ovino**. 2006, 70p Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v.37, p.185–249, 1995.

SAS. **User`s guide: Statistics**, version 5. Cary: SAS Institute Inc., 1996. 956p.

SKEFF, M.; SAUER, L.; LOPES FILHO, A.F.S.; LIM, A.I.P.G.; DOROTEU, E.M.; BLUME, H.; MONDADORI, R.G. Metilformamida na criopreservação de sêmen ovino. In: XXI REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2008, Guarujá. **Acta Scientiae Veterinariae**. Porto Alegre: UFRG, 2008. v. 36. p.500.

SMITH, A.H.; POLGE, C. Survival of spermatozoa at low temperatures. **Nature**, v.166, p.668-671, 1950.

SQUIRES, E.L.; KEITH, S.L.; GRAHAM, J.K.; Evaluating of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.62, n.6, p.1056-1065, 2004.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; VANDERWALL, D.K.; Mc CUE, P.M.; BRUEMMER, J. **Cooled and frozen stallion semen**. Fort Collins: Colorado State University. 1999. 80p. (Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Bulletin. N.9).

SOUSA, D.B. de. **Viabilidade das subpopulações de espermatozóides avaliadas pela cinética em sistema computadorizado e combinação de sondas fluorescentes como parâmetro qualitativo do sêmen congelado de ovinos**. 2007, 123p Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

TAKADA, L. **Avaliação da resposta ovariana na sincronização do estro e da ovulação utilizando protocolo de curta duração em ovelhas da raça Suffolk**. 2004. 151. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 2004.

TSELUTIN, K.; SEIGNEURIN, F.; BLESBOIS, E. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. **Poultry Science**, v.78, p.586-590, 1999.

VALENTE, S.S., PEREIRA, R.M., BAPTISTA, M.C.; MARQUES, C.C., VASQUES, M.I., PEREIRA, M.V., HORTA, A.E., BARBAS, J.P. In vitro and in vivo fertility of ram semen cryopreserved in different extenders. **Animal Reproduction Science**, v.117, n.1-2, p.74-77, 2009.

VALLERIOTE, P.S.; DIAS, A.J.B.; PAES DE CARVALHO, F.; PAES SOBRINHO, C. Criopreservação de sêmen ovino em solução de trealose. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, Supl.1, p.310, 2005.

VIDAMENT, M.; VINCENT, P.; MARTIN, F.X.; MAGISTRINI, M.; BLESBOIS, E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. **Animal Reproduction Science**, v.112, n.1-2, p.22-35, 2008.

VERSTEGEN, J. IGUER-OUADA, M. ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**. v.57, n.1, p.149-179, 2002.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility Development**, v.7, n.4, p.871-91, 1995.

ZEE, Y.P.; HOLT, W.V.; GOSALVEZ, J.; ALLEN, C.D.; NICOLSON, V.; PYNE, M.; BURRIDGE, M.; CARRICK, F.N.; JOHNSTON, S.D. Dimethylacetamide can be used as an alternative to glycerol for the successful cryopreservation of koala

(*Phascolarctos cinereus*) spermatozoa. **Reproduction Fertility and Development**, v.20, n.6, p.724-33, 2008.

# CAPÍTULO 4:

**EXPERIMENTO 3:**

Viabilidade e fertilidade dos espermatozoides ovinos criopreservados com a utilização do glicerol e da dimetilacetamida, em meio diluidor com e sem trealose.

.

Trabalho a ser enviado para o periódico *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*

ISSN: 15199940

Normas para publicação disponível em:

[http://revistas.ufba.br/forms/Normas\\_RBSPA.pdf](http://revistas.ufba.br/forms/Normas_RBSPA.pdf)

BITTENCOURT, R.F. Viabilidade e fertilidade dos espermatozoides ovinos criopreservados com a utilização do glicerol e da dimetilacetamida, em meio diluidor com e sem trealose. Botucatu, 2009. 201p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## RESUMO

Onze amostras de sêmen de carneiros da raça Santa Inês foram submetidas à criopreservação, com o objetivo de avaliar a eficácia da dimetilacetamida (DMA, 3%) ou do glicerol (GLI, 6%) em um meio hiperosmótico com trealose (TRE, 100mOsmol) sobre a viabilidade espermática pós-descongelção. Assim, foram formados quatro grupos experimentais: TRIS+GLI6%; TRIS+GLI6%+TRE; TRIS+DMA3% e TRIS+DMA3%+TRE. Logo após da avaliação, o sêmen foi diluído nos diferentes meios e congelado com dose inseminante de  $150 \times 10^6$  espermatozoides. Após a descongelção, realizada em banho-maria à 38°C por 50s, o sêmen foi diluído (1/20) e os parâmetros da cinética espermática avaliados subjetivamente e pela análise computadorizada (CASA). A análise da viabilidade espermática foi realizada através da associação das sondas fluorescentes iodeto de proprídio (IMP, integridade de membrana plasmática), JC-1 (PMM, potencial de membrana mitocondrial) e aglutinina de *Pisum sativum* conjugada à fluoresceína de isotiocianato - FITC-PSA (IAC, integridade acrossomal). Também foi realizada a avaliação da integridade do DNA pelo teste do Cometa. Por fim, cento e setenta fêmeas foram sincronizadas e inseminadas em tempo fixo com sêmen congelado no diferentes diluidores. Para a análise estatística das características avaliadas, foi empregado o programa estatístico (SAS), versão 5.0 (1996). A DMA apresentou baixo efeito crioprotetor sobre o espermatozoide ovino. A adição da trealose promoveu efeito negativo sobre a cinética espermática, entretanto melhorou os níveis de PMM pós-descongelção no diluidor com DMA. O GLI a 6% sem TRE foi o protocolo mais eficaz para a manutenção da integridade espermática. As taxas de concepção não diferiram ( $P>0.05$ ) entre os grupos experimentais.

Suporte Financeiro: FAPESP- Brasil proc. 05/59530-2.

BITTENCOURT, R.F. Viability and fertility of ram sperm cryopreserved with glycerol or dimethyl acetamide in extender with or without trehalose. Botucatu, 2009. 201p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Eleven semen samples of rams of the Santa Inês breed were cryopreserved with the objective of verifying the effect of the dimethyl acetamide (DMA, 3) or glycerol (GLY, 6%) in a hyperosmotic extender with trehalose (TRE, 100mOsmol) on the post-thaw sperm viability. Then, they were formed four experimental groups: TRIS+GLY6%; TRIS+GLY6%+TRE; TRIS+DMA3%; TRIS+DMA3%+TRE. After evaluation, the semen was diluted in the different extenders and frozen with of  $150 \times 10^6$  sperms/0,25mL. After the thawing accomplished in 38°C water bath for 50s, the thawed semen was diluted (1/20) and the kinetic sperm parameters were analyzed subjectively and by computer analyses system (CASA) The sperm viability evaluation was performed by using the multiple sperm parameter staining with propidium iodide (PMI, plasmatic membrane integrity), JC-1 (MMP, mitochondrial membrane potential) and Pisum sativum agglutinin conjugates with fluorescein isothiocyanate – FITC-PSA (ACI, acrosomal integrity). The DNA integrity was analyzed by Comet assay. Finally, one hundred and seventy ewes were inseminated at fixed time. All the statistical analyses were performed using the SAS software version 5.0 (1996). The DMA had a poor cryoprotective effect for ram semen. The addition of trehalose promoted negative effect on sperm kinetics; entertain improved levels of PMM post-thawing in the DMA extender. The GLI at 6% alone was the best protocol for maintaining the sperm integrity was the most effective protocol to maintain the integrity sperm. The conception rates did not present difference ( $P>0.05$ ) among the groups.

Financial support: FAPESP- Brazil proc. 05/59530-2

## 1. INTRODUÇÃO

O uso do glicerol na concentração de 3 a 8% ainda tem sido o protocolo mais utilizado para a criopreservação do sêmen de ovinos (SALAMON e MAXWELL, 2000). No entanto, efeitos deletérios sobre a viabilidade espermática, provocadas por diversos fatores como estresse osmótico, mudanças na organização, fluidez e permeabilidade da membrana plasmática e assim como desorganização da sua composição lipídica (WATSON, 1995) tem impulsionado o estudo e pesquisa por crioprotetores e aditivos alternativos que possibilitem índices de fertilidade superiores aos obtidos atualmente para a espécie ovina.

Segundo Alvarenga et al. (2005) as amidas têm apresentado níveis satisfatórios de preservação do sêmen de garanhões, principalmente naqueles reprodutores com alta intolerância ao glicerol. Esse fator foi demonstrado diversas vezes (GOMES et al., 2002; MEDEIROS et al., 2002).

Landin-Alvarenga et al. (2002), em trabalhos com equinos observaram melhores ( $P < 0,05$ ) índices de integridade acrossomal a utilização do DMA a 5%, em relação ao GLI na mesma concentração (55,6% versus 34,4%). Os autores concluíram que a superioridade das amidas sobre o GLI está relacionada à menor toxicidade, ao menor peso molecular, além de serem mais permeáveis às células e com maior capacidade coligativa com a água, favorecendo sua atividade crioprotetora.

A eficácia das amidas para a preservação dos parâmetros espermáticos *in vitro*, tem se traduzido em taxas de prenhez semelhantes às com o glicerol, como verificado por Vidament et al. (2002) utilizando o glicerol e a dimetilacetamida a 2%. E índices de prenhez superiores obtidos com amidas, em relação ao glicerol foram relatados por Moffet et al. (2003). A superioridade das amidas parece estar relacionada a uma maior longevidade no trato genital da fêmea, conferida por estas aos espermatozóides pós-descongelamento, em relação ao GLI (ALVARENGA et al., 2005).

Com ovinos, a metilformamida proporcionou taxas satisfatórias de preservação espermática, com índices semelhantes de motilidade espermática e integridade de membrana pós-descongelamento e após o teste de termoresistência lento (SKEFF et al., 2008).



Dessa forma, também para a espécie ovina, as amidas podem representar uma alternativa importante para a preservação espermática.

Um açúcar que tem se destacado como crioprotetor espermático é a trealose que é um dissacarídeo cuja atividade crioprotetora sobre as membranas plasmáticas estaria relacionada à sua capacidade de estabelecer pontes de hidrogênio com as cabeças polares dos fosfolipídios da membrana, substituindo, assim, as moléculas de água durante o processo de desidratação prevenindo a ocorrência dos eventos de fusão das membranas plasmáticas (BAKÁS e DISALVO et al., 1991).

Além de promoverem a estabilidade da membrana plasmática os dissacarídeos, como a sacarose e a trealose, também tem a capacidade de preservar as proteínas de membrana, através da substituição da água presente entre as cadeias de aminoácidos, mantendo a proteína estável e evitando sua desnaturação (LESLIE et al. 1995).

Assim, em diversos trabalhos têm-se relatado bons resultados com o uso de meio hiperosmótico à base de TRE para a congelação do sêmen ovino (AISEN et al., 2002, ABGOALA e TERADA, 2004; AISEN et al., 2005, BUCAK et al., 2007). Aisen et al. (2002) estudando os melhores níveis de TRE (50 a 400mOsmol) em meio isosmótico de Tris observaram maior ( $P < 0,05$ ) índice de motilidade com a adição de 100mOsmol de TRE, quando comparado ao meio isosmótico (52% versus 32%). Alguns trabalhos têm mostrado atividade sinérgica importante entre o EDTA e a trealose, com efeitos benéficos observados nas taxas de motilidade e preservação da morfologia espermática pós-descongelação (AISEN et al., 2000; BAKÁS e DISALVO, 1991).

Espermatozóides com lesão de DNA podem apresentar integridade estrutural e funcional das membranas e das organelas como também, padrão normal de motilidade. E apesar das lesões ocorridas no DNA espermático não interferirem no processo de fertilização ovocitária e clivagem, as alterações na estrutura do DNA são responsáveis por falhas no desenvolvimento e ocorrência da morte embrionária em estágios posteriores (NEILD et al., 2005; DRUMMEN et al., 2004). Assim, devido a importância da integridade do DNA para a fertilidade dos espermatozóides, testes que o avaliem são necessários.

O teste do cometa mensura a quebra da fita de DNA e o comprimento da “cauda do cometa” representa os fragmentos liberados do núcleo. As bases de DNA oxidadas podem ser detectadas com alta sensibilidade possibilitando a identificação

de pequenas alterações no DNA pela exposição das fitas simples ou duplas danificadas das células (Singh et al., 1988; Collins et al., 1995; Santella, 1997; Hartmann et al., 1998), sendo este uma ferramenta importante na contribuição para avaliação da qualidade do processo de congelação e dos níveis de lesão de DNA proporcionados pelo mesmo.

Assim, a realização deste trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia dos crioprotectores glicerol e dimetilacetamida, associados ou não a trealose, para a criopreservação do sêmen dos ovinos, avaliando através da inseminação artificial a capacidade fertilizante dos espermatozóides criopreservados com estes protocolos. Também foi objetivo verificar a ocorrência de correlações entre os diversos parâmetros avaliados *in vitro* e destes com as taxas de fertilidades obtidas. Por fim, este estudo procurou implementar a técnica do cometa para avaliação da integridade do DNA de espermatozóides da espécie ovina, submetidos a criopreservação.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. O local e o Período

As atividades de colheita e avaliação do sêmen *in natura* dos reprodutores ovinos, criopreservação do sêmen e inseminação artificial foram realizadas no Campo Experimental Pedro Arle, Povoado Manuino - Fazenda Queimadas, Zona Rural - Frei Paulo, Sergipe, da Unidade Tabuleiros Costeiros da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Estas etapas foram desenvolvidas de Abril a Maio de 2009.

As análises laboratoriais pós-descongelamento foram conduzidas no Laboratório de Estudos em Biotecnologia Aplicada à Reprodução de Ovinos e Caprinos e no Centro de Diagnóstico e Biotecnologia em Reprodução Animal (CERAN), pertencentes ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), município de Botucatu, Estado de São Paulo. Estas avaliações foram realizadas em Junho de 2009.

### 2.2. Animais Experimentais – Doadores de sêmen

Foram utilizados 11 carneiros adultos Santa Inês Puros de Origem (PO) (Figura 1), com registro na Associação Brasileira de Criadores de Ovinos (ARCO). Todos os reprodutores utilizados foram submetidos ao programa semestral de controle sanitário da EMBRAPA, através de vermifugação. Estes animais faziam parte do rebanho residente da EMBRAPA – Tabuleiros Costeiros-SE e foram submetidos a um regime de colheitas de sêmen e exames andrológicos e aqueles considerados aptos, conforme preconizado por Henry e Neves (1998), foram mantidos no programa. Destes animais foram colhidos pelo menos dois ejaculados consecutivos, previamente o início das colheitas com fins experimentais.



FIGURA 1: Reprodutores da raça Santa Inês utilizados como doadores de sêmen para as congelações experimentais na EMBRAPA Tabuleiros Costeiros-SE.

### 2.3. Colheita e Avaliação do Sêmen Pré-Congelação

As colheitas de sêmen foram realizadas com a utilização de vagina artificial com água aquecida entre 42 a 50°C, tendo como manequim uma fêmea em estro natural (Figura 2). O ejaculado foi colhido em tubos graduados, protegidos da luz e da temperatura ambiente por um protetor térmico. Após a colheita a amostra de sêmen era encaminhada imediatamente para o laboratório de processamento, colocado em banho-maria a temperatura de 37°C e avaliado quanto ao volume, aspecto, turbilhonamento, vigor e motilidade espermática.

O volume do ejaculado foi verificado por visualização direta do sêmen no tubo graduado e registrado em mililitros (mL), e o turbilhonamento (escala de 0-5) observado através de uma gota de sêmen sobre uma lâmina pré-aquecida em mesa aquecedora a 37°C, em microscopia óptica com aumento de 100x. Para observação do vigor (escala de 0-5) e da motilidade total e progressiva (0-100%), foi procedida a diluição (1:50) do sêmen no meio diluidor utilizado como o grupo controle do experimento (Tris-gema de ovo). A seguir 10µL desta amostra foram colocados entre lâmina e lamínula e observada em microscopia óptica com aumento de 200x, tal como preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) (HENRY e NEVES, 1998).

Para o cálculo da concentração espermática, empregou-se a câmara de Neubauer, com sêmen diluído na proporção de 10 $\mu$ L para 4mL (1:400) de solução de formol-salina tamponada (HANCOCK, 1957). A contagem foi realizada em microscopia óptica com aumento de 200x.

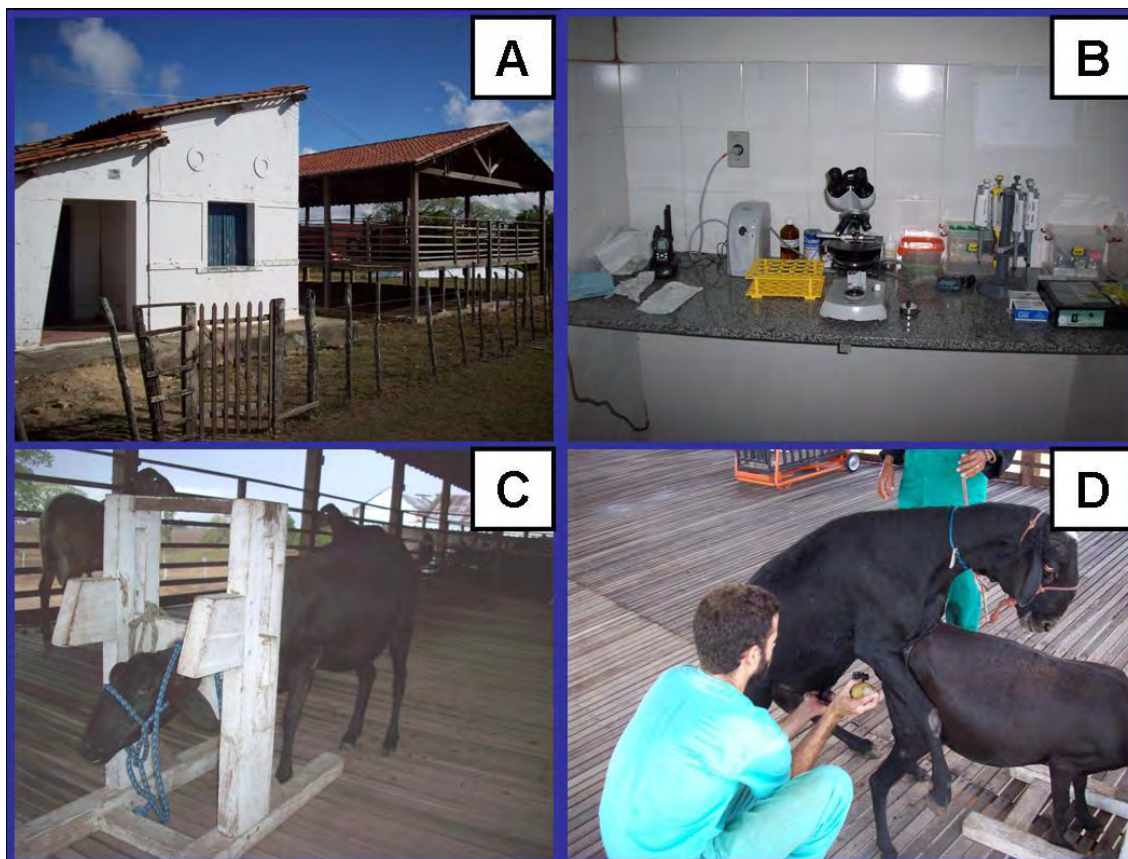


FIGURA 2: Colheita e avaliação do sêmen pré-congelação. A: À esquerda área externa do laboratório de avaliação e manipulação de sêmen da Fazenda Queimadas e à direita o aprisco onde eram realizadas as colheitas de sêmen; B: Área interna do Laboratório de manipulação de sêmem; C: Fêmea contida utilizada como manequim para colheita de sêmen; D: Colheita de sêmen através da vagina artificial.

A mesma amostra de sêmen em formol-salina tamponada usada para cálculo da concentração foi usado para avaliação da morfologia espermática, por isso teve-se o cuidado de manter o tubo com formol salina sobre a placa aquecedora para que fossem evitadas alterações na célula espermática, provocadas por choque-térmico. O estudo da morfologia espermática foi realizado posteriormente através de preparação úmida, colocando-se 10  $\mu$ L da amostra diluída sob lâmina e lamínula e

observando os espermatozoides em microscopia de contraste de fase (aumento de 1.000X), computando e classificando 100 células de acordo com as anormalidades encontradas. Estas foram classificadas conforme descritas por Bloom (1973).

O teste supravital foi empregado para avaliação da integridade da membrana plasmática do sêmen *in natura*. Entretanto, diferente do preconizado na técnica original (BARTH e OKO, 1989), pela praticidade foi utilizado apenas o corante eosina amarela<sup>1</sup>, sem a nigrosina, baseado em relatos de Cedenho e Tokunaga, (1995) que não encontraram diferença ( $P>0,05$ ) para a avaliação realizada com ambas as formulações. Dessa forma, foi feito sobrepondo em lâmina uma gota de sêmen (10 $\mu$ L) com uma gota da eosina (10 $\mu$ L), previamente aquecida (37°C) e elaboração de esfregaço, deixando secar sobre placa aquecedora. Imediatamente após seca, a amostra foi observada em microscopia óptica com aumento de 400x. As células coradas (vermelhas) foram consideradas com membrana plasmática lesada e as sem coloração com membrana íntegra.

Os reprodutores foram submetidos às colheitas de sêmen e aqueles ejaculados com mais de 60% de integridade de membrana plasmática (supravital) e 75% de motilidade espermática eram aproveitados para o experimento. Assim, foi utilizado um ejaculado de cada reprodutor, totalizando 11 amostras de sêmen para este experimento.

#### 2.4. Grupos Experimentais

A solução de Tris-gema de ovo-glicerol (ROBERTS, 1986) foi o diluidor base utilizado neste trabalho. Todos os reagentes químicos que o compuseram (2,42g de Tris, 1,5g de ácido cítrico, 1,25g de glicose e glicerol, para 100mL), bem como os aditivos EDTA e a trealose, utilizados nos grupos experimentais, foram fabricadas pelo laboratório VETEC Ltda<sup>2</sup>, exceto o sulfato de gentamicina<sup>3</sup> (13,4 mg) e o crioprotetor dimetilacetamida<sup>4</sup>.

---

<sup>1</sup> Vetec Ltda (Duque de Caxias-RJ, Brasil)

<sup>2</sup> VETEC Ltda (Duque de Caxias-RJ, Brasil)

<sup>3</sup> Schering-Plough S/A (São Paulo-SP, Brasil)

<sup>4</sup> Sigma Aldrich - D5511 (St Louis, MO, EUA)

Para o desenvolvimento deste experimento foram escolhidos os diluidores que obtiveram os melhores resultados *in vitro* nos experimentos descritos nos capítulos anteriores (Experimento 1 e Experimento 2):

TABELA 1. Composição, pH e osmolaridade dos diferentes diluidores estudados (TRIS+GL6%, TRIS+GLI6%+TRE, TRIS+DMA3%, TRIS+DMA3%+TER).

Grupo	Diluidor base	% GLI	% DMA	TRE (mOsmol)	pH/Osmolaridade (mOsmol/Kg)
TRIS+GLI6%	TRIS	6	-	-	6,14/380
TRIS+GLI6%+TRE	TRIS	6	-	300	6,14/485
TRIS+DMA3%	TRIS	-	3	-	6,21/371
TRIS+DMA3%+TRE	TRIS	-	3	300	6,21/480

▪ Glicerol (GLI), dimetilacetamida (DMA) e trealose (TRE).

## 2.5. Resfriamento e Congelação do Sêmen

Após as avaliações iniciais e cálculo da concentração espermática, um total de  $1200 \times 10^6$  de espermatozoides eram transferidos para tubos pré-aquecidos, sendo posteriormente adicionados a estes 2mL de cada um dos quatro diluidores (descritos na Tabela 1), já com o percentual final dos crioprotetores (diluição em uma etapa), compondo oito doses inseminantes de  $150 \times 10^6$  de espermatozoides com motilidade, para cada grupo experimental. Assim, o ejaculado tinha que ter no mínimo  $4.800 \times 10^6$  de espermatozoides móveis (oito doses inseminantes para cada um dos quatro grupos). Caso o número de espermatozoides do ejaculado fosse insuficiente, foi feita uma segunda colheita para completar o número de doses necessárias para a inseminação e as posteriores avaliações *in vitro*.

Após a diluição nos diferentes meios, o sêmen foi novamente avaliado, envasado em palhetas de 0,25mL e resfriado até 5°C em câmara refrigerada estabilizada com esta temperatura <sup>5</sup>, a uma taxa de resfriamento médio de 0,46°C/min, segundo metodologia descrita por Furst (2005). Após duas horas de resfriamento e tempo equilíbrio à temperatura de 5°C, a congelação foi efetuada

<sup>5</sup> Minitub do Brasil, Rio Grande do Sul, Brasil



mantendo-se as palhetas por 20min a uma altura de 5cm da lâmina de nitrogênio líquido (N<sup>2</sup>) e posteriormente mergulhadas no N<sup>2</sup>.

## 2.6. Avaliação do Sêmen Pós-Descongelção

Dois meses após as congelações, as amostras dos diferentes grupos experimentais foram descongeladas em banho-maria à 38°C por 50 segundos. As amostras descongeladas de cada grupo eram depositado em micro tubos de 1,5mL<sup>6</sup>, previamente aquecidos e mantidos à 37°C, dos quais se retiravam alíquotas para as avaliações *in vitro*. Para a análise subjetiva da motilidade e vigor espermático e teste supravital, procedeu-se como descrito para o sêmen *in natura* (item 2.3).

### 2.6.1. Avaliação Computadorizada da Cinética Espermática

Uma alíquota de 5µL de sêmen, dos diferentes grupos experimentais ( $3 \times 10^6$  espermatozóides), foi diluída em 150µL de meio X-CELL<sup>7</sup> ( $20 \times 10^6$ /mL), previamente aquecido à 37°C, e mantida nesta temperatura por cinco a dez minutos. A seguir 10µL desta mistura eram transferidos para câmaras de makler<sup>8</sup> (Makler Counting Chamber, Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel) e levadas para avaliação da cinética espermática através do analisador de sêmen modelo IVOS 12<sup>9</sup>. Esta análise foi feita com a contagem mínima de quatro campos diferentes e mínimo de 300 células. As características avaliadas foram: as percentagens de espermatozóides com motilidade total (MTH, %), motilidade progressiva (MPH, %) e de espermatozóides rápidos (RAP, %), velocidade progressiva (VSL, µm/s), velocidade curvilínea (VCL, µm/s), velocidade de trajeto (VAP, µm/s), deslocamento lateral de cabeça (ALH, µm), frequência de batimento flagelar (BCF, Hz), linearidade (LIN, %) e retilinearidade (STR, %).

---

<sup>6</sup> Microtubos MCT-150-C, 1,5mL, Axygen Scientific INC

<sup>7</sup> IMV, L'Aigle, França

<sup>8</sup> Makler Counting Chamber, Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel

<sup>9</sup> Hamiton Thorn Biosciences, Beverly, MA, EUA



## 2.6.2. Avaliação das Membranas Plasmática, Acrossomal e Potencial da Membrana Mitocondrial

Para a avaliação da integridade das membranas espermáticas foi empregada a associação das sondas fluorescentes iodeto de proprídio - IP<sup>10</sup> (IMP, integridade de membrana plasmática), iodeto de 5,5',6,6'tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina - JC-1<sup>11</sup> (PMM, potencial de membrana mitocondrial) e aglutinina de *Pisum sativum* conjugada à fluoresceína de isotiocianato - FITC-PSA<sup>12</sup> (IAC, integridade da membrana acrossomal). Para esta avaliação 5µL de sêmen ( $3 \times 10^6$  espermatozóides) foram diluídos em 150µL de meio X-CELL, ao qual foram adicionadas as soluções de trabalho das sondas fluorescentes (Anexos de IV a VI) nas seguintes proporções: 2µL de IP e 2µL de JC-1. A mistura foi homogeneizada, mantida protegida da luz e incubada a 37°C por 20-30 minutos. Após esse período, foram adicionados 25µL da solução de trabalho de FITC-PSA, procedendo-se novamente a homogeneização e logo em seguida uma alíquota dessa mistura de 10µL foi colocada entre lâmina e lamínula e 100 espermatozóides foram avaliados sob imersão, aumento de 1000x, em microscopia de epifluorescência<sup>13</sup>, usando filtro I3 (excitação BP 450-490 e supressão LP515). A classificação das células foi feita como descrita por Celeghini (2005), com algumas alterações, em relação ao procedimento de leitura e classificação do potencial da membrana mitocondrial: A ausência ou presença de fluorescência verde fosca e consequentemente a presença ou ausência de fluorescência vermelha na cabeça indicava respectivamente a lesão ou não da membrana plasmática. A presença ou ausência de fluorescência verde intenso no acrossomo indicava respectivamente lesão ou não da membrana acrossomal. Peças intermediárias com coloração vermelha ou vermelho-amarelada em algumas regiões difusas ou em toda a cauda e coloração verde indicavam respectivamente, alto e baixo potencial da membrana mitocondrial.

---

<sup>10</sup> Sigma, P4170 (St Louis, MO, EUA)

<sup>11</sup> Molecular Probes, T3168

<sup>12</sup> Sigma, L0770 (St Louis, MO, EUA)

<sup>13</sup> Leica DMLB – Leica Microsystems, Litz, Alemanha

**SBP 1** - membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial; **SBP 2** - membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial; **SBP 3** - membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado e baixo potencial de membrana mitocondrial; **SBP 4** - membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado e baixo potencial de membrana mitocondrial; **SBP 5** - membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial; **SBP 6** - membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial; **SBP 7** - membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e alto potencial de membrana mitocondrial; **SBP 8** - membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e baixo potencial de membrana mitocondrial.

### 2.6.3. Avaliação da integridade do DNA pelo teste do “COMETA”

Para esta avaliação alíquotas contendo  $3 \times 10^6$  espermatozóides descongelados de cada um dos quatro protocolos experimentais era colocados em 150  $\mu$ L de PBS livre de Cálcio e Magnésio<sup>14</sup>. Desta diluição, uma alíquota de 5 $\mu$ L ( $1 \times 10^5$  espermatozóides) foi transferida e homogeneizada delicadamente em 120 $\mu$ L de agarose 0,5% de baixo ponto de fusão<sup>15</sup> a 37°C, sendo esta solução dispensada em uma lâmina com agarose 1,5% de ponto de fusão normal<sup>16</sup>, cobrindo-a com uma lamínula 24x60mm<sup>17</sup>. Cada lâmina foi acondicionada por cinco minutos a +4°C, retirando-se, a seguir, a lamínula, cuidadosamente, e mergulhou-se a lâmina em solução de lise gelada (+4°C, 2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, pH10 com 1% Triton X-100, 10mM de DL-Dithiothreitol<sup>18</sup>), recém preparada. As lâminas permaneceram submersas nesta solução por 1,5 horas. Posteriormente, as lâminas foram lavadas por cinco minutos com PBS livre de Cálcio e Magnésio passando por um período de descanso em tampão alcalino à 5°C (1mM EDTA e 300mM NaOH, pH  $\pm$ 13) por 20 minutos para a ampliação e expressão dos sítios álcalis labelis. Após este período, submeteu-se as lâminas à eletroforese por 15 minutos de corrida a 17V em 300mA. Para avaliação da corrida eletroforética foram realizados controles

<sup>14</sup> Invitrogen Corporation- 21600-010 (New York, NY, USA)

<sup>15</sup> Sigma - A9414 (St Louis, MO, EUA)

<sup>16</sup> Sigma - A9539 (St Louis, MO, EUA)

<sup>17</sup> Perfecta Ind. e Com. de lâminas de vidro (São Paulo, SP, Brasil).

<sup>18</sup> Sigma - D9163 (St Louis, MO, EUA)

positivos para cada cuba, onde as amostras foram submetidas a lesão de DNA com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a  $200\mu M$  por 5 minutos em gelo. Todas as lâminas foram mergulhadas em uma solução de neutralização ( $0,4M$  Tris, pH 7,5) por 15 minutos e fixadas em etanol absoluto. Estas etapas foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Medicina Veterinária e Zootecnia da FMVZ-UNESP-Botucatu.

As lâminas foram armazenadas em temperatura ambiente até a leitura em objetiva de 400X em microscópio de fluorescência Axioplan II<sup>19</sup> (Figura 3) com  $80\mu L$  de corante Syber Gold<sup>20</sup> (diluído na proporção de 10.000X em água destilada), coberta com lamínula  $24 \times 60mm$  e a leitura realizada em analisador de imagens Comet Assay II<sup>21</sup>, no Laboratório de Toxicogenômica e Epidemiologia Molecular da Faculdade de Medicina - UNESP-Botucatu.



FIGURA 3: Microscópio de fluorescência Axioplan II

Para cada momento as amostras foram avaliadas em duplicata e contadas 50 células, utilizando os parâmetros de *tail intensity* (intensidade do DNA contido na

<sup>19</sup> Zeiss (Wolfville, N.S., Canadá)

<sup>20</sup> Invitrogen Corporation - S11494 (New York, NY, USA)

<sup>21</sup> Perceptive Instruments (Haverhill, Inglaterra)

cauda do cometa) e *tail moment* (produto da porcentagem de DNA presente na cauda e o comprimento da mesma a partir do centro de gravidade da cabeça do cometa).

#### 2.6.4. Animais Experimentais – Fêmeas

Para este estudo foram utilizadas cento e setenta fêmeas ovinas (Figura 4 A), nulíparas e pluríparas, da raça Santa Inês Puras de Origem (PO), com registro na Associação Brasileira de Criadores de Ovinos (ARCO). Estes animais faziam parte do rebanho residente da EMBRAPA – Tabuleiros Costeiros-SE. As fêmeas foram selecionadas um mês antes do início do protocolo de sincronização, mediante exame ultra-sonográfico para avaliação do *status* uterino e presença de possível prenhez. Foram utilizadas apenas ovelhas não prenhes e, aquelas com escore corporal abaixo de três (escore de 0-5), passaram a receber suplementação concentrada até o início do protocolo de sincronização de cio.



FIGURA 4: A: Ovelhas da raça Santa Inês utilizadas no experimento, nos currais de manejo da EMBRAPA Tabuleiros Costeiros-SE; B: Observação da receptividade das fêmeas à monta dos rufiões com criptorquidia bilateral.

Foram formados quatro grupos de fêmeas, a serem inseminadas com sêmen congelado nos quatro diluidores experimentais, tendo-se o cuidado de distribuir nos lotes, números homogêneos das fêmeas nulíparas.

- **Grupo 1:** n=44 fêmeas inseminadas com sêmen congelado com o diluidor TRIS+GLI 6%
- **Grupo 2:** n=42 fêmeas inseminadas com sêmen congelado com o diluidor TRIS+ GLI 6%+TRE;
- **Grupo 3:** n=42 fêmeas inseminadas com sêmen congelado com o diluidor TRIS+DMA 3%;
- **Grupo 4:** n=42 fêmeas inseminadas com sêmen congelado com o diluidor TRIS+DMA 3%+TRE.

#### 2.6.5. Sincronização do estro e da ovulação e Inseminação artificial

As ovelhas foram submetidas à sincronização do estro e da ovulação conforme protocolo de longa duração descrito por Takada et al (2004) (Figura 5), utilizando esponjas intravaginais contendo 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP)<sup>22</sup>, mantidas por 12 dias e na retirada do dispositivo, aplicação de 400 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG)<sup>23</sup>. Aplicou-se 0,5 mL de antibiótico tetraciclina<sup>24</sup> em cada esponja, a fim de se evitar possíveis infecções locais. No momento da inserção da esponja, a vulva foi higienizada e introduziu-se o dispositivo intravaginal com aplicador apropriado, devidamente limpo com anti-sépticos.

---

<sup>22</sup> Progespon® - Schering-Plough S/A (São Paulo-SP, Brasil)

<sup>23</sup> Novormon - Schering-Plough S/A (São Paulo-SP, Brasil)

<sup>24</sup> Tormicina LA - Tortuga, (São Paulo-SP, Brasil )

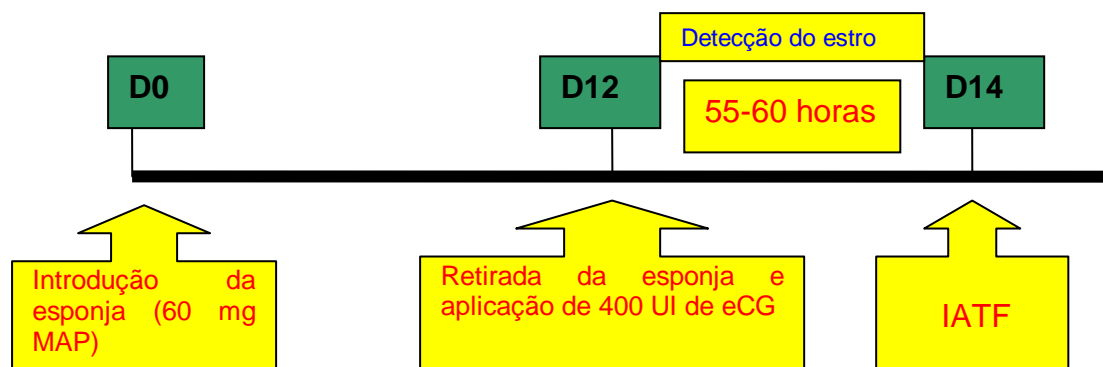


FIGURA 5: Representação esquemática do protocolo de sincronização do estro e ovulação, utilizado no Experimento.

A observação de estro foi realizada visualmente por técnicos treinados, com a utilização de machos estéreis com criptorquidia bilateral, na proporção de 5% em relação às fêmeas (Figura 4 B). Estes foram colocados em contato com as fêmeas por 10 minutos logo após a retirada dos dispositivos das fêmeas e, posteriormente, com intervalos de 12h, verificando-se por trinta minutos a presença de receptividade das fêmeas à monta, até o momento das inseminações.

A inseminação artificial foi realizada em tempo fixo (IATF), em todas as fêmeas, 55 a 60 horas (57,5h) após a retirada da esponja contendo progestágeno. Antes da inseminação artificial, os animais passaram por um jejum sólido e hídrico de 18 horas. A técnica da IATF empregada neste estudo seguiu protocolo descrito por Almeida (2007), como a seguir: Realizou-se a tranquilização com cloridrato de xilazina a 2%<sup>25</sup>, 0,2 mg de xilazina por Kg de peso corpóreo, pela via intramuscular. No campo cirúrgico, área cranial ao úbere, foi feita a tricotomia e procedeu-se a lavagem e anti-sepsia da região antes da IATF. Procedeu-se anestesia local com infiltração de 2mL de cloridrato de lidocaína a 2%<sup>26</sup> em cada um dos pontos de incisão. Os animais foram contidos em uma maca na posição clássica para inseminação laparoscópica (IAL) (Figura 6 E), com uma inclinação de 30°, ficando em decúbito dorsal com a cabeça inclinada para baixo. O trocáter de cinco mm foi inserido, 10 a 15 centímetros (cm) cranial ao úbere, para introdução do laparoscópio (ótica de 5 mm) e visualização do sistema genital e um outro trocáter de cinco mm foi introduzido 10 a 20 cm ao lado, para permitir a passagem da pipeta apropriada

<sup>25</sup> Anasedan, Vetbrands (Jacareí, SP, Brasil)

<sup>26</sup> Bravet (Rio de Janeiro, RJ, Brasil)



para IAL. O abdome foi inflado com o auxílio de uma bomba de ar, para melhor visualização do sistema genital. Após a visualização dos cornos uterinos, e introdução da pipeta por meio do trocáter, o inseminador introduziu-a em um dos cornos uterinos e aplicou metade da dose inseminante e, logo após introduziu a pipeta no outro corno, onde aplicou a outra metade da dose inseminante. As etapas da IAL encontram-se na Figura 6.

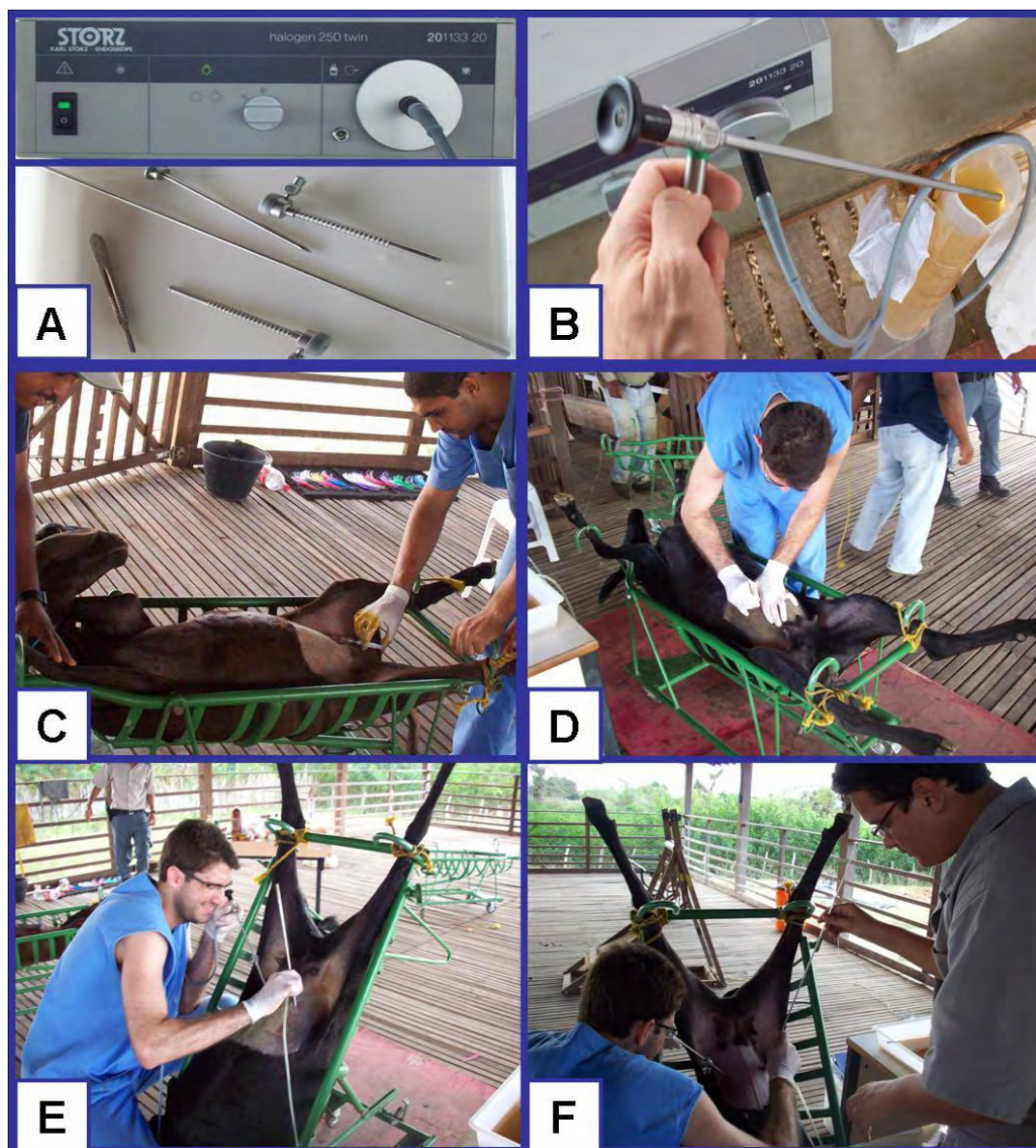


FIGURA 6: Equipamentos e etapas da Inseminação Artificial por Laparoscopia. A: Acima fonte de luz e abaixo trocateres, estilete e bastão de manipulação; B: Laparoscópio de 5mm mantido imerso em solução anti-séptica entre as inseminações; C: Anestesia local; D: Incisões para inserção dos trocateres; E: Pesquisa pelos cornos uterinos; F: Introdução do aplicador seminal e administração da dose inseminante bilateral.

A pele e camada muscular do abdome não foram suturadas devido à pequena incisão feita. Realizou-se a anti-sepsia da ferida cirúrgica com solução de iodo a 1%, com repelente e cicatrizante tópico<sup>27</sup>. Administrou-se 1,0 mL de antibiótico a base de tetraciclina<sup>28</sup> para cada 10 Kg de peso, em cada ovelha, após o procedimento.

O diagnóstico de gestação foi realizado por meio de exames ultra-sonográficos transretais, utilizando-se um aparelho de ultra-sonografia (Scanner 100, Pie Medical, Nutricell) com um transdutor de 5 MHz, 45 dias após a inseminação artificial.

## 2.7. Delineamento e Análise Estatística

Para etapa de criopreservação de sêmen utilizou-se o delineamento estatístico inteiramente casualizado (REIS, 2003), no qual os ejaculados foram considerados repetições (n=11) e os protocolos de processamento do sêmen (TRIS+GL3%; TRIS+GL6%; TRIS+GL3%+TRE; TRIS+DMA3%; TRIS+DMA6%+TRE) mais o sêmen *In natura* foram considerados os tratamentos (n=5).

Para a análise estatística das características avaliadas, foi empregado o programa estatístico Statistical Analysis System (SAS) – versão 5.0 (1996). Para tanto realizou-se a seguinte seqüência de análises:

1- A consistência dos dados e a análise descritiva (médias e desvio-padrão) das características de interesse ao estudo foram realizadas mediante o emprego do Procedimento MEANS (PROC MEANS).

2- O efeito dos tratamentos e dos carneiros sobre os parâmetros de interesse ao estudo (motilidade espermática total e progressiva subjetivas, vigor espermático, além dos parâmetros de cinética espermática e integridade das membranas espermáticas, obtidas, respectivamente, pela análise computadorizada e pela microscopia de fluorescência) foi avaliado através da análise de variância (ANOVA), utilizando-se para tanto o Procedimento “General Linear Model” (PROC GLM). Para a comparação das médias empregou-se o teste de Student - Newman - Keuls (SNK), com nível de probabilidade de cinco por cento.

3- A relação entre os parâmetros espermáticos estudados foi avaliada pelo teste de correlação linear de *Pearson*, com nível de significância de cinco por cento.

---

<sup>27</sup> Lepecid - Dow agrosiences industrial LTDA (Brasil, Franco da Rocha-SP)

<sup>28</sup> Tormicina LA – Tortuga (Brasil, São Paulo-SP)



4- Para comparação das taxas de prenhez entre as fêmeas submetidas aos diferentes protocolos de sincronização foi utilizado o teste de dispersão de freqüências qui-quadrado.

5- A avaliação da ocorrência do efeito dos diferentes reprodutores utilizados (n=11) e inseminadores (n=3) sobre a taxa de fertilidade das fêmeas inseminadas também foi realizada através do teste qui-quadrado.

### 3. RESULTADOS

Os resultados obtidos com a avaliação do sêmen *in natura* e pós-descongelamento nos diferentes diluidores experimentais estão representados nas Tabelas 2 a 10.

O resumo da análise de variância, com os valores de F e seus respectivos níveis de significância, referentes aos efeitos dos reprodutores e dos diferentes tratamentos experimentais sobre os parâmetros de cinética espermática subjetiva e computadorizada, viabilidade espermática avaliada pelo teste supravital e viabilidade das membranas espermáticas analisadas pela microscopia de fluorescência está representado no Anexo III.

Através da ANOVA, foi verificado efeito do carneiro para a maioria dos parâmetros estudados exceto VIG, VCL, STR e BCF, demonstrando a heterogeneidade do grupo de doadores de sêmen utilizados no estudo, escolhidos aleatoriamente, representando condições individuais de congelabilidade diferenciadas, fator importante para representatividade deste estudo. De forma semelhante, foi observado efeito significativo dos tratamentos sobre quase todos os parâmetros de cinética espermática (exceto VCL, BCF e STR) e os referentes à integridade das membranas espermáticas.

#### 3.1. Avaliação Subjetiva da Cinética Espermática

A análise de variância (ANOVA) demonstrou que as características subjetivas da cinética espermática avaliadas neste estudo, motilidade total (MTS), progressiva (MPS) e vigor espermático (VIG), sofreram efeito significativo do tratamento (Anexo III).

A ANOVA também demonstrou que o processo de congelamento dos espermatozoides foi deletério e influenciou significativamente ( $P < 0,05$ ) na redução dos índices MTS, MPS e VIG. Em relação a MTS e VIG, pode-se observar na Tabela 2 que o sêmen *in natura* foi superior ao congelado em todos os protocolos experimentais. A semelhança do VIG entre sêmen *in natura* e o congelado em alguns dos protocolos experimentais pode ser justificado pelo método de avaliação do sêmen *in natura*, que foi diluído no meio diluidor controle (TRIS+GLI6%), que tem

o crioprotetor na sua composição e promove uma redução do vigor espermático nos momentos iniciais, até que ocorra o equilíbrio osmótico entre meio externo e interno da célula.

TABELA 2. Médias e desvios-padrão dos parâmetros subjetivos da cinética espermática no sêmen *in natura* e pós-descongelamento, nos diferentes diluidores estudados (TRIS+GL6%, TRIS+GL6%+TRE, TRIS+DMA3%, TRIS+DMA3%+TRE).

Parâmetro	TRATAMENTO				
	<i>In natura</i>	TRIS+ GLI6%	TRIS+GLI+6%+TRE	TRIS+DMA3%	TRIS+DMA3%+TRE
<b>MTS (%)</b>	82,2 ± 02,6 a	64,0 ± 11,3 b	56,3 ± 18,5 b	35,0 ± 12,0 c	43,8 ± 15,3 c
<b>MPS (%)</b>	73,6 ± 05,5 a	48,1 ± 13,8 b	44,5 ± 18,7 b	23,6 ± 12,2 c	32,2 ± 15,8 c
<b>VIG</b>	04,0 ± 00,0 a	04,0 ± 00,0 a	03,5 ± 00,1 b	03,5 ± 00,4 b	03,2 ± 00,3 c

▪ Motilidade total (MTS), motilidade progressiva (MPS) e vigor espermático (VIG).  
Valores seguidos de letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ).

A redução ( $P < 0,05$ ) dos índices de MTS após o processo de congelação-descongelamento do sêmen ovino corrobora com diversos estudos anteriores como o de Rodello (2006) (de 86,3% para 50,3%), Azevedo (2006) (86,6 para 57,7%) e Valente et al. (2009) (de 67% e 68% para 46% e 36%, respectivamente, de acordo com o diluidor utilizado). Verifica-se valor de MTS bem próximo do sêmen *in natura* deste estudo (82,2%), em relação aos dois primeiros trabalhos e superior comparado ao estudo de Valente et al. (2009). E média de MTS pós-descongelamento observada neste estudo, tanto para o grupo controle (TRIS+GLI6%; MTS= 64,09%) quanto para média geral dos tratamentos (56,18%), foram semelhantes às relatadas por Rodelo (2006) e Azevedo (2006) e superior ao verificado por Valente et al. (2009).

Entre os diluidores testados, os diluidores com GLI obtiveram os melhores ( $P < 0,05$ ) percentuais de MTS (64,0% e 56,3%) e MPS (48,1% e 44,5) em relação aos com DMA (35,0 e 23,6% *versus* 43,2 e 32,2%). O VIG não diferiu entre os espermatozoides congelados com DMA e GLI associados a TRE (3,54 *versus* 3,59), tendo o diluidor hiperosmótico com DMA os valores mais baixos ( $P < 0,05$ ) e o meio isosmótico de GLI os maiores ( $P < 0,05$ ).

A TRE não promoveu nenhum efeito benéfico sobre as motilidades espermáticas subjetivas e teve influência negativa sobre o VIG (Tabela 2).

### 3.2. Avaliação Computadorizada da Cinética Espermática

Na Tabela 3 encontram-se as médias dos parâmetros da cinética espermática pós-descongelamento, obtidas pela análise computadorizada e a comparação dessas entre os diferentes diluidores experimentais.

TABELA 3. Médias e desvios-padrão dos parâmetros de cinética espermática pós-descongelamento, obtidos através da análise computadorizada, nos diferentes diluidores estudados (TRIS+GL6%, TRIS+GL6%+TRE, TRIS+DMA3%, TRIS+DMA3%+TRE).

Parâmetro	TRATAMENTO			
	TRIS+ GLI6%	TRIS+GLI+6%+TRE	TRIS+DMA3%	TRIS+DMA3%+TRE
<b>MTH (%)</b>	61,7 ± 12,1 a	55,2 ± 19,7 a	31,9 ± 12,8 b	41,0 ± 17,0 b
<b>MPH (%)</b>	44,1 ± 12,9 a	41,0 ± 15,5 ab	21,8 ± 11,2 c	29,2 ± 15,6 bc
<b>VAP (µm/s)</b>	126,7 ± 23,0	116,5 ± 14,4	122,2 ± 19,5	105,8 ± 18,2
<b>VSL (µm/s)</b>	119,3 ± 15,8a	107,0 ± 13,2ab	110,0 ± 19,2ab	97,2 ± 17,3 b
<b>VCL (µm/s)</b>	188,4 ± 17,0a	155,8 ± 16,9b	165,1 ± 53,5ab	145,4 ± 21,9b
<b>ALH (µm)</b>	06,0 ± 00,7 a	04,5 ± 00,6 b	05,6 ± 00,7 a	04,6 ± 00,9 b
<b>BCF (Hz)</b>	42,2 ± 02,3	43,8 ± 03,2	41,5 ± 02,8	43,2 ± 03,3
<b>STR (%)</b>	87,0 ± 03,9	89,2 ± 02,7	85,7 ± 04,1	88,3 ± 03,0
<b>LIN (%)</b>	62,8 ± 06,6 ab	68,0 ± 04,8 a	60,0 ± 05,8 b	65,5 ± 05,0 ab
<b>RAP (%)</b>	50,7 ± 14,3 a	45,3 ± 17,7 a	24,7 ± 12,7 b	31,5 ± 17,0 b

▪ Motilidade total (MTH), motilidade progressiva (MPH), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), velocidade de trajeto (VAP), deslocamento lateral de cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar (BCF), retilinearidade (STR), linearidade (LIN) e espermatozoides rápidos (RAP).

Valores seguidos de letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ).

Quase todos os parâmetros da cinética espermática da avaliação computadorizada (exceto VAP, BCF e STR) sofreram efeito significativo do tratamento, tendo a MTH reduzida de forma considerável nos diluidores com o crioprotetor DMA, independente da presença ou não da TRE no meio. E ao compararmos apenas os meios isosmóticos (TRIS+6%GLI e TRIS+DMA3%), nota-se que os menores ( $P<0,05$ ) percentuais de MPH foram obtidos com a utilização da DMA.

A adição da TRE ao meio com GLI afetou negativamente ( $P<0,05$ ) os parâmetros VCL e ALH. E a redução ( $P<0,05$ ) deste último parâmetro também foi observada no meio hiperosmótico com DMA, em relação ao diluidor sem TRE (Tabela 3). Entretanto, foi verificado um aumento numérico ( $P>0,05$ ) no índice de LIN no meio TRIS+GLI6%+TRE, em relação ao meio similar sem TRE, que o fez diferir ( $P<0,05$ ) para esta variável, quando comparado ao grupo TRIS+DMA3%.

### 3.3. Avaliação da Viabilidade Espermática – Teste Supravital

O efeito significativo do tratamento (ANOVA) também foi observado para a viabilidade espermática pelo teste supravital (SV).

Assim como observado para avaliações subjetivas da cinética espermática, o processo de congelação-descongelação dos espermatozóides afetou negativamente os índices de viabilidade celular no teste supravital (SV), que foram significativamente inferiores para o sêmen congelado nos diferentes diluidores experimentais em relação ao sêmen *in natura* (Tabela 4).

TABELA 4. Médias e desvios-padrão dos índices de viabilidade espermática, avaliados pelo teste supravital (SV) no sêmen *in natura* e pós-descongelação, nos diferentes diluidores estudados (TRIS+GLI6%, TRIS+GLI6%+TRE, TRIS+DMA3%, TRIS+DMA3%+TRE).

Parâmetro	TRATAMENTO				
	<i>In natura</i>	TRIS+GLI6%	TRIS+GLI6%+TRE	TRIS+DMA3%	TRIS+DMA3%+TRE
EOS	78,6 ± 03,9 a	57,5 ± 10,7 b	44,1 ± 17,3 c	45,0 ± 10,3 c	47,1 ± 11,0 c

Valores seguidos de letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste SNK ( $P<0,05$ ).

As taxas de SV foram influenciadas ( $P < 0,05$ ) pela composição do diluidor utilizado, tendo o meio TRIS+GLI6% proporcionado os melhores índices de SV, em relação aos demais meios testados, evidenciando o efeito deletério sobre a membrana plasmática, quando a TRE foi adicionada a este diluidor (Tabela 4).

O percentual de SV não variou ( $P > 0,05$ ) entre os espermatozóides congelados com o meio hiperosmótico de GLI (44,1%) e os meios com DMA (45,0 E 47,1%).

### 3.4. Avaliação da Integridade das Membranas Plasmática e Acrossomal e do Potencial da Membrana Mitocondrial

Para esta avaliação, os resultados obtidos com a associação das sondas fluorescentes FITC-PSA, IP e JC-1 foram individualizados em três categorias distintas: integridade de membrana plasmática (IMP), composta pelo percentual de espermatozóides com membrana plasmática íntegra (soma das subpopulações espermáticas SBP 1, SBP 2, SBP3 e SBP4); integridade acrossomal (IAC) representando o percentual de espermatozóides com membrana acrossomal íntegra (soma das subpopulações SBP 1, SBP 2, SBP5 e SBP6) e potencial de membrana mitocondrial (PMM) que representou o percentual de espermatozóides com alto potencial de membrana mitocondrial (soma das subpopulações SBP 1, SBP 3, SBP5 e SBP7).

Os valores médios obtidos para IMP, IAC e PMI dentro dos grupos se comportaram de forma estável (respectivamente, CV = 47,4, 14,4 e 23,3%) e refletiram no efeito significativo ( $P < 0,05$ ) dos tratamentos sobre essas variáveis (Anexo III).

Os percentuais médios obtidos para IMP, IAC e PMM dos diferentes grupos estudados podem ser visualizados na Tabela 5.

Em relação aos índices de IMP, apenas foi observada diferença significativa entre os meios isosmóticos (TRIS+GLI6%, 27,5% *versus* TRIS+DMA3%, 13,9%) que foram semelhantes ( $P > 0,05$ ), para esta variável, em relação aos demais grupos experimentais. A inferioridade da DMA para a manutenção da integridade da membrana plasmática observada com a microscopia de fluorescência confirma os

resultados de SV, que foi superior para o diluidor com GLI comparado a DMA com ou sem TRE (Tabela 4).

Discreto efeito positivo da adição da TRE ao meio de congelação pode ser observado ao verificarmos que na sua presença o diluidor com DMA (TRIS+DMA3%+TRE) obteve um aumento numérico na taxa de IMP, tornando esse índice semelhante ao obtido com o grupo controle (TRIS+GLI6%).

TABELA 5. Médias e desvios-padrão das frequências de espermatozoides com membrana plasmática (IMP) e acrossomal íntegras (IAC) e com alto potencial da membrana mitocondrial (PMM), obtidas através da combinação das sondas fluorescentes iodeto de proprídio, aglutinina de *Pisum sativum* conjugada à fluoresceína de isotiocianato - FITC-PSA e iodeto de 5,5',6,6'tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina - JC-1, nos diferentes diluidores estudados (TRIS+GLI6%, TRIS+GLI6%+TRE, TRIS+DMA3%, TRIS+DMA3%+TRE).

Parâmetro	TRATAMENTO			
	TRIS+ GLI6%	TRIS+GLI+6%+TRE	TRIS+DMA3%	TRIS+DMA3%+TRE
IMP (%)	27,5 ± 12,5 a	22,7 ± 14,7 ab	13,9 ± 11,2 b	19,9 ± 11,8 ab
IAC (%)	72,2 ± 13,1 a	70,6 ± 12,7 a	59,8 ± 15,2 b	65, ± 14,2 ab
PMM (%)	85,0 ± 06,6 a	59,7 ± 20,7 b	46,0 ± 21,9 c	64,3 ± 19,3 b

Valores seguidos de letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ).

A integridade da membrana acrossomal (IAC) foi fortemente influenciada pelo tipo de diluidor utilizado (Tabela 5).

Os índices de integridade da membrana acrossomal (IAC) variaram consideravelmente entre os diluidores estudados (de 59,8 a 72,2%) e essas diferenças entre os tratamentos foram verificadas pela ANOVA (Anexo III). O percentual médio de IAC obtido neste experimento (67,0%) foi inferior ao observado por Sousa (2007) (73,3%) e superior aos encontrados por Maia (2006) e Azevedo (2006) de 59,9% 51,5%, respectivamente. Todos esses estudos foram com ovinos e utilizaram a associação FITC-PSA para avaliação da IAC.

As taxas inferiores para IAC foram verificadas com o diluidor isosmótico TRIS+DMA3% que foi semelhante ( $P > 0,05$ ) ao obtido com o diluidor similar com TRE (59,8% versus 65,9%) e inferior ( $P < 0,05$ ) em relação ao TRIS+GLI6% (72,2%) e ao TRIS+GLI6%+TRE (72,2%). Este resultado, somado ao fato de que a adição da

TRE proporcionou que o grupo TRIS+DMA3%+TRE obtivesse índices semelhantes ( $P>0,05$ ) de IAC, quando comparado ao diluidores com GLI, faz sugerir a hipótese da atividade benéfica da TRE sobre essa característica.

O percentual médio de PMM obtido neste trabalho foi de 63,8%, índice superior aos verificados por Martinez-Pastor et al. (2004) – 23,3%; Maia (2006) – 1,6%; e Sousa (2007); Azevedo (2007) – 19,5%, todos trabalhando com ovinos e ao obtidos por Gonzalez (2004) – 18,03%, Bollwein et al. (2008) – 23,8% e Celeghini (2004) – 1 a 5%, com bovinos; Nascimento (2006) – 44,6%, com equinos e Connell et al. (2002) – 39,8% com humanos.

No entanto, a superioridade verificada no presente trabalho, para esta variável, é justificada pela diferença na técnica de preparação e leitura utilizada, que proporcionou que um maior número de espermatozóides fosse classificado nas subpopulações celulares apresentando PMM.

Neste experimento foi feita uma alteração no protocolo avaliação, com o aumento do tempo de incubação à temperatura de 37°C, previamente a leitura. Também se alterou o procedimento de leitura e classificação do potencial da membrana mitocondrial. Na avaliação da PMM foram identificados padrões de fluorescência, com níveis diferentes de coloração e intensidade, em regiões distintas da peça intermediária do mesmo espermatozóide. Assim, diferente do protocolo convencional de leitura, que considera com alto potencial mitocondrial (PMM) apenas as células apresentando coloração vermelha ou vermelho-amarelada predominante em toda a cauda, neste trabalho também foi considerada como tendo PMM os espermatozóides com coloração vermelha ou vermelha-amarelada em pontos difusos da região mitocondrial.

Foi verificado efeito significativo do tratamento pela ANOVA, sobre o parâmetro PMM (Anexo III), e as diferenças entre os grupos experimentais podem ser observados na Tabela 5.

O percentual de espermatozóides com PMM foi superior ( $P<0,05$ ) para o grupo TRIS+GLI6% em relação a todos os demais e os índices inferiores ( $P<0,05$ ) foram obtidos com o meio isosmótico com DMA. A adição da TRE propiciou resultados distintos de acordo com o crioprotetor utilizado. A taxa de PMM foi favorecida ( $P<0,05$ ) com a adição da TRE ao meio com DMA (46,0 *versus* 64,3). Entretanto, foi observado o inverso no grupo com glicerol, cuja taxa de PMM foi reduzida ( $P<0,05$ ) com a associação da TRE ao meio de congelação (85,0% *versus* 59,7%). Os



diluidores hiperosmóticos de DMA e GLI proporcionaram índices semelhantes ( $P>0,05$ ) de PMM

### 3.5. Avaliação da Integridade do DNA espermático através do teste do “COMETA”

Através da ANOVA pode-se verificar o efeito do tratamento para o parâmetro TINT. O TMOM apresentou elevada instabilidade dentro dos grupos e o efeito do tratamento não foi evidenciada (Anexo III). Também pode-se verificar a influência do carneiro sobre ambas as variáveis (Anexo III). Os percentuais médios obtidos para estas variáveis do teste do cometa estão apresentados na Tabela 6.

TABELA 6. Médias e desvios-padrão do dano de DNA, mensurados através do *tail intensity* (TINT, %) e *tail moment* (TMOM, %), dos espermatozóides ovinos criopreservados nos diferentes diluidores estudados (TRIS+GL6%, TRIS+GL6%+TRE, TRIS+DMA3%, TRIS+DMA3%+TRE) e nos controles positivo (CPOS) e negativo (CNEG).

Parâmetro	TRATAMENTO					
	CPOS	CNEG	TRIS+GLI6%	TRIS+GLI6%+TRE	TRIS+DMA%	TRIS+DMA3%+TRE
<b>TINT (%)</b>	28,6 a ± 11,6	19,0 b ± 05,0	14,9 b ± 07,5	15,8 b ± 08,3	14,7 b ± 06,6	16,6 b ± 11,5
<b>TMOM (%)</b>	06,0 a ± 03,2	03,1 a ± 1,5	03,9 a ± 03,0	03,8 a ± 04,5	02,9 a ± 02,3	04,4 a ± 04,5

Valores seguidos de letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste SNK ( $P<0,05$ ).

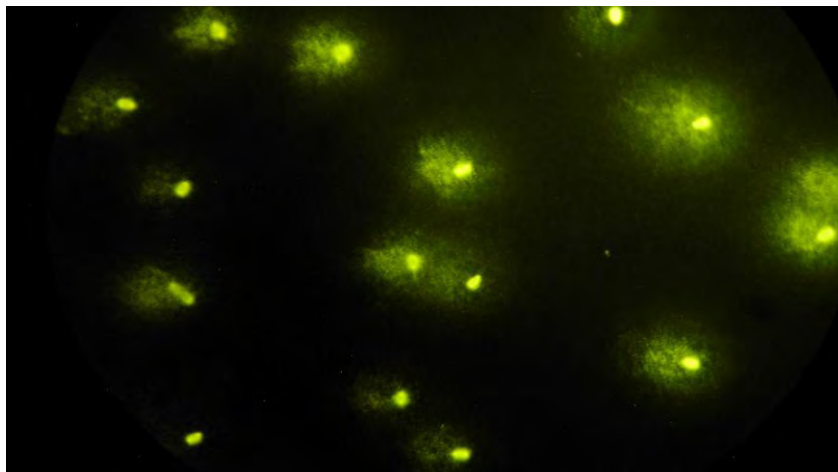
O índice de TINT obtido para o grupo CPOS (controle positivo - sêmen fresco com indução de lesão de DNA) superou ( $P<0,05$ ) o verificado para o grupo CNEG (controle negativo - sêmen *in natura* sem indução da lesão de DNA), como também foi mais alto que os verificados nos diferentes grupos do experimento (Tabela 6).

Apesar dos valores de TMOM terem sido quase o dobro no CPOS em relação ao CNEG e os demais tratamentos, os seus valores não diferiram estatisticamente. Este fato pode ser justificado pela levada instabilidade verificada pelos seus valores dentro dos grupos ( $CV=109,2$ ).

As taxas de TINT não variaram ( $P>0,05$ ) entre os diferentes diluidores estudados. O mesmo foi observado para o parâmetro TMOM (Tabela 6). E para

ambos os parâmetros, não foi verificada diferença ( $P>0,05$ ) entre os índices obtidos no sêmen *in natura* e após a congelação nos diferentes diluidores experimentais.

Conforme a análise das lâminas, foram observados diferentes níveis de lesão de DNA espermático, como podem ser visualizados na Figura 7.



**Figura 7:** Teste do cometa em espermatozóides de ovinos, apresentando maiores e menores graus de lesão de DNA, em microscopia de fluorescência com aumento de 400x e uso do corante Syber Gold.

### 3.6. Fertilidade das Fêmeas Inseminadas nos Diferentes Diluidores Experimentais.

Na Tabela 7 encontram-se as taxas de prenhez (TP) das ovelhas, obtidas após a inseminação artificial em tempo fixo, com o sêmen congelado nos diferentes protocolos experimentais.

TABELA 7. Comparação da taxa de prenhez (TP) e percentual de cio presente (CIO), nas fêmeas inseminadas com sêmen congelado nos diferentes diluidores experimentais (TRIS+GL6%, TRIS+GL6%+TRE, TRIS+DMA3%, TRIS+DMA3%+TRE).

Parâmetro	TRATAMENTO			
	TRIS+ GLI6%	TRIS+GLI+6%+TRE	TRIS+DMA3%	TRIS+DMA3%+TRE
TP * (%)	27,27	26,19	35,71	19,05
CIO (%)	59,09	54,76	61,90	47,62

\* Após ultrassonografia realizada 45 dias após a inseminação.

Através do estudo de dispersão de frequências (qui-quadrado) pode-se verificar que os índices de prenhez (TP) das fêmeas foi semelhante independente do diluidor de congelação utilizado. Entretanto, foi observada uma tendência ( $P=0,08$ ) a superioridade para a TP do grupo TRIS+DMA3% em relação ao diluidor TRIS+DMA3%+TRE.

Pelo teste do qui-quadrado foi observado efeito do inseminador sobre a TP (Tabela 8).

A taxa média de cio observada nas fêmeas foi de 55,8% e a sua observação esteve diretamente associada à ocorrência da prenhez ( $P<0,01$ ). Ou seja, o índice de fêmeas gestantes foi maior ( $P<0,05$ ) entre aquelas que apresentaram cio (71,7%), em relação as que não apresentaram (28,2%). Da forma semelhante, a taxa de cio foi maior ( $p<0,05$ ) nas fêmeas que ficaram prenhes (71,7%) após a IATF que nas não prenhes (50,0%). Não foi observada diferença ( $P>0,05$ ) para a taxa de cio entre os lotes de fêmeas inseminadas nos diferentes protocolos experimentais (Tabela 7).

O efeito do reprodutor utilizado também não foi verificado ( $P=0,60$ ) sobre os índices de prenhez, pelo teste qui-quadrado.

TABELA 8. Comparação da taxa de prenhez entre as fêmeas inseminadas, de acordo com o inseminador que executou a técnica.

Parâmetro	INSEMINADORES		
	Inseminador 1	Inseminador 2	Inseminador 3
TP * (%)	30,77 <sup>a</sup>	17,19 <sup>b</sup>	35,38 <sup>a</sup>

\* Após ultrassonografia, realizada 45 dias após a inseminação.

Valores seguidos de letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste SNK ( $P<0,05$ ).

### 3.7. Correlações Entre os Parâmetros Espermáticos Estudados

Os coeficientes de correlação linear obtidos pelo teste de *Pearson*, entre os parâmetros de cinética espermática (MPH, VAP, VSL e LIN), os de integridade das membranas espermáticas (SV, IMP, IAC e PMM) e integridade do DNA (TINT e TMOM) podem ser observados na Tabela 9.

Foram verificadas correlações positivas elevadas e altamente significativas entre os parâmetros da cinética espermática obtidos pela análise computadorizada (Tabela 9). Pode-se observar as correlações significativas entre a MPH e as velocidades espermáticas (VAP, VSL) ( $r=0,52$  e  $r=0,65$ ,  $P<0,0001$ ) e entre a MPH e a LIN ( $r=0,48$ ,  $P<0,0001$ ), estas duas últimas, características que indicam a progressividade do movimento espermático.

A interação entre os parâmetros de cinética e integridade das membranas espermáticas também foi analisada (Tabela 9) e verificou-se que a taxa de integridade da membrana plasmática, obtida pelo teste supravital com corante eosina (SV) demonstrou correlações positivas e altamente significativas ( $P<0,001$ ) com todos os parâmetros de integridade das membranas espermáticas (IMP, IAC e PMM) e com a MTH. O mesmo padrão de interação observado entre SV e IMP, IAC, PMM e MTH foi verificada para a IMP.

Correlação positiva importante foi observada entre IMP e parâmetros que avaliam os níveis de lesão do DNA espermático, TINT ( $r=0,34$ ,  $P<0,05$ ) e TMOM ( $r=0,35$ ,  $P<0,05$ ).

TABELA 9. Coeficientes de correlações observados entre os parâmetros de cinética espermática e os de integridade das membranas espermáticas e DNA.

	SV	IMP	IAC	PMM	MPH	VAP	VSL	LIN	TINT	TMOM	TP
SV	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMP	0,82***	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IAC	0,71***	0,76***	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-
PMM	0,36*	0,34*	0,16	1,00	-	-	-	-	-	-	-
MPH	0,52**	0,51**	0,53**	0,26 P=0,08	1,00	-	-	-	-	-	-
VAP	0,23	0,11	0,16	0,06	0,52**	1,00	-	-	-	-	-
VSL	0,22	0,13	0,19	0,11	0,65***	0,87***	1,00	-	-	-	-
LIN	-0,16	-0,13	-0,00	0,04	0,48**	0,18	0,37*	1,00	-	-	-
TINT	0,27 P=0,08	0,34*	0,41**	0,09	0,24	0,14	0,19	-0,05	1,00	-	-
TMOM	0,07	0,35*	0,30 P=0,06	0,12	0,08	0,08	0,11	-0,05	0,65***	1,00	-
TP	0,17	0,17	0,23	0,01	0,01	0,06	0,04	-0,16	-0,06	0,09	1,00

· : Coeficientes de correlação obtidos pelo teste de correlação linear de *Pearson*. Integridade da membrana plasmática pelo teste supravital eosina (SV), integridade da membrana plasmática (IMP) e acrossomal (IAC) e alto potencial da membrana mitocondrial (PMM), observados pela associação das sondas fluorescentes IP, FITC-PSA e JC-1 (1000X). Motilidade progressiva computadorizada (MPH), velocidade progressiva (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade de trajeto (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), e linearidade (%), *tail intensity* (TINT, intensidade do DNA contido na cauda do cometa), *tail moment* (TMOM, produto da porcentagem de DNA presente na cauda e o comprimento da mesma a partir do centro de gravidade da cabeça do cometa) e taxa de prenhez das fêmeas inseminadas.

. \*  $P<0,05$

\*\*  $P<0,01$

\*\*\*  $P<0,0001$

Como ocorreu com o SV e a IMP a integridade da membrana acrossomal (IAC) apresentou correlação significativa ( $P<0,05$ ) com MPH. A IAC, assim como a

IMP também demonstrou interação positiva com TINT ( $r=0,41$ ,  $P<0,01$ ) e tendência com TMOM ( $r=0,30$ ,  $P=0,06$ ).

Ainda na Tabela 9, observa-se que PMM não apresentou correlação com nenhum dos parâmetros da cinética espermática confrontados pelo teste de *Pearson* ( $P>0,05$ ), mas demonstrou correlação com os parâmetros relacionados à integridade da membrana plasmática (SV e IMP)

Os coeficientes de correlação obtidos entre os parâmetros da integridade das membranas espermáticas (SV, IMP, IAC e PMM) estão descritos na Tabela 9. Pode-se verificar que todos esses parâmetros correlacionaram-se entre si de forma positiva ( $P<0,05$ ), exceto PMM e IAC. E as interações evidenciadas entre IAC e SV e IAC e IMP foram de alta magnitude e alta significância ( $r=0,71$  e  $r=0,76$ ,  $P<0,0001$ ).

Os parâmetros de avaliação da integridade do DNA (TINT e TMOM), não apresentaram correlação positiva com nenhuma das características da cinética espermática. Entretanto, interações positivas e significativas foram encontradas entre essas e os índices de integridade da membrana plasmática e acrossomal (Tabela 9).

A TP não apresentou correlação significativa com os parâmetros avaliados neste estudo.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Avaliação Subjetiva e Computadorizada da Cinética Espermática

Os resultados deste estudo revelaram o efeito deletério da DMA sobre a MTS e MP do sêmen pós-descongelamento. Diferente do observado no presente trabalho, Medeiros et al. (2002) verificaram que a DMA a 3% propiciou melhores ( $P<0,05$ ) índices de MP em relação ao sêmen congelado com GLI a 5% (15,2% *versus* 8,7). Os autores, no entanto, relatam que a superioridade das amidas frente ao GLI pode ser explicada, pelo fato de boa parte dos ganhões utilizados no trabalho apresentarem baixa congelabilidade ao GLI (*bad freezers*). Resultado semelhante foi obtido por Gomes et al. (2002) ao verificarem a superioridade das motilidades subjetivas e computadorizadas obtidas com a dimetilformamida a 5%, comparada ao GLI na mesma concentração. Os autores relataram se tratar de ganhões com

baixa congelabilidade ao GLI, já que apenas dois dos 17 machos apresentaram boa qualidade do sêmen pós-descongelação, utilizando este crioprotetor. Entretanto, ao se trabalhar com machos com boa congelabilidade ao GLI, tem-se obtido índices semelhantes de viabilidade espermática pós-descongelação com a utilização do GLI ou das amidas (GRAHAM, 2002; SQUIRES et al., 2004).

BIANCHI et al. (2008) com suínos relataram à superioridade da DMA (5%) frente ao GLI (3%), em relação a MTH pós-descongelação (53,8 *versus* 38,1%).

É importante ressaltar a existência de diferenças intrínsecas importantes entre os espermatozoides das espécies estudadas, que provavelmente levam à respostas diferentes de acordo com o crioprotetor utilizado e seus níveis de tolerância. Um exemplo claro disto é que diferente do que ocorre com os ruminantes, a alta toxicidade apresentada pelo GLI aos espermatozoides equinos exige que os seus níveis devam ser bem baixos no meio de congelação ( $\pm 3\%$ ), para que o sêmen desta espécie promova índices satisfatórios de fertilidade pós-descongelação (VIDAMENT et al., 2008).

Para espécie ovina os dados são escassos com a utilização das amidas como crioprotetores. Entretanto relato feito por Skeff et al. (2008) descreve índices de MTS logo após a descongelação semelhantes entre a metilformamida (MF) a 3 e 5%, comparada ao glicerol a 5,3%. E a MF na concentração de 3% proporcionou índices de MTS e integridade de membrana após o teste de termo-resistência lento (4h), semelhantes ( $P > 0,05$ ) aos obtidos com o GLI. Os autores sugeriram as amidas podem representar uma alternativa importante para a preservação espermática ovina, sendo necessário, no entanto, estudos para analisar sua fertilidade *in vivo*.

Diversos trabalhos têm relatado bons resultados com o uso de meio hiperosmótico a base de TRE para a congelação do sêmen ovino (AISEN et al., 2002, ABGOALA e TERADA, 2004; AISEN et al., 2005, BUCAK et al., 2007). Aisen et al. (2002) estudando os melhores níveis de TRE (50 a 400mOsmol) em meio isosmótico a base de Tris observaram maior ( $P < 0,05$ ) índice de MTS com a adição de 100mOsmol de TRE, quando comparado ao meio isosmótico (52% *versus* 32%). Já Bucak et al. (2007) ao testarem a TRE nas concentrações de 50 e 100mOsmol obtiveram taxas de MTS, respectivamente, de 59 e 56%, sendo a primeira superior ( $P < 0,05$ ) à MTS obtida com o meio similar sem a TRE.

Apesar da TRE não ter proporcionado melhorias sobre as motilidade espermáticas e ter acarretado índices inferiores de VIG, VCL e ALH, verificou-se

discreto efeito positivo da TRE, melhorando o índice de LIN pós-decongelação. É este fato é importante, pois a LIN está intimamente relacionada à qualidade e progressividade do movimento espermático (VERSTEGEN et al., 2002), que é fundamental para que os espermatozóides atravessem o sistema reprodutor da fêmea e atinjam o sítio de fertilização.

O efeito deletério da adição da TRE ao meio isosmótico sobre a cinética espermática pode estar ligado ao efeito osmótico proporcionado pela mesma e ao tempo de exposição dos espermatozóides ovinos ao ambiente hiperosmótico.

Peris et al. (2000) verificaram que o espermatozóide ovino suporta sem danos osmolaridades de até 910mOsmol. Entretanto, trabalho realizado por Becker (2004) com caprinos demonstrou que apesar de níveis de tolerância da membrana plasmática de até 900mOsmol, ao incubarem os espermatozóides por 30 minutos em solução hiperosmótica de sacarose a 490mOsmol provocaram uma elevada redução no percentual de espermatozóides móveis (45,7% do controle). Em outro estudo da mesma autora pode-se verificar que períodos de exposição inferiores a 10 minutos em meio Tris-gema de ovo, adicionado de 375mOsmol de sacarose, proporcionaram melhores índices de MTS pós-descongelação, levando a autora a reduzir para apenas cinco minutos o tempo de exposição do sêmen caprino ao meio hiperosmótico, previamente a congelação. Protocolo semelhante foi descrito por Abgoala e Terada (2004), utilizando um tempo de exposição de apenas 15 minutos à solução hiperosmótica de TRE previamente a congelação.

Com essas observações pode-se sugerir que os índices negativos obtidos com os meios hiperosmóticos de TRE ( $\pm 460$ mOsmol/Kg) desse estudo estariam relacionados à excessiva exposição do sêmen ovino ao meio hiperosmótico enriquecido com 100mOsmol de TRE, o que também pode explicar outros relatos de insucesso com a utilização da trealose para a congelação do sêmen ovino, como o estudo realizado por Valleriote et al. (2005) e Bittencourt et al. (2007), que não observaram benefício da adição da trealose ao diluidor de congelação. Esses últimos, assim como neste trabalho encontraram, valores inferiores ( $P < 0,05$ ) de VCL e ALH para o sêmen congelado com adição de 100mOsmol de TRE, comparado com o grupo controle sem TRE.

Diferenças entre os resultados obtidos neste estudo e os demais, referente ao efeito da TRE, podem estar ligadas a outros fatores como variações nos protocolos de diluição (uma ou duas etapas), descongelação (curva de descongelação) e



rediluição, composição do meio diluidor (concentração de gema e glicerol), comprometendo o efeito comparativo.

Outro fator que pode ter contribuído para a redução nos valores da cinética espermática, verificada nos meios hiperosmóticos, é a maior densidade do meio hipertônico, que pode prejudicar a capacidade de deslocamento espermático, reduzindo as velocidades dos movimentos (VAP, VSL, VCL). Concordando com esta afirmação, Mortimer (1997) relatou que o aumento da densidade do meio externo dos espermatozoides resultou em diminuição da amplitude da onda flagelar. E Amirat et al. (2004) descreveram valores superiores para VCL e VAP em diluidor contendo lipoproteína de baixa densidade, em relação a meio com gema de ovo.

#### 4.2. Avaliação da Viabilidade Espermática – Teste Supravital

A redução dos índices de viabilidade espermática pós-descongelamento, pelo teste supravital, também foi verificada em ovinos por Valente et al. (2009). Estes autores observaram quedas significativas ( $P < 0,05$ ) de SV de 84% e 85% no sêmen *in natura*, para 59% e 66%, respectivamente, pós-descongelamento, de acordo com o meio de congelamento testado. No presente estudo foram obtidas reduções nos índices de SV que variaram de  $\pm 21,2\%$  (TRIS+GLI6%) até  $\pm 34,5\%$  (TRIS+GLI6%+TRE), índices estes próximos aos obtidos por Valente et al. (2009), de  $\pm 19$  a 25%.

Bucak et al. (2007) relataram taxas de SV de 76,7%, 66,0% e 72,2%, para o sêmen ovino congelado respectivamente, em meio isosmótico e este acrescido de 50 e 100mOsmol de TRE. Estes índices não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre os grupos e foram superiores a média obtida neste trabalho, para todos os grupos experimentais ( $\pm 49,0\%$ ).

Os resultados verificados para SV refletiram o efeito deletério da TRE e a baixa capacidade de crioproteção da DMA, acarretando índices significativamente inferiores de SV, quando comparados ao diluidor com GLI e sem TRE.

#### 4.3. Avaliação da Integridade das Membranas Plasmática e Acrossomal e do Potencial da Membrana Mitocondrial

O percentual médio de IMP obtido entre os grupos deste experimento foi de 21,0%. Este índice foi inferior aos 29,7% (MAIA, 2006), 21,8% (AZEVEDO, 2006) e 50,9% relatados por Sousa (2007), todos em trabalhos com ovinos e utilizando para a avaliação, a associação das mesmas sondas fluorescentes utilizadas aqui.

A ineficácia da TRE verificada neste estudo contradiz os achados da literatura, cuja sua adição ao diluidor isosmótico promoveu melhoria nos índices de manutenção da integridade da membrana plasmática. Abgoala e Terada (2003) observaram que a substituição integral do meio Tris-gema e ovo por uma solução de TRE (375mOsmol) melhorou significativamente as taxas de fluidez de membrana, melhorando os índices de congelabilidade do sêmen caprino. Hu et al. (2009) com suínos, ao adicionar diferentes concentrações de TRE (25 a 200mOsmol/Kg) ao meio isotônico, obteve melhor nível manutenção da IMP (teste hiposmótico) com 100mOsmol de TRE, em relação ao meio isotônico e aos demais grupos. Da mesma forma e utilizando o mesmo método de avaliação, Aisen et al. (2002) verificaram uma melhoria dos níveis de IMP dos espermatozoides ovinos, além de taxas de nascimento duas vezes e meia superior com um meio hiperosmótico enriquecido com de 100mOsmol de TRE (semelhante ao grupo TRIS+GLI3%+TRE), em relação ao grupo isosmótico sem TRE (semelhante ao grupo TRIS+GLI3%). Em trabalho posterior utilizando com os mesmo grupos experimentais (meio isosmótico *versus* TRE 100mOsmol), Aisen et al. (2005) encontraram maiores níveis de IMP, avaliada por microscopia eletrônica com o diluidor com TRE, em relação ao sem TRE (72,6% *versus* 33,4%).

Entretanto, é importante observar que ao introduzir a TRE no meio com 3% de DMA, a taxa de IMP aumentou numericamente ( $P>0,05$ ) em relação ao similar sem TRE, igualando-se ( $P>0,05$ ) a obtida com o grupo controle (TRIS+GLI6%). Este achado revela a atividade benéfica da em preservar a membrana espermática durante o processo de cogelação, mesmo que discretamente.

De fato a TRE exerce atividade crioprotetora sobre a membrana plasmática, devido à sua capacidade de estabelecer pontes de hidrogênio com as cabeças polares dos fosfolípidios da membrana, substituindo as moléculas de água durante o

processo de desidratação o que inibe a ocorrência dos eventos de fusão das membranas plasmáticas (BAKÁS E DISALVO et al., 1991).

O efeito deletério que a DMA exerceu sobre a motilidade espermática ovina foi reforçado pelos índices reduzidos ( $P < 0,05$ ) de IMP proporcionados pela mesma pós-descongelação. Estes achados discordam dos descritos por Medeiros et al. (2002) com equinos que não observaram diferença para a integridade de membrana espermática, avaliada por fluorescência (IP e CFDA), entre o sêmen congelado com 3% de DMA ou 5% e GLI. Da mesma forma Henry et al. (2002) não verificaram diferença para a taxa de integridade da membrana plasmática equina (IP e CFDA e teste hiposmótico) para o sêmen congelado com 3,5% de acetamida e 5% de GLI, evidenciando que os crioprotetores a base de amida são uma alternativa segura para a criopreservação de sêmen de garanhões.

Este estudo demonstrou efeito positivo da TRE quando incorporado ao meio com DMA. A sua adição ao meio isosmótico melhorou os índices ( $P > 0,05$ ) de IAC, que se tornaram semelhantes aos obtidos com os meios com GLI. De acordo com estes achados, Hu et al. (2009) utilizando a sonda fluorescente FITC-PNA, detectaram maiores níveis de IAC nos espermatozoides congelados com diferentes concentrações de TRE (25 a 200mOsmol) que no meio sem TRE.

Os maiores índices de lesão acrossomal obtidos com o crioprotetor DMA, vai de encontro com os resultados relatados por LANDIN-ALVARENGA et al. (2002). Em trabalhos com equinos e utilizando a associação FITC-PNA, estes autores observaram melhores ( $P < 0,05$ ) índices de IAC com a utilização do DMA a 5%, em relação ao GLI na mesma concentração (55,6% *versus* 34,4%). Os autores concluíram que a superioridade das amidas sobre o GLI está relacionada a menor toxicidade, ao menor peso molecular, além de serem mais permeáveis às células e com maior capacidade coligativa com a água, favorecendo sua atividade crioprotetora.

Através das taxas de PMM verificadas para os diferentes diluidores, observa-se uma marcada superioridade do GLI para a manutenção da viabilidade morfofuncional das mitocôndrias em relação aos demais meios testados. Ao mesmo tempo o diluidor isosmótico com DMA proporcionou os piores índices para este parâmetro (Tabela 5). Este fato assume relevância, já que o PMM reflete a atividade mitocondrial, seu status funcional e a sua capacidade metabólica para fornecimento

de energia à célula, diretamente relacionada à condição de viabilidade do espermatozóide.

O PMM também foi influenciado pela introdução da TRE ao meio de congelação. E esta promoveu resultados diferentes, de acordo com o crioprotetor utilizado. Quando adicionada ao meio com DMA, o PMM foi favorecido ( $P < 0,05$ ). Entretanto, ao adicionar a TRE ao meio com GLI os índices de PMM eram deprimidos.

Este resultado negativo sobre o PMM, promovido pela associação da TRE ao meio com GLI a 6%, pode estar relacionado à potencialização da atividade tóxica exercida pelo GLI, quando em ambiente de intensa desidratação (Becker, 2004). Achados que contribuem para explicar esta afirmação foram observados por Becker (2004), em que a adição do dissacarídeo sacarose (375mOsmol) ao meio de congelação do sêmen caprino, com 6,8% de GLI reduziu ( $P < 0,05$ ) os índices de MTS pós-descongelação (37%), em relação ao meio isosmótico com o GLI na mesma concentração (52%). O mesmo ocorreu em estudo conduzido por Valente et al. (2009) que ao utilizar meio enriquecido com 88mOsmol de TRE e 5,3% de GLI obteve uma redução dos índices de viabilidade da membrana espermática e MTS.

#### 4.4. Avaliação da Integridade do DNA espermático através do teste do "COMETA"

Espermatozóides com lesão de DNA podem apresentar integridade estrutural e funcional das membranas e das organelas como também, padrão normal de motilidade. E apesar das lesões ocorridas no DNA espermático não interferirem no processo de fertilização ovocitária e clivagem, as alterações na estrutura do DNA são responsáveis por falhas no desenvolvimento e ocorrência da morte embrionária em estágios posteriores (NEILD et al., 2005; DRUMMEN et al., 2004). Assim, devido a importância da integridade do DNA para a fertilidade dos espermatozóides, o teste do cometa foi implementado neste estudo.

O teste do cometa mensura a quebra da fita de DNA e o comprimento da "cauda do cometa" representa os fragmentos liberados do núcleo. As bases de DNA oxidadas podem ser detectadas com alta sensibilidade possibilitando a identificação de pequenas alterações no DNA pela exposição das fitas simples ou duplas

danificadas das células (Singh et al., 1988; Collins et al., 1995; Santella, 1997; Hartmann et al., 1998).

Os resultados neste estudo obtidos com do teste do cometa demonstram que o protocolo de indução de lesão de DNA com peróxido de hidrogênio (CPOS) foi eficaz, visto que os níveis de TINT diferiram de forma significativa entre o CPOS e o controle negativo (CNEG), que era o mesmo sêmen utilizado no CPOS, sem o tratamento com o peróxido de hidrogênio (28,6 versus 19,0%,  $P < 0,05$ ).

A semelhança verificada entre o sêmen *in natura* (CPOS) e o sêmen congelado no diferentes diluidores, em relação ao nível de lesão de DNA (TINT e TMOM), reforça a hipótese de que os diluidores testados foram eficazes para a manutenção da integridade do DNA espermático e agiram de forma semelhante ( $P > 0,05$ ) entre si. Fato semelhante foi observado por Hu et al. (2009) que em trabalho com suínos não observou diferença de lesão de DNA pelo cometa, entre o sêmen *in natura* e o congelado em meio enriquecido com 9% de LDL ou 100mOsmol de TRE. Entretanto, diferente do encontrado no presente estudo, a adição da TRE a 100mOsmol ao meio isosmótico propiciou melhores níveis de manutenção da integridade do DNA, em relação ao diluidor sem nenhum aditivo.

Foi encontrado um relato recente da utilização do teste cometa para avaliação da fragmentação do DNA espermático de ovinos (MARTINS et al., 2009). Entretanto, os autores fizeram a leitura subjetivamente e classificando qualitativamente a ocorrência das lesões (positivo, com cauda e negativo, sem cauda) o que revela uma falha metodológica. A lesão do DNA é um parâmetro quantitativo, que deve ser mensurado em diferentes níveis, através de parâmetros utilizados para avaliar a sua magnitude como o TINT, TMOM e comprimento da cauda do cometa (análise por imagem). Esse fato é importante já que não existem espermatozóides sem algum grau de lesão de DNA e sim com menores e maiores níveis (MORRIS, et al., 2002) (Figura 7). Este fato foi relatado por Steele et al. (1999) que na visualização dos espermatozóides submetidos ao teste cometa (Comet Software), não encontraram células com ausência de cauda.

Como não foram encontrados estudos utilizando a análise por imagem do COMET (Comet Assay Software), para avaliação do sêmen ovino a discussão deste item se baseou em trabalhos com outras espécies.

Fraser e Strzezek (2005) e Fraser e Strzezek (2007) observaram efeito deletério ( $P < 0,05$ ) do processo de congelação do sêmen sobre os índices de TMOM

e TINT, independente do diluidor utilizado e concluíram ser o cometa uma técnica importante para auxiliar na avaliação da qualidade do sêmen congelado, associado às demais avaliações convencionais.

Baumber et al. (2006) verificaram o efeito negativo da criopreservação, como também das espécies de oxigênio reativos (ROS) sobre a integridade do DNA avaliado pelo cometa, embora os autores não saibam afirmar os mecanismos de ocorrência das lesões provocadas pelos ROS.

Valores superiores de TINT aos obtidos no presente trabalho foram citados por Jiang et al. (2005), após a congelação do sêmen suíno em diferentes concentrações de LDL (0 a 10%). Os valores de TINT variaram de 18 a 34%. E os autores relataram que o LDL a nove e 10% proporcionou os menores índices de TMOM 2,03 e 3,62%, valores semelhantes ao verificados no presente estudo (2,91 a 4,46%). Por se tratar de espécies diferentes, com características intrínsecas, o efeito comparativo dos resultados fica comprometido.

#### 4.5. Fertilidade das Fêmeas Inseminadas nos Diferentes Diluidores Experimentais

A taxa média de estro verificada neste estudo (55,8%) foi bem abaixo do relatados em diversos trabalhos anteriores, utilizando protocolos de sincronização similares. Almeida (2007) descreveram índices de 96,7% e Iwamura (2008) 80%, ambos com protocolos longos de sincronização (12 e 13 com 60mg de medroxiprogesterona - MAP) e aplicação da gonadotrofina coriônica equina (eCG) no momento da retirada da esponja com MAP. Fato semelhante foi observado por Godfrey et al. (1999) que observaram 100% e 94,4% de manifestação de cio em ovelhas submetidas a protocolo de sincronização de 12 com CIDR ou esponja de acetato de fluorogestona, respectivamente.

A manifestação do estro é a expressão mais clara da eficácia do tratamento hormonal sobre a manipulação e sincronização da onda folicular e cervas de 90% das fêmeas que recebem o progestágeno manifesta estro em até quatro dias após a retirada das esponjas (MORAES et al., 2002). Corroborando com essa afirmação, Bicudo e Sousa (2003) utilizando protocolos de sincronização de longa duração (12

dias) mais CG, observaram estro em 88,5% das fêmeas, no período de 55 e 72 horas após a retirada das esponjas.

Dessa forma, os baixos índices de sincronia verificados nas fêmeas desse estudo, provavelmente acarretaram as baixas taxas de concepção das ovelhas inseminadas em tempo fixo (IATF), com o sêmen congelado nos quatro protocolos experimentais (27,2; 26,1; 35,7 e 19,0%).

De fato, as análises feitas demonstraram que das fêmeas que ficaram prenhes após a IATF 71,7% haviam manifestado estro, enquanto apenas 28,2% não o demonstraram. Esse achado reforça a interrelação importante entre taxa de estro e a fertilidade das fêmeas inseminadas.

As taxas de prenhez obtidas neste estudo foram inferiores às relatadas com uso de IATF por Godfrey et al. (1999) – 52,9% com sêmen congelado e inseminação transcervical; Almeida (2007) – 44,8% com sêmen *in natura* e inseminação laparoscópica; e Iwamura (2008) – 40% com sêmen *in natura* e inseminação transcervical superficial. E Rabassa et al. (2007) inseminando ovelhas da raça Corriedale, com sêmen congelado, 52 a 60 horas após a retirada da esponja com MAP (11 dias) e aplicação de 500 UI de eCG, pelas vias cervical superficial, cervical média, cervical profunda e intrauterina, obtiveram 25%, 43,7%, 41,7% e 50%, respectivamente.

Diversos fatores podem vir a interferir na fertilidade das fêmeas submetidas à sincronização do estro e da ovulação como os ligados a fertilidade do macho e os referentes às fêmeas como nutrição, sanidade, fotoperíodo e mudanças bruscas de temperatura, sendo esse último fator evidenciado no leste da Austrália onde temperaturas abaixo do normal para a região, determinaram uma redução brusca da fertilidade das fêmeas inseminadas (ANGULO et al.,2008).

Seguindo este raciocínio na tentativa de explicar os baixos índices de sincronia ou de expressão do estro pelas ovelhas deste estudo, foram constatadas mudanças climáticas importantes durante o período da sincronização das fêmeas, com redução da temperatura e ocorrência de chuva torrencial, após sete meses de estiagem na região. Como não foram feitos exames mais apurados, como acompanhamento da onda folicular e dosagens de progesterona plasmática, não foi possível determinar a magnitude do evento, nem os mecanismos que possam ter vindo a contribuir para a assincronia das ovelhas e conseqüentemente a baixa fertilidade das mesmas.

O efeito do inseminador verificado neste trabalho é um fator que deve ser considerado, já que diferenças de até 20% podem ser observadas de acordo com a experiência do mesmo (ANGULO et al., 2008).

Em relação aos protocolos experimentais, as diferenças verificadas entre os diluidores, nas avaliações de cinética espermática e integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial da membrana mitocondrial não se refletiram sobre a fertilidade das fêmeas inseminadas.

E estes resultados diferem dos relatados por Aisen et al. (2002) que ao utilizarem a TRE a 100mOsmol no meio de congelação do sêmen ovino, obtiveram mais que o dobro de fêmeas gestantes, em relação ao meio isosmótico sem este aditivo. Entretanto, diferente deste estudo, os autores citados trabalharam com o GLI na concentração de 3%, metade da utilizada no presente estudo. E o efeito negativo da associação do GLI em maiores concentrações a meios hiperosmóticos já foi discutido anteriormente e pode ter influenciado sobre a ausência de efeito deste protocolo sobre a sua fertilidade no teste *in vivo*.

De forma contrária, Valente et al. (2009) apesar de ter obtido com a eosina nigrosina índices superiores ( $P < 0,05$ ) de integridade de membrana plasmática (66,5% *versus* 59,8%), para o sêmen ovino congelado em meio hiperosmótico com trealose (88mOsmol de TRE) e GLI, verificou para este, taxas bem inferiores ( $P < 0,001$ ) de fertilidade das fêmeas inseminadas (3,8% *versus* 20,5%).

As taxas de prenhez semelhantes obtidas entre o sêmen congelado com GLI e a DMA também foram relatadas por Vidament et al. (2002), utilizando 2% de GLI e 2% de dimetilformamida (DMF) observaram TP de, respectivamente 46% e 50%. Entretanto, Moffet et al. (2003) obtiveram melhores índices de TP com a DMF em relação ao GLI, apesar não observarem diferenças em relação a MTS com ambos crioprotetores. A superioridade das amidas parecem estar relacionadas a uma maior longevidade no trato genital da fêmea, conferida por estas aos espermatozóides pós-descongelção, em relação ao GLI (ALVARENGA et al., 2005).

#### 4.6. Correlações Entre os Parâmetros Espermáticos Estudados

Foram verificadas correlações altas e positivas entre todos os parâmetros da cinética espermática (exceto entre LIN e VAP). Resultados semelhantes foram



descritos por Al-Qarawi et al. (2002) ao observarem correlações positivas ( $P < 0,05$ ) entre MPH e VSL, VAP, VCL, ALH, LIN e STR. Assim como neste trabalho, Al-Qarawi também obteve correlações positivas entre VAP, VSL e LIN ( $P < 0,05$ ).

As correlações positivas e significativas entre SV e todos os parâmetros de avaliação da integridade das membranas espermática, além da MPH, demonstra ser este um teste eficaz para avaliação do percentual de células móveis e do status morfofuncional das mesmas e que, pelo seu baixo custo e praticidade, pode ser facilmente implementada nas atividades de rotina de campo e pesquisa. Esta variável ainda apresentou uma tendência ( $P = 0,08$ ) há se correlacionar positivamente com o TINT, utilizado para quantificar os níveis de lesão do DNA espermático, o que o qualifica ainda mais para análise da qualidade espermática.

A existência de correlação entre IMP e a MPH também foi descrita por Celeghini et al. (2008), os quais verificaram para esta coeficientes acima de 91% ( $P < 0,05$ ). Estas correlações são esperadas, já que a integridade estrutural e funcional da membrana plasmática dos espermatozoides é fundamental para a manutenção da sua viabilidade e do metabolismo celular, que é refletido no percentual de células móveis.

A Integridade da membrana acrossomal e a MPH apresentaram elevadas correlações positivas e significativas e isso já era esperada e justificável, já que para que ocorram as alterações na membrana acrossomal, possivelmente a membrana plasmática já foi lesada (AZEVEDO, 2006), pois esta é muito mais sensível às injúrias provocadas pelo processo de criopreservação que a membrana acrossomal, o que compromete o metabolismo celular e interfere na motilidade espermática.

Connell et al. (2002) e Martinez-Pastor et al. (2004), em trabalho com ovinos, Gonzalez (2005) com bovinos e Celeghini (2008) com equinos, encontraram correlações significativas entre PMM e as motilidades espermáticas. No presente estudo a relação entre PMM e MPH restringiu-se a uma discreta tendência positiva ( $P = 0,08$ ).

Correlações positivas entre o PMM e VSL, VCL e LIN foram descritas anteriormente por Connell et al. (2002) para o sêmen *in natura* de homens. Entretanto, após a criopreservação essas correlações na sua maioria desapareceram e restringiram-se a MP, LIN, revelando que o sêmen congelado, após as alterações sofridas durante a preservação comporta-se de forma diferente em relação as suas características e as respectivas interações entre elas.

A ausência de correlação entre PMM e a MPH deste estudo pode ser justificada, pois o PMM não se restringiu às subpopulações espermáticas com membrana plasmática íntegra e conseqüentemente com motilidade espermática. Dessa forma a correlação entre o percentual de células móveis e PMM pode ter sido influenciada.

O parâmetro SV além de apresentar correlações positivas ( $P < 0,05$ ) com as características da cinética espermática, também demonstrou estar altamente correlacionada com a IMP ( $r = 0,82$ ,  $P < 0,0001$ ) e IAC ( $r = 0,71$ ,  $P < 0,0001$ ), reafirmando a importância desse teste para estimar a viabilidade espermática, principalmente pelo baixo custo e praticidade do mesmo.

Comportando-se de forma semelhante a IMP demonstrou elevada correlação positiva com IAC ( $r = 0,76$ ,  $P < 0,0001$ ). A explicação para este achado é baseada nos mecanismos de ocorrência das alterações acrossomais que estão intimamente relacionados aos da membrana plasmática, sejam eles relacionados às injúrias diretas provocadas pelo processo de criopreservação (variação osmótica, desidratação e formação de macrocristais intracelulares) ou pelo processo cronológico de degradação celular, relacionados à criocapacitação (GREEN e WATSON, 2001). Isso explicaria a correlação positiva entre esses parâmetros, já relatada anteriormente (GONZALEZ, 2004).

Diferente do ocorrido neste experimento, Martinez-Pastor et al. (2004) reportaram a ausência de correlação entre PMM e IMP, avaliados pela combinação do Hoescht 258 e JC-1. Entretanto, Gonzalez (2004) e Bollwein et al. (2008) verificaram elevadas correlações positivas ( $r > 0,90$ ,  $P < 0,05$ ) entre IMP e PMM.

Como esperado os parâmetros utilizados para estimar o nível de lesão de DNA, TINT e TMOM apresentaram correlação positiva entre si ( $r = 0,65$ ,  $P < 0,0001$ ) como também demonstraram interação positiva com as avaliações de integridade das membranas plasmática e acrossomal. Este achado condiz com os relatados por Peris et al. (2004) ao observarem em ovinos a existência de correlação entre viabilidade espermática e lesões de DNA. Este fato sugere que os mecanismos que desencadeiam as alterações do DNA e das membranas plasmática e acrossomal estejam envolvidos e ocorram de forma sinérgica, reduzindo a capacidade fertilizante da célula espermática.

Em humanos foi reportada a relação entre TMOM e taxas de clivagem embrionária ( $r = -0,07$ ,  $P < 0,001$ ) (MORRIS et al., 2002).

Devido à falta de padronização da técnica para as diferentes espécies animais, principalmente os ruminantes, o teste do cometa tem sido empregado raramente para estas espécies, sendo utilizado mais comumente o teste de estabilidade da cromatina (SCSA) com uso do corante laranja de acridina (MARTINEZ-PASTOR et al., 2004). E este teste tem demonstrado correlações com MP (PERIS et al., 2004; KASIMANICKAM et al. 2006) e com a fertilidade de suínos (EVENSON et al., 1994), dados estes não observados neste experimento.

Não foi observada nenhuma correlação entre a TP e as demais variáveis, o que ressalta a dificuldade que se tem na predição da fertilidade espermática, mesmo a evolução exponencial das técnicas de avaliação da qualidade seminal.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados verificados neste estudo permitem fazer as seguintes conclusões:

O diluidor isosmótico acrescido de glicerol na concentração de 6% foi o mais eficaz para a manutenção das características espermáticas, quando comparado com os demais diluidores, especialmente com os que continham a dimetilacetamida como crioprotetor.

A adição da trealose aos meios de congelação deprimiu os níveis de alguns dos parâmetros da cinética espermática, entretanto, nos diluidores com dimetilacetamida, melhorou substancialmente o potencial da membrana mitocondrial.

A utilização da trealose em meio com 6% de glicerol foi prejudicial aos espermatozóides, reduzindo as taxas de integridade da membrana plasmática e atividade mitocondrial.

Os diluidores testados demonstraram de forma semelhante eficácia para a manutenção dos índices de integridade do DNA espermático, que não diferiram dos verificados para o sêmen *in natura*.

O estudo da integridade da membrana plasmática através do teste supravital com eosina pode ser utilizada como técnica de análise da qualidade seminal, quando há limitação da utilização de métodos mais avançados, pois, apresenta

correlações significativas com diversos métodos de avaliação da viabilidade da célula espermática ovina.

O teste do cometa demonstrou-se eficaz para avaliação da integridade do DNA espermático ovino e, devido suas correlações positivas com outros parâmetros de análise seminal, pode ser implementado como técnica complementar de avaliação da qualidade espermática.

Os resultados obtidos com os testes *in vitro* permitem concluir com segurança que o diluidor isosmótico com glicerol a 6% foi o mais eficaz para manutenção dos índices de viabilidade do sêmen ovinos pós-descongelação;

Entretanto, as diferenças *in vitro* verificadas entre os diluidores e crioprotetores testados não se refletiram sobre os índices de fertilidade *in vivo*, proporcionando taxas semelhantes de prenhez.

## 6. REFERÊNCIAS

ABOAGLA, E.M., TERADA, T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1245–1250, 2003.

AISEN, E.G., QUINTANA M, MEDINA V, MORELLO H, VENTURINO A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. **Cryobiology**, v.50, n.3, p.239-249, 2005.

AISEN, E.G.; MEDINA V.; VENTURINO A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. **Theriogenology**, v.57, n.7, p.1801-1808, 2002.

ALMEIDA, Ana Karine Cerqueira de. **Associação do GnRH com protocolos de sincronização do estro de curta e longa duração em ovelhas inseminadas em tempo fixo**. 2007, 59p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária da Bahia, Universidade Federal da Bahia, Bahia.

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C., MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. **Animal Reproduction Science**, v.89, n.1-4, p.105-113, 2005.

AI-QARAWI, A. A; ABDEL-RAHMAN, H. A.; EI-MOUGY, S.A. and EI-BELELY, M.S. Use of a new computerized system for evaluation of spermatozoa motility and velocity characteristics in relation to fertility levels in dromedary bulls **Animal Reproduction Science**, v.74, Issues 1-2, p. 1-9, 15 November 2002.

AZEVEDO, H.C. **Integridade e funcionalidade dos espermatozoides ovinos submetidos à criopreservação após a incorporação de colesterol, demosterol, ácido oléico-linoléico e  $\alpha$ -Lactoalbumina**. 2006, 195p Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

AMIRAT, L.; TAINURIER, D.; JEANNAU, L.; THORN, C.; GERARD, O.; COUNTERS, J.L.; ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL. A comparison with Optidyl<sup>®</sup>, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, v.61, p.895-907, 2004.

ANGULO, V.M.; GALLEGO, R.; PALOMARES, M.D.P-G. Fatores que influenciam na fertilidade da inseminação artificial. IN: AISEN, E. *Reprodução ovina e caprina*. 1 ed. São PAULO: Medvet, 2008. chap.10, p.133-141.

BAKAS, L.S.; DISALVO, E.A. Effect of Ca<sup>2+</sup> on the cryoprotective action of trehalose. **Cryobiology**, n.28, p.347-353, 1991.

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

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M.C.G. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v.21, p.895–902, 2000.

BIANCHI, I.; CALDERAM, K.; MASCHIO, E.F.; MADEIRA, E.M.; DA ROSA ULGUIM, R.; CORCINI, C.D.; BONGALHARDO, D.C.; CORRÊA, E.K.; LUCIA, T. J.R.; DESCHAMPS, J.C.; CORRÊA, M.N. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. **Theriogenology**, v.15, n.69(5), p.632-638, 2008.

BICUDO, S.D.; SOUSA, D.B. Associação de progestágeno, prostaglandina e eCG em protocolos de curta duração para indução/sincronização do estro em ovelhas Suffolk. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 473-474, 2003.

BITTENCOURT, R. F. ; BICUDO, S. D. ; PAPA, F.O. ; VASCONCELOS, Marta Freitas ; Siqueira, J.B. ; BISCARDE, Carmo Emanuel A ; RESENDE, José ; OBA, Eunice . Avaliação da congelabilidade do sêmen de carneiros e caprinos, criopreservado com um meio hiperosmótico a base de trealose. In: XXI REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2007, Costa do Sauípe. **Acta Scientiae Veterinariae**. Porto Alegre: UFRGS, 2007. v.35. p.999.

BECKER, C.S.S. **Limites de tolerância do espermatozóide caprino a soluções hiperosmóticas de sacarose e taxa de sobrevivência após criopreservação em diluidores contendo sacarose e concentrações reduzidas de crioprotetores permeantes..** 2004, 121p Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordic Veterinary Medicine**, v. 25, p. 383 – 391, 1973.

BOLLWEIN, H.; FUCHS, I.; KOESS, C. Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in cryopreserved bovine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**. V.43, p.189-195, 2008.

BUCAK, M.; ATEŞŞAHIN A.; VARIŞLI, O.; YÜCE, 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**, v.67, n.5, p.1060-1067, 2007.

CELEGHINI, E.C. **Efeito da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatinados espermatozóides usando sondas fluorescentes.** Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CELEGHINI, E.C.C. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.119-131, 2008.

COLLINS, A.R., AI-GUO, M., DUTHIE, S.J.. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. **Mutation Research**, v.336, p.69-77, 1995.

CONNELL,, M.; McClure., N.; LEWIS, S.E. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Humand Reproduction**, v.17, n.3, p.704-709, 2002.

EVENSON, D.P., THOMPSON, L., JOST, L. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. **Theriogenology**, v.41, n.3, p.637-651, 1994.

FRASER, L., STRZEZEK, J. Effect of different procedures of ejaculate collection, extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing–thawing, **Animal Reproduction Science**, v.99, p. 317–329, 2007.

FRASER, L., STRZEZEK, J. Effects of freezing–thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay, **Reproduction in Domestic Animals**. v.40, p.530–536, 2005.

FÜRST, R.; CARVALHO, G.R.; FÜRST, M.C.O.; RUAS, J.R.M.; BORGES, A.M.; MAFILLI, V. Efeito do resfriamento do sêmen eqüino sobre sua congelabilidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. [online]. v.57, n.5, pp. 599-607, 2005.

GODFREY, R.W.; COLLINS, J.R.; HENSLEY, E.L., WHEATON, J.J. Estrus synchronization and artificial insemination oh hair sheep ewes in the tropics. **Theriogenology**, v.51, p.985-997, 1999.

GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F.; MEDEIROS, A.S.L.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Improvment of stalliona spermatozoa preservation with lternative cryoprotectants for yhe Mangalarga Machador breed. **Theriogenology**, v.58, p.277-279, 2002.

GONZALEZ, R.A.F.; **Efeito da criopreservação usando diversas técnicas de congelação e crioprotetores sobre os parâmetros espermáticos e a interidade de membranas do espermatozóide bovino**. 2004, 92p Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. In: 14TH INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 2000, **Anais...** 2000. p.307.

GREEN, C.E.; WATSON, F.P. Comparison of the capacitation state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. **Reproduction**, v.122, p.889-898, 2001.

HANCOCH, J. L. The morphology of boar espermatozoa. **Journal of the Royal Microscopical Society** , n. 76, p. 84-97, 1957.

HARTMANN, A., PFUHLER, S., DENNOG, C., GERMANDIK, D., PILGER, A., SPEIT, G. Exercise-induced DNA effects in human leukocytes are not accompanied by increased formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine or induction of micronuclei. **Free Radical Biology e. Medicine**, v.24, p.245-251, 1998.

HENRY, M. SNOECK, P.P.N.; COTTORELLO, A.C.P. Post-thaw spermatozoa plasma membrane integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants, **Theriogenology**, v.58, p.245–248, 2002.

HENRY, M.; NEVES, J.P. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49p.

HU, J.H.; LI, Q.W; JIANG, Z.L.; YANG, H.; ZHANG, S.S.; ZHAO, H.W; The Cryoprotective Effect of Trehalose Supplementation on Boar Spermatozoa Quality. **Animal Reproduction Science**, v.112, n.(1-2), p.107-118, 2009.

IWAMURA, J. **Avaliação dos protocolos de sincronização de estro em ovelhas, com diferentes tempos de exposição aos progestágenos e distintas doses de eCG**. 2008, 56p Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

KASIMANICKAM, R.; PELZER, K.D., KASIMANICKAM, V.; SWECKER, W.S.; THATCHER, C.D. Association of classical semen parameters, sperm DNA index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. **Theriogenology**. v.65, p.1407-1421, 2006.

LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Evaluation of acrosomal integrity of stallions cryopreserved with amides and glycerol. **Animal Reproduction Science**, v.89, n.1-4, p.288-91, 2005.

LESLIE, S.B.; ISRAELI, E.; LIGHTHART, B.; CROWE, J.H.; CROWE, L.M. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.10, p. 3592-3597, 1995.

MAIA, M.S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase**. 2006, 149f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu-SP.

MARTINS, L.T.; SPIES, C.; GAUDÊNCIO NETO, S.; MEZZALIRA, J.C.; RAUBER, L.P.; BERTOLINI, M.; MEZZALIRA, A. Teste do Cometa para avaliar a integridade do DNA espermático em carneiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 18, 2009, Belo Horizonte, MG. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2009, CR-ROM.



MARTINES-PASTOR, F.; JOHANNISSON, A.; GIL, J.; KAABI, M.; ANEL, L.; PAZ, P.; RODRIGUEZ-MARTINEZM H. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.84, n.1-2, p.121-133, 2004.

MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M.; CARMO, M.T.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Cryopreservation of stallion sperm using different amides, **Theriogenology**, v.58, p.273–276, 2002.b

MOFFET, P.D.; BRUEMMER, J.E.; CARD, C.; SQUIRES, E.L. Comparison of dimethyl formamide and glycerol for cryopreservation of equine spermatozoa. In: PROCEEDINGS SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY ANNUAL CONFERENCE. **Anais...**, 2003, p.42.

MORAES, J.C.F.; SOUZA, C.J.H.; GONÇALVES, P.B.D.; Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos. In: GONÇALVES, P.B.D; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J. de F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela Editora, 2002. chap. 3, p.25-56.

MORRIS, I.D.; ILOTT, S.; DIXON.; BRISON, D.R.; The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. **Human Reproduction**, v. n.4, p.990-998, 2002.

MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Humand Reproduction Update**, v.3, n.5, p.403-439, 1997.

NASCIMENTO, J. **Efeito da concentração espermática sobre as características do movimento espermático e sobre membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozóides equinos criopreservados**. 2006, 107p Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo.

NEILD, D.M.; BROUWERS, J.F.; COLENBRANDER, B.; AGUERO A.; GADELLA, B.M.. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen-thawed stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction Development**, v.72, p.230–238, 2005.

PERIS, S.I.; MORRIER, A.; DUFOUR, M. BAILEY, J.L.; Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. **Journal of Andrology**, v.25, p.224-233, 2004.

PERIS, S.; SOLANES, D.; PENA, A, GIL, J.E.R.; RIGAU, T. Ion mediated resistance to osmotic changes of ram spermatozoa: the role of amiloride and ouabain. **Theriogenology**, v.54, n.1, p.1453-1467, 2000.

REIS, J.C.; Delineamentos experimentais. In: **Estatística aplicada à pesquisa em ciência veterinária**. Pernambuco: Independente, 2003. chap.21, p.397-411.

ROBERTS, S. J. **Veterinary obstetrics and genital diseases (Theriogenology)**. 3.ed. Michigan, Edwards Brothers, 1986, 981p.

RODELLO, L. **Validação do sistema automatizado de refrigeração e congelamento de sêmen ovino**. 2006, 70p Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.77-111, 2000.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v.37, p.185–249, 1995.

SANTELLA, R.M. DNA damage as a intermediate biomarker in intervention studies. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.216, p.166-171, 1997.

SINGH, N.P., MCCOY, M.T., TICE, R.R., SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, p.184-191, 1988.

SKEFF, M.; SAUER, L.; LOPES FILHO, A.F.S.; LIM, A.I.P.G.; DOROTEU, E.M.; BLUME, H.; MONDADORI, R.G. Metilformamida na criopreservação de sêmen ovino.

SOUSA, D.B. de. **Viabilidade das subpopulações de espermatozoides avaliadas pela cinética em sistema computadorizado e combinação de sondas fluorescentes como parâmetro qualitativo do sêmen congelado de ovinos**. 2007, 123p Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

SQUIRES, E.L.; KEITH, S.L.; GRAHAM, J.K.; Evaluating of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.62, n.6, p.1056-1065, 2004.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; VANDERWALL, D.K.; Mc CUE, P.M.; BRUEMMER, J. **Cooled and frozen stallion semen**. Fort Collins: Colorado State University. 1999. 80p. (Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Bulletin. N.9).

STEELE, E.K.; McCLURE, N.; MAXWELL, R.J.; LEWIS, S.E.M. A comparison of DNA damage in testicular and proximal epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. **Molecular Human Reproduction**, .5, n.9, p.831-835, 1999.

TAKADA, L. **Avaliação da resposta ovariana na sincronização do estro e da ovulação utilizando protocolo de curta duração em ovelhas da raça Suffolk**. 2004. 151. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 2004.

VALENTE, S.S., PEREIRA, R.M., BAPTISTA, M.C.; MARQUES, C.C., VASQUES, M.I., PEREIRA, M.V., HORTA, A.E., BARBAS, J.P. In vitro and in vivo fertility of ram semen cryopreserved in different extenders. **Animal Reproduction Science**, v.117, n.1-2, p.74-77, 2009.

VALLERIOTE, P.S.; DIAS, A.J.B.; PAES DE CARVALHO, F.; PAES SOBRINHO, C. Criopreservação de sêmen ovino em solução de trealose. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, Supl.1, p.310, 2005.

VIDAMENT, M.; VINCENT, P.; MARTIN, F.X.; MAGISTRINI, M.; BLESBOIS, E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. **Animal Reproduction Science**, v.112, n.1-2, p.22-35, 2008.

VERSTEGEN, J. IGUER-OUADA, M. ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**. v.57, n.1, p.149-179, 2002.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility Development**, v.7, n.4, p.871-91, 1995.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE OS ARTIGOS

Os resultados verificados nos três trabalhos permitem fazer algumas considerações e conclusões sobre o efeito dos crioprotetores e suas concentrações, dos aditivos utilizados, assim como a influência das suas associações.

O glicerol foi mais eficaz para a manutenção das características espermáticas pós-descongelamento que a dimetilacetamida e esta, nas concentrações testadas, revelou ser um agente menos eficiente para crioproteção das estruturas espermáticas.

Quando comparados os diluidores isosmóticos utilizando o glicerol, a concentração de 6% foi mais eficaz que 3%, refletindo em melhores índices dos parâmetros espermáticos pós-descongelamento.

Para a dimetilacetamida ocorreu o contrário, a concentração mais elevada (6%) revelou elevada atividade tóxica sobre os espermatozoides, deprimindo de forma considerável os seus índices de viabilidade pós-descongelamento.

O efeito da adição da trealose sobre as características dos espermatozoides descongelados apresentou-se de forma irregular e variou de acordo com o crioprotetor utilizado e da sua concentração. A associação dessa ao meio com glicerol a 6% demonstrou-se deletéria e influenciou negativamente os parâmetros espermáticos. Este fato já havia sido observado anteriormente em outros estudos e justificado pela potencialização da atividade citotóxica do glicerol em ambientes de intensa desidratação. Com o glicerol na concentração de 3% não foram observados efeitos significativos sobre o espermatozoide ovino. Entretanto, apesar de ter deprimido alguns parâmetros da cinética espermática tanto na presença do glicerol como da dimetilacetamida, nos diluidores com esta última, a trealose proporcionou, de forma importante, melhores taxas de atividade mitocondrial e efeito mais discreto sobre a integridade da membrana plasmática e acrossomal. A relação entre estes achados sugere que a influência negativa da trealose sobre a cinética espermática tenha se restringido ao efeito da maior densidade do meio, proporcionada pela mesma, prejudicando a movimentação e o deslocamento dos espermatozoides no momento da avaliação.

A atividade sinérgica entre a trealose e o EDTA relatada por trabalhos que precederam este não foi verificada. O efeito da composição do meio diluidor e a interrelação entre estes pode ter contribuído para este resultado.

De uma forma geral, o glicerol na concentração de 6% em diluidor isosmótico foi o protocolo mais eficaz para a manutenção da viabilidade espermática após o processo de congelação-descongelação.

A associação dos métodos de avaliação espermática *in vitro* utilizada neste estudo (análise subjetiva, computadorizada, supravital, microscopia de fluorescência e integridade do DNA pelo teste do cometa) e as correlações existentes entre esses, proporcionaram uma avaliação mais precisa dos níveis de integridade e funcionalidade dos espermatozóides ovinos. Entretanto, apesar das diferenças observadas entre a eficácia dos crioprotetores, suas concentrações e da associação da trealose com estes, nenhum efeito foi refletido na taxa de fertilidade das fêmeas inseminadas com o sêmen congelado nos diferentes protocolos. E corroborando com isto, nenhuma correlação entre fertilidade *in vivo* e os parâmetros espermáticos *in vitro* foi identificada, demonstrando a dificuldade que há em predeterminar, com segurança, os níveis de fertilidade espermática, ainda nos dias atuais, mesmo com a utilização de técnicas avançadas de avaliação da qualidade seminal.

## ÚLTIMAS CONSIDERAÇÕES

Melhores índices de viabilidade do sêmen ovino pós-descongelamento podem ser obtidos com alterações na composição do meio de congelamento, seja com ajustes dos seus componentes, seja com a introdução de aditivos que contribuam para a manutenção das características espermáticas.

No entanto, para que isto ocorra, a formulação do diluidor de congelamento deve levar em consideração, as características fisiológicas do sêmen da espécie (pH, tolerância osmótica, composição), como também, a variabilidade individual dentro da espécie e entre as raças, em que alguns animais podem responder de forma diferente de acordo com o diluidor, crioprotetor e aditivos utilizados na congelamento. Assim, certas vezes, demanda-se da realização de testes de congelabilidade, alterando a composição do meio diluidor, crioprotetor utilizado e/ou seus níveis, bem como a incorporação de aditivos, que contribuam para a redução dessa variabilidade individual.

É importante ressaltar que a criopreservação do sêmen não se baseia apenas no meio diluidor e seus componentes, mas em todo um sistema que deve trabalhar com sinergismo para que sejam maximizados os índices de fertilidade do sêmen descongelado, como o processo de diluição, tempo de equilíbrio e as taxas de resfriamento, congelamento e descongelamento. Além destes fatores, outros, independentes do processo de criopreservação do sêmen, podem influenciar de forma importante os índices de fertilidade quando às biotécnicas da reprodução animal, de uma forma geral, são empregadas. Esses índices podem ser prejudicados quando fatores relacionados ao manejo nutricional e sanitário das fêmeas, além da fertilidade destas, não são devidamente considerados. Outro aspecto importante, cujas consequências fisiológicas nas fêmeas ainda são pouco estudadas, está relacionado aos fatores climáticos, principalmente, quando são desencadeadas mudanças de tempo (chuva, Sol, trovoadas e variações bruscas destes) no período em que as fêmeas estão sendo submetidas aos protocolos hormonais, como ocorreram neste estudo, influenciando negativamente a taxa de sincronização do cio e afetando, conseqüentemente, os índices de fertilidade com a inseminação artificial em tempo fixo.

## REFERÊNCIAS GERAIS

ABOAGLA, E.M., TERADA, T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1245–1250, 2003.

AISEN, E.G.; ALVAREZ, H.L.; VENTURINO A.; GARDE, J.J. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. **Theriogenology**, v.53, n.5, p.1053-61, 2000.

AISEN, E.G., MEDINA V.; VENTURINO A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. **Theriogenology**, v.57, n.7, p.1801-1808, 2002.

AISEN, E.G., QUINTANA M, MEDINA V, MORELLO H, VENTURINO A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. **Cryobiology**, v.50, n.3 , p.239-249, 2005.

ALGHAMDI, A.S.; TROEDSSON, M.H.T.; XUE, J.L.; CRABO, B.G. Effect of seminal plasma concentration and various extenders on postthaw motility and glass wool-Sephadex filtration of cryopreserved stallion semen. **American Journal of Veterinary Research**. v.63, n.6, p.880-885, 2002.

ALMEIDA, Ana Karine Cerqueira de. **Associação do GnRH com protocolos de sincronização do estro de curta e longa duração em ovelhas inseminadas em tempo fixo**. 2008, 59p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária da Bahia, Universidade Federal da Bahia, Bahia.

AI-QARAWI, A. A; ABDEL-RAHMAN, H. A.; EI-MOUGY, S.A. and EI-BELELY, M.S. Use of a new computerized system for evaluation of spermatozoa motility and velocity characteristics in relation to fertility levels in dromedary bulls **Animal Reproduction Science**, v.74, Issues 1-2, p. 1-9, 15 November 2002.

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O; LANDIM-ALVARENGA, F.C., MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. **Animal Reproduction Science**, v.89, n.1-4, p.105-113, 2005.

ALVARENGA, M.A; LEÃO, K.M.; PAPA, F.O. Improvement of stallion semen post-thaw motility with utilization of dimethylformamide as cryoprotector. **Theriogenology**, v.57, n.1, p.459, 2002.

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

AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNAU, L.; THORN, C.; GERARD, O.; COUNTERS, J.L.; ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL. A comparison with Optidyl<sup>®</sup>, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, v.61, p.895-907, 2004.

ANGULO, V.M.; GALLEGO, R.; PALOMARES, M.D.P-G. Fatores que influenciam na fertilidade da inseminação artificial. IN: AISEN, E. **Reprodução ovina e caprina**. 1 ed. São PAULO: Medvet, 2008. chap.10, p.133-141.

ARAÚJO, P.G. Inseminação intrauterina em ovinos de corte com sêmen congelado. Emprego da via transperitoneal por laparoscopia. **Boletim de Inseminação Artificial**, v.7, p.5-10, 1955.

AZEVEDO, H.C. **Integridade e funcionalidade dos espermatozoides ovinos submetidos à criopreservação após a incorporação de colesterol, demosterol, ácido oléico-linoléico e  $\alpha$ -Lactoalbumina**. 2006, 195p Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

BAER, L.VON; HELLEMANN, C.; VON BAER, L. Cryopreservation of llama (Lama glama) semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.34, n.2, p.65-96, 1999.

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

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M.C.G. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v.21, p.895–902, 2000.

BAKAS, L.S.; DISALVO, E.A. Effect of Ca<sup>2+</sup> on the cryoprotective action of trehalose. **Cryobiology**, n.28, p.347-353, 1991.

BECKER, C.S.S. **Limites de tolerância do espermatozóide caprino a soluções hiperosmóticas de sacarose e taxa de sobrevivência após criopreservação em diluidores contendo sacarose e concentrações reduzidas de crioprotetores permeantes**. 2004, 121p Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BERLINGUER, F.; LEONI, G.G.; SUCCU, S.; MOSSA, F.; GALIOTO, M.; MADEDDU, M.; NAITANA, S. Cryopreservation of European Mouflon (*Ovis Gmelini* Musimon) semen during the non-breeding season is enhanced by the use of trehalose. **Reproduction Domestic Animals**, v.42, n.2, p.202-207, 2007.

BIANCHI, I.; CALDERAM, K.; MASCHIO, E.F.; MADEIRA, E.M.; DA ROSA ULGUIM, R.; CORCINI, C.D.; BONGALHARDO, D.C.; CORRÊA, E.K.; LUCIA, T. J.R.; DESCHAMPS, J.C.; CORRÊA, M.N. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. **Theriogenology**, v.15, n.69(5), p.632-638, 2008.

BICUDO, S.D.; SOUSA, D.B. Associação de progestágeno, prostaglandina e eCG em protocolos de curta duração para indução/sincronização do estro em ovelhas Suffolk. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 473-474, 2003.



BICUDO, S.D.; SOUSA, D.B.; TAKADA, L. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado e biotécnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 15, 2003. Porto Seguro – BA. **Anais...** Belo Horizonte - MG: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2003.

BITTENCOURT, R.F.; OBA, E.; VASCONCELOS, M.F.; OLIVEIRA, T.M.; BISCARDE, C.E.A.; RIBEIRO FILHO, A. de L.; BICUDO, S.D. Efeito de um meio hiperosmótico a base de trealose sobre a viabilidade do espermatozóide ovino criopreservado e para a redução do nível de glicerol no meio diluidor. In: XXI REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2008, Guarujá. **Acta Scientiae Veterinariae**. Porto Alegre: UFRG, 2008. v. 36. p. 542-542. a

BITTENCOURT, R.F.; OBA, E. VASCONCELOS, M.F.; OLIVEIRA, T.M.; BISCARDE; MARTINS, T.; GUSMÃO, A.L.; OLIVEIRA, J.V.L.; BICUDO, S. D. Avaliação de um meio hiperosmótico a base de trealose, associado ou não ao quelante de calcio edta, para criopreservação do espermatozóide ovino. In: XXXV CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2008, Gramado. **Anais**. Porto Alegre : SOVERGS, 2008. b

BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO FILHO, A. de L.; ALVES, S.G.G.; VASCONCELOS, M.F.; BISCARDE, C.E.; LEAL, L.S.; OBA, E. O efeito de um quelante de cálcio, de um detergente e da lecitina de soja sobre a congelabilidade do sêmen caprino. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, p. 305-312, 2008. c

BITTENCOURT, R. F. ; BICUDO, S. D. ; PAPA, F.O. ; VASCONCELOS, Marta Freitas ; Siqueira, J.B. ; BISCARDE, Carmo Emanuel A ; RESENDE, José ; OBA, Eunice . Avaliação da congelabilidade do sêmen de carneiros e caprinos, criopreservado com um meio hiperosmótico a base de trealose. In: XXI REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2007, Costa do Sauípe. **Acta Scientiae Veterinariae**. Porto Alegre: UFRGS, 2007. v.35. p.999.

BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO FILHO, A.L.; ALVES, S.G.G.; LEANDRO, E.E.S.; BISCARDE, C.E.A.; VASCONCELOS, M.F.; SANTANA, R.C.M.; FREITAS, D.S.; SILVA, A.A.B.; CHALHOUB, M. Utilização do Edta e do dodecil-sulfato de sódio como componente de um diluidor de congelação do sêmen caprino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 32, 2005. **Anais...** Uberlândia – MG. Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2005.

BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO FILHO, A. de L.; SANTOS, A.D.F.; FURST, R.; TEIXEIRA, R.B.S.; CHALHOUB, M.; PORTELA, A.P.; ALVES, S.G.G.; ALMEIDA, A.K.; GUIMARÃES, J.D. Utilização de glicerol ou etilenoglicol como crioprotetores na congelação de sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v.5, n.1, p.27-32, 2004.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordic Veterinary Medicine**, v. 25, p. 383 – 391, 1973.

BOLLWEIN, H.; FUCHS, I.; KOESS, C. Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in cryopreserved bovine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**. V.43, p.189-195, 2008.

BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J.P.; MARQUAN-LE GUIENNE, B.; GUERIN, B.; CAMUS, A.; LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin-based diluents. **Theriogenology**, v.50,p. 699–706, 1998.

BRISOLA, L.B. de S.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, J.F.C. de; MONTAGNER, M.M. Integridade das membranas plasmática, nuclear e mitocondrial de espermatozoides ovinos criopreservados com etilenoglicol. **Ciência Rural**, v.27, n.3, p.527-531, 1999.

BRITO, L.F., BARTH, A.D., BILODEAU-GOESEELS, S., PANICH, P.L., KASTELIC, J.P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v.60, n.8, p.1539-51, 2003.

BUCAK, M.; ATEŞŞAHIN A.; VARIŞLI, O.; YÜCE, 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**, v.67, n.5, p.1060-1067, 2007.

BURKMAN, L.J. Discrimination between non hyperactivated and classical hyperactivity motility patterns in human spermatozoa using computerized image analysis. **Fertility and Sterility**, v.55, p.363-371, 1991.

CARNEIRO, G.F.; MEDEIROS, L.R.D.; GOMES NETO, O.C.; PROCÓPIO, O.C.S.; OLIVEIRA, C.K. de. Inseminação artificial e transferência de embriões. In: Congresso Brasileiro do Santa Inês, 1, 2005, Maceió - AL. **Anais...** Maceió: Associação Brasileira do Santa Inês. 2005.

CEDENHO, A.P.; TOKUNAGA, I. M. Coloração supravital para espermatozoides: comparação entre as técnicas de eosina e eosina-nigrosina / Comparison of supravital staining techniques for spermatozoa: eosin and eosin-nigrosin. **Jornal Brasileiro de Urologia**; v.16, n.4, p.234-236, 1995.

CELEGHINI, E.C. **Efeito da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatinados espermatozoides usando sondas fluorescentes**. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CELEGHINI, E.C.C. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.119-131, 2008.

CHALAH, T.; BRILLARD, J. Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescence (SYBR-14/PI). **Theriogenology**, v.50, n.3, p.487-493, 1998.

COLLINS, A.R., AI-GUO, M., DUTHIE, S.J.. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. **Mutation Research**, v.336, p.69-77, 1995.

CONNELL, M.; McClure, N.; LEWIS, S.E. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Humand Reproduction**, v.17, n.3, p.704-709, 2002.

COUROBUSINESS. **Comercio exterior: Exportação de couros**. Disponível em: <http://www.courobusiness.com.br/comercio/56.php>. Acesso em Dezembro de 2005.

COUTINHO, A.A. **A evolução da caprino e ovinocultura no Brasil**. Disponível em: [http://www.canaltortuga.com.br/noticiario/pag\\_noticia.asp?controle=332ecategoria=5eedicao=441](http://www.canaltortuga.com.br/noticiario/pag_noticia.asp?controle=332ecategoria=5eedicao=441). Acesso em Outubro de 2005.

CURRY, M.R.; WATSON, P.F. Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. **Cryobiology**, v.31, n.1, p.39-46, 1994.

D'ALESSANDRO, A.G.; MARTEMUCCI, A.G.; COLONNA, M.A.; BELLITTI, A. Post-thaw survival of ram spermatozoa and fertility after insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender composition. **Theriogenology**, v.55, n.5, p.1159-70, 2001.

DASKIN, A.; TEKIN, N. The effect of egg-yolk on the quality of frozen Angora buck semen. **Turk-Veterinerlik ve Hayvancilik Dergisi**, v.20, n.5, p.395-398, 1996.

DAVIS, I.S., BRATTON, R.W. AND FOOTE, R.H. Livability of bovine spermatozoa at 5, -25, and -85°C in TRIS-buffered and citrate-buffered yolk-glycerol extenders. **Journal of Dairy Science**. v.46, p.333-336, 1963.

DE GRAAF, S.P.; EVANS, G.; GILLAN, L.; GUERRA, M.M.; MAXWELL, W.M.; O'BRIEN, J.K. The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.67, n.2, p.217-27, 2007

DEVIREDDY, R.V.; SWANLUND, D.J.; OLIN, T.; VINCENTE, W.; TROEDSSON, M.H.T.; BISCHOF, J.C.; ROBERTS, K.P. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry. **Biology of Reproduction**, v.66, n.1, p.222-231, 2002.

DHAMI, A.J.; SAHNI, K.L.S.O. Effect of extenders, additives and deep freezing on the leakage of lactic dehydrogenase from cattle and buffalo spermatozoa. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.63, n.3, p.251-56, 1993.

DHAMI, A.J.; MOHAN, G.; SAHNI, K.L. Effect of extenders and additives on preservability of cattle and buffalo semen at 5°C and -196°C. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.63, n.5, p.492-498, 1993.

EL-ALAMY. M.A., FOOTE, R.H. Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. **Animal Reproduction Science**. v.65, n.3-4, p.245-54, 2001.

EVENSON D.P.; WIXON, R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. **Theriogenology**, v.65, p.979-991, 2006.

EVENSON, D.P., THOMPSON, L., JOST, L. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. **Theriogenology**, v.41, n.3, p.637-651, 1994.

FAHY, G.M.; LILLEY, T.H.; LINSDELL, H.; DOUGLAS, M.S.; MERYMAN, H.T. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. **Cryobiology**, v.27, n.3, 1990.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. **Cryobiology**, v.23, n.1, p.1-13, 1986.

FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A.E.; ESTESO, M.C.; GARDE, J.J.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Catalase supplementation on thawed bull spermatozoa abolishes the detrimental effect of oxidative stress on motility and DNA integrity. **International Journal of Andrology**, v.31, n.4, p.353-359, 2009.

FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W.,. The effects of rapid cooling, cold shock of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. **Cryobiology**, v.23, p.518–524, 1986.

FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W. The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thawing motility and acrossomal integrity of ram spermatozoa. **Cryobiology**, v.26, p.64-69, 1989.

FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, M.T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v.71, p. 13-23, 2002.

FOOTE, R.H.; ARRIOLA, J. Motility and fertility of bull sperm frozen-thawed differently in egg yolk and milk extenders containing detergent. **Journal of Dairy Science**, v.70, n.12, p.2642-2647, 1987.

FRASER, L., STRZEZEK, J. Effect of different procedures of ejaculate collection, extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing–thawing, **Animal Reproduction Science**, v.99, p. 317–329, 2007.

FRASER, L., STRZEZEK, J. Effects of freezing–thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay, **Reproduction in Domestic Animals**, v.40, p.530–536, 2005.

FUKUI, Y.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; HIWASA, M.; OKABE, K. Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep. **Journal of Reproduction and Development**, v.54, n.4, p.286-289, 2008.

FUKUI, Y.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; HIWASA, M. FUKUI, Y.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; HIWASA, M.; OKABE, K. Fertility of ewes inseminated with intrauterinally with frozen semen using extender containing bovine serum albumin. **Journal of Reproduction and Development**, v.53, n.4, p.959-962, 2007.

FÜRST, R.; CARVALHO, G.R.; FÜRST, M.C.O.; RUAS, J.R.M.; BORGES, A.M.; MAFILLI, V. Efeito do resfriamento do sêmen eqüino sobre sua congelabilidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. [online]. v.57, n.5, pp. 599-607, 2005.

FÜRST, R. **Efeito do resfriamento do sêmen eqüino sobre sua congelabilidade**. 2002, 46 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

GIL, J.; RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M.; LUNDEHEIM, N.; SÖDERQUIST, L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell<sup>®</sup> and used for cervical artificial insemination. **Theriogenology**, v.59, n.5-6, p. 1157-1170, 2003. a

GIL, J.; LUNDEHEIM, N.; SÖDERQUIST, L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. **Theriogenology**, v.59, n.5-6, p. 1241-1255, 2003. b

GIL, J.; JANUSKAUSKAS, A.; HÅÅRD, M.C.H.; HÅÅRD, M.G.M.; JOHANNISSON, A.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MÁRTINEZ, H. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos Plus<sup>®</sup> and Triladyl<sup>®</sup>. **Reproduction in Domestic Animals**, v.35, p.69-77, 2000.a

GIL, J.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. **Theriogenology**, v.54, n.1, p.93-108, 2000. b

GODFREY, R.W.; COLLINS, J.R.; HENSLEY, E.L., WHEATON, J.J. Estrus synchronization and artificial insemination oh hair sheep ewes in the tropics. **Theriogenology**, v.51, p.985-997, 1999.

GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F.; MEDEIROS, A.S.L.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Improvment of stallion a spermatozoa preservation with lternative cryoprotectants for the Mangalarga Machador breed. **Theriogenology**, v.58, p.277-279, 2002.

GONZALEZ, R.A.F.; **Efeito da criopreservação usando diversas técnicas de congelação e crioprotetores sobre os parâmetros espermáticos e a interidade de membranas do espermatozóide bovino**. 2004, 92p Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

GONZALEZ, C.I.M.; OBA, E.; BICUDO, S.D. Avaliação do sêmen ovino (ovis aries) congelado em palhetas e “pellets” com diferentes meios diluidores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, 1999.

GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. In: 14TH INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 2000, **Anais...** 2000. p.307.

GREEN, C.E.; WATSON, F.P. Comparison of the capacitation state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. **Reproduction**, v.122, p.889-898, 2001.

GRUNERT, J.H.; GEYTER de C.; BORDT, J.; SCHNEIDER, H.P.; NIESCHLAG, E. Does computerized image analysis of sperm movement enhance the predictive value of semen analysis for in-vitro fertilization results? **International Journal of Andrology**, v.12, p.329-338, 1989.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v.11, n.1., p.73-88, 1990.

HANCOCH, J. L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal of the Royal Microscopical Society**, n. 76, p. 84-97, 1957.

HARTMANN, A., PFUHLER, S., DENNOG, C., GERMANDIK, D., PILGER, A., SPEIT, G. Exercise-induced DNA effects in human leukocytes are not accompanied by increased formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine or induction of micronuclei. **Free Radical Biology and Medicine**, v.24, p.245-251, 1998.

HENRY, M.; NEVES, J.P. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, 1998. 49p.

HIWASA, M.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; OKABE, K.; FUKUI, Y. Fertility after Different Artificial Insemination Methods Using a Synthetic Semen Extender in Sheep. **Journal of Reproduction and Development**, v.55, n.1, p.50-54, 2009.

HU, J.H.; LI, Q.W.; JIANG, Z.L.; YANG, H.; ZHANG, S.S.; ZHAO, H.W.; The Cryoprotective Effect of Trehalose Supplementation on Boar Spermatozoa Quality. **Animal Reproduction Science**, v.112, n.1-2, p.107-118, 2009.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal**, Rio de Janeiro, v.31, 2003, Brasil.

IWAMURA, J. **Avaliação dos protocolos de sincronização de estro em ovelhas, com diferentes tempos de exposição aos progestágenos e distintas doses de eCG**. 2008, 56p Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars. Veterinária**, v.10, p.156-65, 1994.

KASIMANICKAM, R.; PELZER, K.D., KASIMANICKAM, V.; SWECKER, W.S.; THATCHER, C.D. Association of classical semen parameters, sperm DNA index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. **Theriogenology**, v.65, p.1407-1421, 2006.

KEITH, S.L.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. et al. **Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa**. 1998, 104 p. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Colorado State University, Colorado. [on line]. Disponível em: <http://www.cvmbs.colostate.edu/phsio/abstract/els5.html>. Acessado em: 2002.

LAMBERT H. Temperature dependence of capacitation in boar spermatozoa monitored by zona-free hamster ova. **Gamete Research**, v.4, p.525-533, 1981.

LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Evaluation of acrosomal integrity of stallions cryopreserved with amides and glycerol. **Animal Reproduction Science**, v.89, n.1-4, p.288-91, 2005.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.113-141, 2000.

LEBOEUF, B.; MANFREDI, E.; BOUE, P.; PIACÈRE, A.; BRICE, G.; BARIL, G.; BROQUA, C.; HUMBLLOT, P.; TERQUI, M. Artificial insemination of dairy goats in France. **Livestock Production Science**, v.55, p.193-203, 1998.

LESLIE, S.B.; ISRAELI, E.; LIGHTHART, B.; CROWE, J.H.; CROWE, L.M. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.10, p. 3592-3597, 1995.

LI, Z.L.; LIN, Q.L.; LIU R.J.; XIE, W.Y.; XIAO, W.F. Reducing oxidative DNA damage by adding antioxidants in human semen samples undergoing cryopreservation procedure. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v.87, n.45, p.3174-3177, 2008.

MAIA, M.S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase**. 2006, 149f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu-SP.

MAIA, M.S.; AZEVEDO, H.C.; BICUDO, S.D.; SOUSA, D.B.; RODELLO, L. Efeito da adição do Equex-STM ao diluente Tris-gema na motilidade do espermatozóide criopreservado de carneiro. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, Supl.1, p.311-311, 2005.

MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GÜNZEL, A.R. Centrifugation of stallion semen and storage in large volumes straws. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.27, p.47-51, 1979.

MARTINES-PASTOR, F.; JOHANNISSON, A.; GIL, J.; KAABI, M.; ANEL, L.; PAZ, P.; RODRIGUEZ-MARTINEZM H. Use of chromatin stability assay, mitochondrial

stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.84, n.1-2, p.121-133, 2004.

MARTINS, L.T.; SPIES, C.; GAUDÊNCIO NETO, S.; MEZZALIRA, J.C.; RAUBER, L.P.; BERTOLINI, M.; MEZZALIRA, A. Teste do Cometa para avaliar a integridade do DNA espermático em carneiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 18, 2009, Belo Horizonte, MG. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2009, CR-ROM.

MARTINS-BESSA, A.; ROCHA, A.; MAYENCO-AGUIRRE, A. Incorporation of taurine and hypotaurine did not improve the efficiency of the Uppsala Equex II extender for dog semen freezing. **Theriogenology**, v.68, n.8, p.1088-1096, 2007.

MATSUOKA, T.; IMAI, H.; KOHNO, H.; FUKUI, Y. Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa. **Journal of Reproduction and Development**, v.52, n.5, p.675-683, 2006.

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

MCKINNON, A.O. Artificial insemination of cooled, transported and frozen semen. **Australian Equine Veterinary**, v.14, n.4, p.156-175, 1996.

MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M.; CARMO, M.T.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Cryopreservation of stallion sperm using different amides, **Theriogenology**, v.58, p.273-276, 2002.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, n.1, p.327-344, 2002.

MERCANTE, C.F.J.; ARRUDA, R.P.; NEVES NETO, J.R.; VISINTIN, J.A.; FAGUNDES, A.C. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 10, 1995, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de

MICHAEL, A.J.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.A.; HADJIPAVL-LITINA, D.J.; SARATSIS, P.; VERVERIDIS, H.N.; BOSCO, C.M. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.112, n.1-2, p.119-135, 2009.

MOFFET, P.D.; BRUEMMER, J.E.; CARD, C.; SQUIRES, E.L.. Comparison of dimethyl formamide and glycerol for cryopreservation of equine spermatozoa. In: PROCEEDINGS SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY ANNUAL CONFERENCE. **Anais...**, 2003, p.42.

MOLINIA, F.C.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.42, n.5, p.849-858, 1994. a



MOLINIA, F.C.; EVANS,G.; MAXWELL,W.M.C: Effect of polyols on the post-thawing motility of pellet-frozen ram spermatozoa.. **Theriogenology**, v.42, n. 1, p.15-23, 1994. b

MORAES, C.N.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D.; SCHWEITZER, C.M.; LUZ, S.L.N. Eficácia do etilenoglicol na criopreservação do sêmen ovino congelado em *pellets*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 10, 1995, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 1995. p.312.

MORAES, J.C.F. Perspectivas da utilização do sêmen congelado em programas de reprodução assistida em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.4, p.613-619, 2003

MORAES, J.C.F.; SOUZA, C.J.H.; GONÇALVES, P.B.D.; Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos. In: GONÇALVES, P.B.D; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.de F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela Editora, 2002. chap. 3, p.25-56.

MORRIS, I.D.; ILOTT, S.; DIXON.; BRISON, D.R.; The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. **Humand Reproduction**, v. n.4, p.990-998, 2002.

MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Humand Reproduction Update**, v.3, n.5, p.403-439, 1997.

MORTIMER, S.T.; MORTIMER, D. Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. **Journal of Andrology**, v.11, p.195-203, 1990.

MORTIMER, S.T., MAXWELL, W.M. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. **Reproduction Fertility and Development**.v.11, n.1, p.25-30, 1999.

NASCIMENTO, J. **Efeito da concentração espermática sobre as características do movimento espermático e sobre membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides equinos criopreservados**. 2006, 107p Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo.

NEILD, D.M.; BROUWERS, J.F.; COLENBRANDER, B.; AGUERO A.; GADELLA, B.M.. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen-thawed stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction Development**,v.72, p.230–238, 2005.

NEVES NETO, F.R.; MERCANTE, C.F.J.; ARRUDA, R.P. Fertilidade do sêmen eqüino congelado com etilenoglicol ou glicerol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11... 1995. Belo Horizonte, MG: **Anais...** Belo Horizonte, MG: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995, p.292.

NUNES, J.F. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos e do homem. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.22, n.2, p.109-112, 1998.

NUNES, J.T.; CHARNECA, R.; MILHANO, A.; ALMEIDA, J.A.; AFONSO DE ALMEIDA, J.A. (ed.); Nunes, J.T. Boar spermatozoa cryopreservation (maxi-straws method). Tradition and innovation in Mediterranean pig production. **Proceedings... IV International Symposium on Mediterranean Pig**, Evora, Portugal, 26-28 November 1998. Options-Mediterraneennes.-Serie-A,-Seminaires-Mediterraneens. 2000, n.41, p.85-91.

OBA, E.; DELL'AQUA JR., J.A.; SOUSA, D.B.; PAPA, F.O.; BICUDO, S.D.; MACEDO, L.P.. Freezing goat semen with glycerol and ethylene glycol as the cryoprotective agents. **In: 15th International Congress on Animal Reproduction (ICAR 2004)**. Brasil, p.481, 2004.

OLIVEIRA, J.F.C., NEVES, J.P. Utilização de orvus es paste e beta-amilase no congelamento de sêmen ovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.12, n.2, p.107-113, 1988.

PAPAIOANNOU, K.Z.; MURPHY, R.P.; MONKS, R.S.; HYNES, N.; RYAN, M.P.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. **Theriogenology**, v.48, p.299-312, 1997.

PEÑA, A.; LINDE FORSBERG, C. Effects of equex, one or two step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.54, n.6, p.859-875. 2000.

PEÑA, A.; LUGILDE, L.L.; BARRIO, M., HERRADÓN, P.G.; QUINTELA, L.A.. Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.59, n.8, p.1725-1739, 2002.

PERIS, S.I.; MORRIER, A.; DUFOUR, M. BAILEY, J.L.; Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. **Journal of Andrology**, v.25, p.224-233, 2004.

PERIS, S.; SOLANES, D.; PENA, A, GIL, J.E.R.; RIGAU, T. Ion mediated resistance to osmotic changes of ram spermatozoa: the role of amiloride and ouabain. **Theriogenology**, v.54, n.1, p.1453-1467, 2000.

PURANIK, S.V.; PARGAONKAR, D.R.; BAKSHI, S.A.; MARKANDEYA, N.M. Preservation of Osmanabadi and crossbred buck semen at refrigerant temperature. **Indian Journal of Animal Reproduction**, v.15, n.1, p.57-60, 1994.

QUINN, P.J.; CHOW, P.Y.W.; WHITE, I.G. Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at the plasma membrane site. **Journal of Reproduction Fertility**, v.60, p.403-407, 1980.

RABASSA, V.R.; TABELÃO, V.C.; PFEIFER, L.F.M.; SCHNEIDER, A; ZIGUER, E.A.; SCHOSSLER, E.D.; SEVERO, N.C.; PINO, F.A.B.; CORRÊA, M.V. Efeito das

técnicas transcervical e laparoscópica sobre a taxa de prenhez de ovelhas inseminadas em tempo fixo. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, n.1, p.127-133, 2007.

REIS, J.C.; Delineamentos experimentais. In: **Estatística aplicada à pesquisa em ciência veterinária**. Pernambuco: Independente, 2003. chap.21, p.397-411.

ROBERTS, S. J. **Veterinary obstetrics and genital diseases (Theriogenology)**. 3.ed. Michigan, Edwards Brothers, 1986, 981p.

ROBERTSON, L., WATSON, P.F. Calcium transport in diluted or cooled ram semen. **Journal Reproduction Fertility**, v.77, n.1, p.177-85, 1986.

RODELLO, L. **Validação do sistema automatizado de refrigeração e congelamento de sêmen ovino**. 2006, 70p Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

ROLDAN, E.R.S., MURASE, T., SHI, Q.X. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. **Science**, n.266, p.1578-1581, 1994.

ROTA, A.; IGUER-QUADA, M.; VERSTEGEN, J.; LINDE-FORSBERG, C. Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a Tris extender with or without Equex STM Paste. **Theriogenology**, v.51, n.6, 1999.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v.37, p.185–249, 1995.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.77-111, 2000.

SALLES, H. O. **Inseminação artificial por via transcervical em ovinos**. Disponível em: <http://www.cnpc.embrapa.br/artigo-2.htm>. Acesso em 25 de Out. de 2005.

SÁNCHEZ-PARTIDA, L.G.; SETCHELL, B.P.; MAXWELL, W.M. Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. **Reproduction Fertility and Development**, v.9, n.7, p.689-96, 1997.

SANCHEZ-PARTIDA, L.G.; SETCHELL, B.P.; MAXWELL, W.M. Effect of compatible solutes and diluent composition on the post-thaw motility of ram sperm. **Reproduction Fertility Development**, v.10, n.4, p.347-57, 1998.

SANTELLA, R.M. DNA damage as a intermediate biomarker in intervention studies. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.216, p.166-171, 1997

SAS. **User`s guide: Statistics**, version 5. Cary: SAS Institute Inc., 1996. 956p.

SILVA, J.C.B.; OLIVEIRA, R.; SCHNEIDER, C.; TRALDI, A.S. Inseminação artificial intra-uterina em ovinos via trans-cervical. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, Supl.1, p.307, 2005.a

SILVA, T.A.S.N. NEVES, J.P.; BRAGANÇA, J.M.; GONÇALVES, P.B.D; RUMPF, R. Uso do plasma seminal no descongelamento do sêmen ovino para inseminação transcervical em ovelhas com estro sincronizado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, Supl.1, p.307, 2005.b

SINGH, N.P., MCCOY, M.T., TICE, R.R., SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, p.184-191, 1988.

SKEFF, M.; SAUER, L.; LOPES FILHO, A.F.S.; LIM, A.I.P.G.; DOROTEU, E.M.; BLUME, H.; MONDADORI, R.G. Metformamida na criopreservação de sêmen ovino. In: XXI REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2008, Guarujá. **Acta Scientiae Veterinariae**. Porto Alegre: UFRG, 2008. v. 36. p.500.

SMITH, A.H.; POLGE, C. Survival of spermatozoa at low temperatures. **Nature**, v.166, p.668-671, 1950.

SNOECK, P.P.das N. **Aspectos da criopreservação de sêmen equino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade**. 2003, 116f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG.

SOUSA, D.B. de. **Viabilidade das subpopulações de espermatozoides avaliadas pela cinética em sistema computadorizado e combinação de sondas fluorescentes como parâmetro qualitativo do sêmen congelado de ovinos**. 2007, 123p Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

SQUIRES, E.L.; KEITH, S.L.; GRAHAM, J.K.; Evaluating of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.62, n.6, p.1056-1065, 2004.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; VANDERWALL, D.K.; Mc CUE, P.M.; BRUEMMER, J. **Cooled and frozen stallion semen**. Fort Collins: Colorado State University. 1999. 80p. (Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Bulletin. N.9).

TAKADA, L. **Avaliação da resposta ovariana na sincronização do estro e da ovulação utilizando protocolo de curta duração em ovelhas da raça Suffolk**. 2004. 151. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 2004.

TSELUTIN, K.; SEIGNEURIN, F.; BLESBOIS, E. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. **Poultry Science**, v.78, p.586-590, 1999.

STEELE, E.K.; McCLURE, N.; MAXWELL, R.J.; LEWIS, S.E.M. A comparison of DNA damage in testicular and proximal epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. **Molecular Human Reproduction**, v.5, n.9, p.831-835, 1999.

TURINO, V. de F. **Atual cenário da carne ovina no Brasil e os entraves da cadeia produtiva.** Disponível em: <http://www.farmpoint.com.br/?noticialID=46324eactA=7earealD=1esecaolD=2>

UPRETI, G.C.; JENSEN, K.; OLIVER, J.E.; DUGANZICH, D.M.; MUNDAY, R.; SMITH, J.F. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v.48, n.2-4, p.269-78, 1997.

UPRETI, G.C.; JENSEN, K.; MUNDAY, R.; DUGANZICH, D.M.; VISHWANATH, R.; SMITH, J.F. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. **Animal Reproduction Science**, v.51, p.275–287, 1998.

VALENTE, S.S., PEREIRA, R.M., BAPTISTA, M.C.; MARQUES, C.C., VASQUES, M.I., PEREIRA, M.V., HORTA, A.E., BARBAS, J.P. In vitro and in vivo fertility of ram semen cryopreserved in different extenders. **Animal Reproduction Science**, v.117, n.1-2, p.74-77, 2009.

VALLERIOTE, P.S.; DIAS, A.J.B.; PAES DE CARVALHO, F.; PAES SOBRINHO, C. Criopreservação de sêmen ovino em solução de trealose. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, Supl.1, p.310, 2005.

VERSTEGEN, J. IGUER-OUADA, M. ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**. v.57, n.1, p.149-179, 2002.

VIDAMENT, M.; VINCENT, P.; MARTIN, F.X.; MAGISTRINI, M.; BLESBOIS, E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. **Animal Reproduction Science**, v.112, n.1-2, p.22-35, 2008.

VIANA, R.O.; BORGES, I. Sistema de Produção na Ovinocultura Elite/Comercial. In: Congresso Brasileiro do Santa Inês, 1, 2005, Maceió - AL. **Anais...** Maceió: Associação Brasileira do Santa Inês. 2005.

VIGANÒ, P., BRIGNATE, C., GONFIANTINI, C., DOLDI, N., BUSACCA, M. Which is the best test to evaluate the integrity of sperm plasma membrane? **Acta Europaea Fertilitatis**, v.21, n.5, p.231-234, 1990.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility Development**, v.7, n.4, p.871-91, 1995.

WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: MORRIS, G.J.; CLARKE, A. (Eds.) **Effects of low temperatures on biological membranes.** London: Academic Press, p.189, 1981.

WATSON, P.F.; MARTIN, I.C. The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5 degrees C. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.28, n.2, p.145-52, 1975.

ZEE, Y.P.; HOLT, W.V.; GOSALVEZ, J.; ALLEN, C.D.; NICOLSON, V.; PYNE, M.; BURRIDGE, M.; CARRICK, F.N.; JOHNSTON, S.D. Dimethylacetamide can be used as an alternative to glycerol for the successful cryopreservation of koala (*Phascolarctos cinereus*) spermatozoa. **Reproduction Fertility and Development**, v.20, n.6, p.724-33, 2008.

## ANEXO I- RESUMOS DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA – EXPERIMENTO 1

Tabela 1 – Resumo da análise de variância dos parâmetros da avaliação subjetiva e computadorizada da cinética espermática do sêmen ovino *in natura* e/ou congelado, tendo como fonte de variação os tratamentos e os carneiros.

Parâmetro	Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrados médios	F	P
MTS (%)	Tratamentos	6	2965.2	23,05	0,0001
	Carneiros	9	822.1	822,1	0,0001
MPS (%)	Tratamentos	6	3729.6	25,64	0,0001
	Carneiros	9	919.9	6,32	0,0001
VIG	Tratamentos	6	1.8	27,20	0,0001
	Carneiros	9	0.7	10,41	0,0001
MTH	Tratamentos	5	905.7	7,79	0,0001
	Carneiros	9	1056.9	9,09	0,0001
MPH	Tratamentos	5	1290.5	10,77	0,0001
	Carneiros	9	2057.8	17,18	0,0001
VAP	Tratamentos	5	10992.4	43,96	0,0001
	Carneiros	9	3137.5	12,55	0,0001
VSL	Tratamentos	5	7909.1	34,80	0,0001
	Carneiros	9	3503.4	15,41	0,0001
VCL	Tratamentos	5	25422.1	58,68	0,0001
	Carneiros	9	959.4	2,21	0,0266
ALH	Tratamentos	5	19.8	59,63	0,0001
	Carneiros	9	2.4	7,26	0,0001
BCF	Tratamentos	5	11.1	2,14	0,0699
	Carneiros	9	47.0	8,99	0,0001
STR	Tratamentos	5	23.2	2,97	0,0150
	Carneiros	9	93.3	11,97	0,0001
LIN	Tratamentos	5	45.0	1,65	0,1542
	Carneiros	9	644.4	23,55	0,0001
RAP	Tratamentos	5	2317.9	14,65	0,0001
	Carneiros	9	2159.8	13,65	0,0001

Tabela 2 – Resumo da análise de variância dos parâmetros da avaliação da integridade da membrana plasmática pelo teste supravital com eosina (SV), integridade das membranas plasmática (IMP) e acrossomal (IAC), potencial da membrana mitocondrial espermática (PMM) *in natura* e/ou congelado, tendo como fonte de variação os tratamentos e os carneiros.

Parâmetro	Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrados médios	F	P
EOSC (%)	Tratamentos	6	1308.2	15,36	0,0001
	Carneiros	9	575.0	6,75	0,0001
IMP (%)	Tratamentos	5	450.7	4,19	0,0017
	Carneiros	9	560.9	5,22	0,0001
IAC (%)	Tratamentos	5	314.6	2,82	0,0198
	Carneiros	9	548.1	4,92	0,0001
PMM (%)	Tratamentos	5	155.8	0,26	0,9321
	Carneiros	9	4675.1	7,90	0,0001



## ANEXO II- RESUMOS DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA – EXPERIMENTO 2

Tabela 3 – Resumo da análise de variância dos parâmetros da avaliação subjetiva e computadorizada da cinética espermática do sêmen ovino *in natura* e/ou congelado, tendo como fonte de variação os tratamentos e os carneiros.

Parâmetro	Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrados médios	F	P
MTS (%)	Tratamentos	7	6118.0	48,37	0,0001
	Carneiros	8	890.1	7,04	0,0001
MPS (%)	Tratamentos	7	7162.4	67,27	0,0001
	Carneiros	8	555.7	5,22	0,0001
VIG	Tratamentos	7	3.1	40,15	0,0001
	Carneiros	8	0.2	3,72	0,0006
MTH	Tratamentos	6	4033.9	29,96	0,0001
	Carneiros	8	1273.2	9,46	0,0001
MPH	Tratamentos	6	3356.7	45,46	0,0001
	Carneiros	8	511.8	6,93	0,0001
VAP	Tratamentos	6	10194.5	83,06	0,0001
	Carneiros	8	712.2	5,80	0,0001
VSL	Tratamentos	6	8807.6	82,46	0,0001
	Carneiros	8	482.3	4,52	0,0001
VCL	Tratamentos	6	12567.8	47,55	0,0001
	Carneiros	8	2526.0	9,56	0,0001
ALH	Tratamentos	6	2.4	6,69	0,0001
	Carneiros	8	4.6	12,70	0,0001
BCF	Tratamentos	6	2.1	0,48	0,8217
	Carneiros	8	4.1	0,94	0,4898
STR	Tratamentos	6	46.3	5,05	0,0001
	Carneiros	8	41.6	4,54	0,0001
LIN	Tratamentos	6	322.4	13,33	0,0001
	Carneiros	8	114.6	4,74	0,0001
RAP	Tratamentos	6	4525.3	46,92	0,0001
	Carneiros	8	756.2	7,84	0,0001

Tabela 4 – Resumo da análise de variância dos parâmetros da avaliação da integridade da membrana plasmática pelo teste supravital com eosina (SV), integridade das membranas plasmática (IMP) e acrossomal (IAC), potencial da membrana mitocondrial espermática (PMM) *in natura* e/ou congelado, tendo como fonte de variação os tratamentos e os carneiros.

Parâmetro	Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrados médios	F	P
EOSC (%)	Tratamentos	7	4739.1	36,53	0,0001
	Carneiros	8	887.4	6,84	0,0001
IMP (%)	Tratamentos	7	567.8	8,46	0,0001
	Carneiros	8	123.5	1,84	0,0930
IAC (%)	Tratamentos	6	941.6	7,92	0,0001
	Carneiros	8	417.5	3,51	0,0029
PMM (%)	Tratamentos	6	1461.3	2,19	0,0606
	Carneiros	8	2619.7	3,93	0,0013

### ANEXO III- RESUMOS DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA – EXPERIMENTO 3

Tabela 5 – Resumo da análise de variância dos parâmetros da avaliação subjetiva (MTS, MPS e VIG) e computadorizada (MTH, MPH, VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN e RAP) da cinética espermática do sêmen ovino *in natura* e/ou congelado, tendo como fonte de variação os tratamentos e os carneiros.

Parâmetro	Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrados médios	F	P
MTS (%)	Tratamentos	4	3742.7	26,88	0,0001
	Carneiros	10	305.8	2,20	0,0383
MPS (%)	Tratamentos	4	3980.0	28,08	0,0001
	Carneiros	10	409.3	2,89	0,0082
VIG	Tratamentos	4	1.1	19,92	0,0001
	Carneiros	10	0.1	1,94	0,0678
MTH	Tratamentos	3	2005.6	10,11	0,0001
	Carneiros	10	399.5	2,01	0,0676
MPH	Tratamentos	3	1885.7	9,30	0,0002
	Carneiros	10	399.9	3,14	0,0074
VAP	Tratamentos	3	898.5	4,18	0,0138
	Carneiros	10	808.1	3,76	0,0023
VSL	Tratamentos	3	914.5	7,21	0,0009
	Carneiros	10	720.5	5,68	0,0001
VCL	Tratamentos	3	3694.6	4,00	0,0165
	Carneiros	10	1161.4	1,26	0,2973
ALH	Tratamentos	3	6.08	13,09	0,0001
	Carneiros	10	1.0	2,30	0,0384
BCF	Tratamentos	3	11.1	2,27	0,1012
	Carneiros	10	21.1	4,28	0,0009
STR	Tratamentos	3	26.5	2,57	0,0728
	Carneiros	10	18.8	1,82	0,0991
LIN	Tratamentos	3	131.0	6,92	0,0011
	Carneiros	10	70.0	3,70	0,0026
RAP	Tratamentos	3	1591.3	9,58	0,0001
	Carneiros	10	475.1	2,86	0,0126

Tabela 6 – Resumo da análise de variância dos parâmetros da avaliação da integridade da membrana plasmática pelo teste supravital com eosina (SV), integridade das membranas plasmática (IMP) e acrossomal (IAC), potencial da membrana mitocondrial espermática (PMM) e integridade do DNA (TINT e TMOM) do sêmen ovino *in natura* e/ou congelado, tendo como fonte de variação os tratamentos e os carneiros.

Parâmetro	Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrados médios	F	P
SV (%)	Tratamentos	4	2317.0	27,89	0,0001
	Carneiros	10	329.6	3,97	0,0008
IMP (%)	Tratamentos	3	355.1	3,58	0,0263
	Carneiros	10	329.4	3,32	0,0059
IAC (%)	Tratamentos	3	338.1	3,58	0,0262
		10	468.4	4,96	0,0004
PMM (%)	Tratamentos	3	2854.6	12,80	0,0001
	Carneiros	10	629.2	2,82	0,0148
TINT (%)	Tratamentos	5	148.7	2,47	0,0397
	Carneiros	10	224.6	7,66	0,0001
TMOM (%)	Tratamentos	5	9.58	0,66	0,6572
	Carneiros	10	37.4	3,17	0,0026

## ANEXO IV

Quadro 1. *Set Up* do IVOS 12 (Hamilton Thorn Biosciences, Beverly, EUA).

ANALYSIS SET-UP	
▪ <b>IMAGE CAPTURE</b>	
- <i>Frames Per Sec</i> .....	60 Hz
- <i>Number of Frames</i> .....	30
▪ <b>CELL DETECTION</b>	
- <i>Minimum contrast</i> .....	46
- <i>Minimum Cell Size</i> .....	10 pix
▪ <b>PROGRESSIVE CELLS</b>	
- <i>Path Velocity (VAP)</i> .....	75,0 $\mu$ /s
- <i>Straightness (STR)</i> .....	80%
▪ <b>DEFAULTS (If &lt; 5 Motili Cells)</b>	
- <i>Cell Size</i> .....	5 pix
- <i>Cell Intensity</i> .....	55
▪ <b>SLOW CELLS (Static)</b>	
- <i>VAP Cutoff</i> .....	10,0 $\mu$ /s
- <i>VSL Cutoff</i> .....	0,0 $\mu$ /s

OPTICS SET-UP	STAGE SET-UP
▪ <b>ILUMINATION</b>	▪ <b>ANALYSIS CHAMBER</b>
- <i>Intensity</i> ..... 2.200	- <i>Chamber Type</i> ..... Makler
- <i>Photometer</i> ..... 114	- <i>Chamber Deph</i> ..... 10,0 $\mu$ m
▪ <b>MAGNIFICATION</b> ..... 1,95	- <i>Stage Position</i> ..... C-19,7
▪ <b>VIDEO SOURCE</b> ..... 60 Hz	▪ <b>SET STAGE TEMPERATURE</b> ..... 37°C
- <i>Field</i> ..... Dark	▪ <b>FIELD SELECTION</b> ..... Automatic

**OBSERVAÇÃO:**

- As células com velocidade lenta (*Slow Cell*) foram consideradas como estáticas.

**Quadro 2.** Solução de PBS: Barth e Oko (1989).

<b>SOLUÇÃO DE PBS</b>	
<b>▪ SOLUÇÃO ESTOQUE DE NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	
- NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma - S5011) .....	0,24 g
- Água Mili Q .....	30,0 mL
<b>▪ SOLUÇÃO ESTOQUE DE Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	
- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,662 g
- Água Mili Q .....	70,0 mL
<b>▪ SOLUÇÃO FINAL DE PBS</b>	
- Solução Estoque de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	30,0 mL
- Solução Estoque de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	70,0 mL
- NaCl (JT-Backer-3624-19) .....	0,45 g

**Obs:** - pH e osmolaridade próximos a 7,2 e 280 mOsm/kg respectivamente;  
 - armazenar a 5 °C.

**Quadro 3.** Solução de Glutaraldeído a 0,2% (Barth e Oko, 1989)

<b>SOLUÇÃO DE GLUTARALDEÍDO</b>	
<b>▪ SOLUÇÃO ESTOQUE DE NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	
- Solução de Glutaraldeído a 50% (Vetec - S0805) .....	0,4 mL
- PBS (qsp) .....	100,0 mL

**Obs:** armazenar a 5 °C.

**Quadro 4.** Solução de Iodeto de proprídio

<b>SOLUÇÃO DE IODETO DE PROPRIDIO (IP)</b>	
<b>SOLUÇÃO ESTOQUE DE IP: 25 mg/mL</b>	
- IP (Sigma-Aldrich 28,707-5) .....	25,0 mg
- DMSO (Sigma - D2650) .....	1,0 mL
<b>SOLUÇÃO DE TRABALHO DE IP: 0,5 mg/mL</b>	
- Solução de Estoque de IP.....	20,0 $\mu$ L
- PBS .....	980,0 $\mu$ L

**Obs:** aliquotar as soluções e mantê-las congeladas e protegidas da luz.

**Quadro 5.** Solução de JC-1

<b>SOLUÇÃO DE JC-1</b>	
<b>SOLUÇÃO ESTOQUE DE JC-1: 5 mg/mL</b>	
- JC-1 (Molecular Probes, T-3168) .....	5,0 mg
- DMSO .....	1,0 mL
<b>SOLUÇÃO DE TRABALHO DE JC-1: 153 <math>\mu</math>M</b>	
- Solução de Estoque de JC-1 .....	10,0 $\mu$ L
- DMSO .....	490,0 $\mu$ L

**Obs:** aliquotar as soluções e mantê-las congeladas e protegidas da luz.

**Quadro 6.** Solução de FITC-PSA

<b>SOLUÇÃO FITC-PSA</b>	
<b>SOLUÇÃO ESTOQUE DE AZIDA DE SÓDIO: 1%</b>	
- Azida de Sódio (Sigma - S8032) .....	0,2 g
- PBS .....	20,0 mL
<b>SOLUÇÃO DE TRABALHO DE FITC-PSA: 100 µg/mL</b>	
- Solução de Estoque Azida de Sódio .....	20,0 mL
- FITC-PSA (Sigma L-0770) .....	2,0 mg

**Obs:** aliquotar e manter refrigerado a 4 °C e protegidas da luz.