

IMPLICAÇÕES DO USO DO EXTRATO DE LBD (LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE) OU DA GEMA DE OVO “PURIFICADA”, SOBRE A MOTILIDADE E MORFOLOGIA ESPERMÁTICA NO SÊMEN OVINO REFRIGERADO POR 24 OU 48 HORAS

Marcel Barbosa Falleiros¹
Sony Dimas Bicudo²
Leandro Rodello¹
Claudia Dias Monteiro¹
Sabrina Missae Sakashita¹
Romildo Romualdo Weiss³

RESUMO

Objetivou-se estudar os efeitos da substituição da gema de ovo *in natura* pela gema de ovo “purificada” (Gp) ou pelo extrato de lipoproteína de baixa densidade (LBD) em meios diluidores, sobre a motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP), retenção acrossomal (RA) e o percentual de cauda espermática dobrada (CED), de sêmen ovino refrigerado. Vinte ejaculados, de 5 carneiros da raça Dorper foram diluídos em meios Glicina Gema Leite (GGL - controle), Glicina Gema “purificada” Leite (GGpL) ou Glicina Extrato Leite (GEL), refrigerados por 24 ou 48 horas e submetidos à teste de exaustão de 120 minutos. Análise da MT e MP foi realizada em HTMA (IVOS 12) em cinco momentos: M0 - imediatamente após a diluição, M1 e M3 - após a refrigeração por 24 ou 48 horas respectivamente; M2 e M4 - após refrigeração de 24 ou 48h e incubação por 120 minutos a 37°C. Em microscopia de contraste de fase, empregando-se preparações úmidas com solução de glutaraldeído, avaliou-se a RA e o percentual de CED nos momentos M0 ao M4. A MT não foi influenciada pelo tempo de refrigeração independente do meio utilizado ($P>0,05$), porém declinou ($P<0,05$) após a refrigeração/exaustão (M2 e M4). A MP declinou em 48h de refrigeração independente do meio utilizado, obtendo-se melhores resultados no meio GEL, neste momento (M3), em relação ao controle ($P<0,05$). A exaustão também fez diminuir a MP após os dois tempos de refrigeração, porém no M2 o meio GGpL apresentou valor superior em relação ao controle ($P<0,05$). O processo de refrigeração e incubação pós-refrigeração não depreciou substancialmente a qualidade da morfologia espermática, sendo que em nenhum dos momentos as médias da RA foram inferiores a 93,8% e as da CED superiores a 5,4%. Os meios GGpL e GEL preservaram inalterada a RA durante a refrigeração por 24 ou 48 horas. Houve declínio da RA após a exaustão (M2 e M4, $P<0,05$), porém o meio GGpL apresentou melhor desempenho no M4 ($P<0,05$). Não houve efeito do meio sobre a ocorrência de CED, entretanto o GGpL preveniu o aumento do dobramento de cauda espermática em todos os momentos estudados. Conclui-se ser possível a substituição da gema de ovo *in natura* pela Gp ou pelo extrato de LBD no meio GGL para a refrigeração do sêmen ovino por até 48 horas, sem prejuízos aos parâmetros espermáticos de motilidade e morfologia.

Palavras-chave: lipoproteínas de baixa densidade; ovino; sêmen refrigerado.

¹ Pós-graduando, DRARV- FMVZ – UNESP, Botucatu-SP Marcel Barbosa Falleiros. Rua Adolpho César, 217, 18608-780, Jd. Eldorado, Botucatu-SP, Fone:(14) 81315778.

² Docente, DRARV – FMVZ – UNESP, Botucatu-SP.

³ Docente, DRA – UFPR – Curitiba-PR.

IMPLICATIONS OF THE USE OF EXTRACT LDL (LOW DENSITY LIPOPROTEIN) OR THE EGG YOLK "PURIFIED" ON MOTILITY AND MORPHOLOGY IN OVINE SEMEN COOLED TO 24 OR 48 HOURS

ABSTRACT

The objective was to study the effects of substitution of fresh egg yolk for egg yolk "purified" (EYp) or the extract of low-density lipoprotein (LDL) in extenders on the total motility (TM) and progressive motility (PM), acrosomal retention (AR) and the percentage of sperm tail folded (STF) in sheep semen cooled. Twenty ejaculates from five Dorper sheep were diluted in extender Glycine Yolk Milk (GGL - control), Glycine "purified" Yolk Milk (GGpL) or Glycine Extract Milk (GEL), cooled for 24 or 48 hours and subjected to the test depletion of 120 minutes. Analysis of TM and PM was held in HTMA (IVOS 12) in five moments: M0 - immediately after dilution, M1 and M3 - after refrigeration for 24 or 48 hours respectively, M2 and M4 - after 24 or 48 hours of cooling and incubation for 120 minutes at 37°C. In microscopy of phase contrast, using wet preparations with glutaraldehyde, we assessed the RA and the percentage of the STF at M0 to M4. TM was not affected by chilling time regardless of medium used ($P>0.05$), but declined ($P<0.05$) after the cooling / exhaust (M2 and M4). The PM declined by 48 hours regardless of the cooling extender used, obtaining better results using GEL, at the moment (M3), compared to control ($P<0.05$). The exhaust also decreased the PM after two moments of refrigeration, but in the middle GGpL in M2 showed a value higher than the control ($P<0.05$). The process of cooling and incubation post-cooling is not depreciated substantially the quality of sperm morphology, and in any of the times the mean RA was less than 93.8% and of the STF above 5.4%. The extenders GEL and GGpL preserved unchanged the RA during cooling for 24 or 48 hours. There was a decline after the exhaustion of RA (M2 and M4, $P<0.05$), but the extender GGpL performed better on the M4 ($P<0.05$). There was no effect of environment on the occurrence of STF, however the GGpL prevented the increase of the bending of sperm tails at all times studied. Then it's possible to replace the fresh egg yolk by the EYp or the extract of LDL in the extender for cooling GGL sheep semen for up to 48 hours, without altering the parameters of sperm motility and morphology.

Keywords: low density lipoprotein; ram; cooling semen.

IMPLICACIONES DEL USO DE EXTRACTO LBD (LIPOPROTEÍNA DE BAJA DENSIDAD) O DE YEMA DE HUEVO "PURIFICADA" EN LA MOTILIDAD Y MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA DEL SEMEN OVINO REFRIGERADO DURANTE 24 O 48 HORAS

RESUMEN

El objetivo fue estudiar los efectos de la sustitución de la yema de huevo fresco por la yema de huevo "purificada" (YHp) o el extracto de la lipoproteína de baja densidad (LBD) en los diluyentes, sobre la motilidad total (MT) y la motilidad progresiva (MP), la retención acrosomal (RA) y el porcentaje de cola espermática plegado (CEP) en el semen ovino refrigerado. Veinte eyaculados de cinco carneros raza Dorper fueron diluidos en los medios Glicina Yema Leche (GGL - control), Glicina Yema purificado Leche (GGpL) y Glicina Extracto Leche (GEL), refrigerado por 24 o 48 horas y sometidos a la prueba de agotamiento por 120 minutos. El análisis de MT y MP se llevó a cabo en HTMA (IVOS 12) en cinco momentos: M0 - inmediatamente después de la dilución, M1 y M3 - después de la refrigeración durante 24 o 48 horas, respectivamente, M2 y M4 - después de 24 o 48 horas de

refrigeración y la incubación durante 120 minutos a 37°C. En la microscopía de contraste de fase, utilizando preparaciones en fresco con glutaraldehído, se evaluó la RA y el porcentaje de la CEP de M0 a M4. La MT no se vio afectada por el tiempo de refrigeración, independientemente del medio utilizado ($P>0,05$), pero se redujo ($P<0,05$) posterior al periodo de refrigeración/agotamiento (M2 y M4). La MP declinó a las 48 horas, independientemente del medio de refrigeración utilizado, obteniéndose mejores resultados con el uso de GEL, en el momento (M3), en relación con el control ($P<0,05$). El agotamiento también redujo el MP después de dos tiempos de refrigeración, pero en el M2, el medio de GGpL mostró un valor más alto que el de control ($P<0,05$). El proceso de refrigeración y la incubación después de la refrigeración, no disminuyó sustancialmente la calidad de la morfología de los espermatozoides, y en ninguna de las veces la media de RA fue inferior al 93,8% y de la CEP, superior a 5,4%. Los medios de GEL y GGpL conservan la RA sin cambios durante el enfriamiento de 24 o 48 horas. Se observó una disminución después del agotamiento de la RA (M2 y M4, $P<0,05$), pero el medio GGpL presentó mejores resultados en el M4 ($P<0,05$). No hubo efecto del medio sobre la incidencia de la CEP, sin embargo, el GGpL impidió el aumento de la curvatura de la cola de los espermatozoides en todo los momentos estudiados. Se concluye, que es posible sustituir la yema de huevo fresca por la yema de huevo purificada o el extracto de LBD en el medio GGL para la refrigeración de semen ovino para un máximo de 48 horas, sin alterar los parámetros de motilidad y la morfología espermática.

Palabras clave: lipoproteínas de baja densidad; ovino; semen refrigerado.

INTRODUÇÃO

Com o aumento na demanda por carne de qualidade, a criação de ovinos se tornou uma alternativa de ganho extra para os produtores. Visando viabilizar economicamente essa produção é necessário um incremento no manejo reprodutivo, buscando um melhor aproveitamento do potencial produtivo das matrizes e reprodutores.

As biotécnicas envolvendo a manipulação do sêmen vêm se aprimorando, e proporcionando a utilização de reprodutores geneticamente superiores em um maior número de matrizes durante o período de estação de monta, a partir da expansão do ejaculado com meio diluidor, e a utilização de técnicas de inseminação artificial.

O meio diluidor exerce importante papel no processo da preservação dos espermatozoides. Nas últimas décadas, dezenas de formulações de meios diluidores têm sido propostas e vários tipos de substâncias crioprotetoras foram incorporados em suas composições. As substâncias, com reconhecida ação crioprotetora, atualmente mais utilizadas são a gema de ovo e o glicerol.

Devido seu efeito benéfico sobre a conservação de espermatozoides, a incorporação de gema de ovo (1,5 a 50%) aos diluidores é de uso consagrado sendo o constituinte mais prevalente em boa parte das formulações. A gema de ovo associada a outros ingredientes previne o choque térmico, preserva a motilidade e a integridade das membranas plasmática e acrossomal (1). Atua também, como um protetor osmótico, permitindo uma maior tolerância dos espermatozoides a soluções hipo e hiperosmóticas. A proteção que exerce durante a criopreservação se deve a sua aderência à membrana plasmática, especialmente dada pela fração das lipoproteínas de baixa densidade (LBD) (2, 3).

Porém, nos últimos anos a sua utilização tem sido questionada devido à variabilidade na composição e risco sanitário em veicular agentes microbiológicos específico para regiões isenta, conseqüente à deficiente rastreabilidade de sua origem. Há também um constante risco potencial de contaminação por micro-organismos como bactérias e micoplasmas, que podem

acarretar na geração de endotoxinas deletérias à capacidade fertilizante do espermatozoide (4, 5).

Várias técnicas de refrigeração são empregadas utilizando-se geladeira e containers de transporte. Com isso, surgiu a necessidade de aprimorar e testar meios diluidores para preservar os espermatozoides, por um maior período de tempo, mantendo a motilidade, a integridades das membranas e sua capacidade fertilizante.

Neste contexto, propõe-se avaliar a utilização do extrato de lipoproteínas de baixa densidade (LBD) e da gema de ovo “purificada”, como constituintes de meios diluidores utilizados na refrigeração do sêmen ovino.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais experimentais

O experimento foi conduzido no Laboratório de Estudos em Biotecnologia Aplicada à Reprodução de Ovinos e Caprinos do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu – SP.

Foram selecionados por meio de exame andrológico 5 carneiros da raça Dorper com idade entre 1 e 4 anos. Todos os animais foram pesados (51 Kg a 100 Kg), vermifugados e mantidos, durante o período experimental, sob as mesmas condições de instalações, alimentação e manejo.

Delineamento experimental

O sêmen foi colhido por meio de vagina artificial aquecida a 42°C com copo coletor graduado pré-aquecido a 37°C. Foram colhidos 4 ejaculados de cada carneiro, perfazendo um total de 20 amostras. Após análise em suas características macro e microscópicas as amostras foram diluídas, nos três meios diluentes, constituindo-se assim os três tratamentos experimentais pareados com a seguinte denominação:

GGL – Fração diluída em meio Glicina Gema Leite e considerada como controle dos demais tratamentos;

GGpL – Fração diluída em meio Glicina Gema “purificada” Leite;

GEL – Fração diluída em meio Glicina Extrato Leite.

Para cada tratamento foram constituídas duas alíquotas a fim de serem refrigeradas por 24 horas ou 48 horas, perfazendo-se então seis alíquotas para cada coleta. Ao final do período de refrigeração (24 ou 48 horas), um conjunto de alíquotas representando cada tratamento, foi destinado ao Teste de Exaustão com duração de 120 minutos.

Em cada uma dessas etapas o sêmen foi avaliado quanto às características de cinética e morfologia espermáticas constituindo-se cinco conjuntos de análises de acordo com o momento de sua realização:

M0 – (Momento 0): imediatamente após a adição dos meios diluidores;

M1 – (Momento 1): após refrigeração por 24 horas;

M2 – (Momento 2): após refrigeração por 24 horas, e com 120 minutos do teste de exaustão;

M3 – (Momento 3): após refrigeração por 48 horas;

M4 – (Momento 4): após refrigeração por 48 horas, e com 120 minutos do teste de exaustão.

Confecção dos meios diluentes

Foram confeccionados três meios com base no diluente Glicina Gema Leite, isentos de glicerol (6) sendo na formulação original empregada a gema de ovo *in natura* (20%), constituindo-se o controle GGL, e os outros dois denominados meio Glicina Gema “purificada” Leite (GGpL) pela substituição do constituinte gema de ovo pela gema de ovo “purificada” na formulação e meio Glicina Extrato Leite (GEL) pela substituição do constituinte gema de ovo pelo extrato de LBD na formulação.

Foram coletadas as gemas de dez ovos frescos provenientes de galinhas criadas e mantidas em sistemas de produção segundo o conceito *orgânico* e com alimentação variada. Os ovos foram quebrados manualmente sendo separada a gema do albúmen. Para total remoção da chalaça e dos restos de albúmen impregnados na membrana vitelínica, as gemas foram cuidadosamente roladas em papel filtro. Seu conteúdo foi coletado em um Becker mantido em gelo, formando um *pool* de aproximadamente 150 mL e dividido em 3 frações para confecção dos meios GGL, GGpL e GEL.

Purificação da gema de ovo

A purificação foi feita tendo como base alguns passos da extração das LBD, com o objetivo de remoção por centrifugação e diálise, de grumos, partículas sólidas e eletrólitos presentes na gema de ovo *in natura*.

Parte do *pool* das gemas de ovo, foi separada, e diluída 1:1 em solução salina isotônica (0,17M NaCl) e homogeneizada por uma hora em agitador vortex sob refrigeração a 4°C, sendo em seguida centrifugada (**1^acent.**) a 10.000 x g por 45 minutos à 4°C e o sobrenadante centrifugado novamente (**2^acent.**), para remoção completa dos grânulos. Após as centrifugações, o sobrenadante foi dialisado por um período mínimo de 8 horas tendo como eluente a água destilada, em reservatório de troca de 1000 mL, num sistema de fluxo contínuo, com volume de troca de 125 mL/hora e em temperatura controlada entre 4 e 5,5°C. Foi utilizada membrana de celulose regenerada, com tamanho de 33x21mm, de peso molecular de 12.000-16.000 e porosidade de 25 angstroms (INLAB Diagnóstica – Cód. 133 – Diadema – SP). Cada membrana tinha capacidade máxima, calculada conforme dimensões, de 90 mL. Observava-se o máximo preenchimento da membrana para minimizar a entrada de eluente, evitando-se a diluição da solução. Após a diálise foi realizada nova centrifugação (**3^acent.**) por 45 minutos a 10.000 x g sob refrigeração a 4°C. O sobrenadante “purificado” foi coletado e armazenado no freezer de -20°C em tubos tipo Falcon de 50 mL, para posterior confecção do meio GGpL.

Extração das LBD

A extração das LBD foi realizada seguindo o método descrito por Moussa et al. (2). Para isto, a gema de ovo foi diluída 1:1 com solução salina isotônica (0,17M NaCl) e homogeneizada por uma hora em agitador vortex, e sob refrigeração a 4°C., em seguida centrifugada (**1^acent.**) por 45 minutos à 4°C por 10.000 x g e o sobrenadante centrifugado novamente (**2^acent.**) por igual tempo, intensidade e temperatura, para remoção completa dos grânulos. Ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônia saturado (40%) e o pH ajustado para 8,7 com solução de hidróxido de sódio (NaOH - 0,1M), homogeneizado por uma hora sob refrigeração (4°C). Na sequência a solução foi centrifugada (**3^acent.**) a 10.000 x g por 45 minutos à 4°C, sendo o sobrenadante coletado e dialisado conforme descrito no processo de “purificação”. Após a diálise, foi realizada a última centrifugação (**4^acent.**), novamente a 10.000 x g por 45 minutos e o sobrenadante residual, rico em LBD foi coletado. O extrato foi então acondicionado em tubos tipo Falcon de 50 mL, armazenados em freezer de -20°C, para posterior confecção do meio GEL.

Análise da motilidade e morfologia espermática

A análise das motilidades foi realizada utilizando-se Hamilton Thorn Motility Analyser – HTMA (IVOS 12 – Hamilton Research – Beverly, MA, USA) em câmara de Makler a 37°C. Avaliou-se em três campos, o primeiro escolhido pelo operador e outros dois aleatórios, os parâmetros (7):

- **MT** - Motilidade total (%);
- **MP** - Motilidade progressiva (%).

Para a análise da morfologia espermática foram diluídos 10 µL de sêmen de cada alíquota, em 500 µL de solução de Glutaraldeído a 0,2% aquecida a 37°C. A preparação foi acondicionada em microtubos de fundo cônico de polipropileno de 1,5 mL. As análises foram realizadas em microscopia de contraste de fase com aumento de 1000x sob imersão por meio de preparações úmidas, classificando duzentas células por preparação (8). Nas análises dos dados, foram consideradas a retenção acrossomal (RA%) e o percentual de cauda espermática dobrada (CED%).

Diluição do sêmen

O volume ejaculado foi determinado pela graduação do copo coletor e 10 µL de sêmen foram diluídos em 4 mL de água destilada (taxa de diluição de 1:400 – volume:volume – v:v) para determinação da concentração espermática em câmara de Neubauer.

Determinada a concentração espermática, as amostras foram diluídas na proporção final de 1×10^8 espermatozoides/100 µL, nos três meios, em microtubos de fundo cônico de polipropileno de 600 µL, de tal maneira a ocupar a capacidade máxima do recipiente, minimizando a presença de ar. Para cada meio foram constituídas duas alíquotas a serem refrigeradas por 24 ou 48 horas.

Antes do início da refrigeração, os microtubos com o sêmen diluído foram mantidos em bloco térmico a 37°C, e de cada alíquota foi tomada uma amostra de 10 µL e diluída na proporção 1:20 (v:v) numa solução de X-Cell[®] (IMV Thechnologies (IMV), França) para realização das análises da motilidade e morfologia espermática (**M0**).

Refrigeração do sêmen e teste de exaustão

As alíquotas foram transferidas a um dispositivo para refrigeração com capacidade para 12 microtubos (2 carneiros, 6 amostras cada um), que havia sido mantido em estufa a 37°C (9). O conjunto foi então levado à geladeira (Minitüb 518C[®] - Minitüb do Brasil Ltda), à 5°C, por até 48 horas.

As amostras destinadas a análise e teste de exaustão, após 24 horas de refrigeração, foram retiradas todas de uma só vez, reduzindo-se assim o tempo de abertura da geladeira e evitando-se o risco de elevação da temperatura interna. Estas foram transferidas para microtubos de fundo cônico de polipropileno de 1,5 mL, aquecidas e estabilizadas em bloco térmico à 37°C, sendo acrescido 30% do meio diluente original à alíquota inicial em cada tratamento (GGL, GGpL e GEL) (10). A seguir realizou-se uma diluição de 1:20 (v:v) em solução X-Cell[®] para proceder-se as análises computadorizada da motilidade e morfologia espermática de tratamento (**M1**).

As alíquotas foram submetidas ao teste de exaustão no bloco térmico a 37°C durante 120 minutos sendo repetidas as análises aos 120 minutos (**M2**) da incubação (8).

Os mesmos procedimentos e análises foram realizados após 48 horas de refrigeração (**M3**) e durante o teste de exaustão (120 minutos – **M4**).

Análise estatística

Como havia interesse em se comparar os tratamentos e os momentos, os dados foram analisados em um delineamento de blocos ao acaso, com três tratamentos (GGL, GGpL e GEL), cinco momentos (**M0 a M4**) e cinco blocos (carneiros). Para a análise dos dados utilizaram-se as médias dos valores obtidos das quatro amostras. As variáveis apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias, sendo utilizada a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey. O nível de significância utilizado foi de 5% (11). Foi utilizado o programa SPSS 16.0 para *software* Windons[®] (Statistical Package for Social Sciences, Inc., Chicago, IL, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, os vinte ejaculados obtidos dos 5 carneiros apresentaram volume médio de $1,41 \pm 0,26$ mL e uma concentração média de $4,71 \pm 1,08 \times 10^9$ espermatozóides/mL. O sêmen utilizado encontrava-se dentro dos padrões da espécie, pois segundo Henry e Neves (12) e Karagiannidis et al. (13), o volume médio do ejaculado ovino é de aproximadamente 0,7 a 2 mL e para Boundy (14) a concentração espermática é de 3,5 a $6,0 \times 10^9$ espermatozóides/mL.

O procedimento de diluição na solução de X-Cell[®] fez-se necessário pela alta concentração espermática das amostras, que inviabiliza a análise computadorizada devido ao cruzamento das trajetórias dos espermatozóides (15).

Os valores médios e respectivos desvios padrão das MT e MP após as diluições nos meios Glicina Gema Leite (GGL), Glicina Gema purificada Leite (GGpL) e Glicina Extrato Leite (GEL), após a refrigeração e teste de exaustão, são apresentados na Tabela 1.

A MT não diferiu ($P > 0,05$) após refrigeração de 24 e 48 horas em relação ao momento imediatamente após a adição dos meios diluidores, em nenhum dos tratamentos, entretanto, observou-se diferença significativa ($P < 0,05$) em seus valores após o teste de exaustão.

A MP declinou em 48h de refrigeração independente do meio utilizado. Em dois momentos houve diferença ($P < 0,05$) entre os tratamentos. No **M2** (teste de exaustão 120 minutos) a média do GGpL (39,7%) foi igual ao GEL (28,9%) e superior ao controle GGL (21,5%). De forma semelhante, no **M3**, após 48 horas de refrigeração, a média do GEL (49,2%) foi igual ao GGpL (41%) porém superior ao controle GGL (31,2%).

Trabalhando com sêmen ovino refrigerado à 15°C, Gil et al. (5), compararam o meio comercial (Bioexcell[®] - IMV, L'Aigle, França) com meios diluidores glicerolizados e a base de leite contendo diferentes concentrações de gema de ovo e constataram não haver efeito do aumento na concentração de gema de ovo acima de 10%, sobre as motilidades total/progressiva. No presente estudo foi utilizado gema de ovo na concentração de 20% para o grupo GGL e GGpL.

Moussa et al. (2) fizeram dois experimentos com sêmen bovino comparando meios comerciais, Triladyl[®] (Minitüb, Tiefenbach, Alemanha) a base de gema de ovo e Biociphos[®] (IMV, L'Aigle, França), a meios com diferentes concentrações do extrato de LBD (2,5, 5, 10, 15 e 20%). Estes autores obtiveram resultados superiores de motilidade com Biociphos[®] e no meio com 10% de LBD, em comparação ao Triladyl[®]. No segundo experimento compararam diluidores com concentrações entre 5 e 10% de LBD com os meios comerciais e concluíram que 8% é a concentração ideal. A concentração de LBD (8%) no diluente GGL, do presente estudo, foi definida segundo Moussa et al. (2).

Tabela 1. Médias \pm desvio padrão dos parâmetros de cinética espermática (motilidades) avaliados no sistema computadorizado do sêmen ovino pré-refrigeração (M0), pós-refrigeração 24 (M1) e 48 (M3) horas, teste de exaustão 24 horas 120 (M2) minutos e 48 horas 120 (M4) minutos nos grupos GGL, GGpL e GEL.

| Meios | Refrigeração (h) | | | | |
|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| | M0 | 24 | | 48 | |
| | | M1 | M2 | M3 | M4 |
| Motilidade total - % | | | | | |
| GGL | 91,8 \pm 4,2 ^a | 87,4 \pm 14,4 ^a | 49,0 \pm 25,1 ^b | 71,7 \pm 27,7 ^{ab} | 23,5 \pm 18,7 ^c |
| GGpL | 90,4 \pm 6,0 ^a | 90,5 \pm 6,9 ^a | 66,8 \pm 23,1 ^{bc} | 74,3 \pm 20,0 ^{ab} | 28,8 \pm 23,0 ^c |
| GEL | 90,5 \pm 5,4 ^a | 90,6 \pm 4,6 ^a | 49,6 \pm 37,5 ^b | 83,4 \pm 18,8 ^a | 39,7 \pm 37,1 ^b |
| Motilidade progressiva - % | | | | | |
| GGL | 62,1 \pm 8,0 ^a | 51,1 \pm 14,4 ^a | 21,5 \pm 16,8 ^{bcB} | 31,2 \pm 17,3 ^{bB} | 6,1 \pm 6,3 ^c |
| GGpL | 64,6 \pm 5,2 ^a | 61,8 \pm 10,2 ^a | 39,7 \pm 19,8 ^{bA} | 41,0 \pm 17,7 ^{bAB} | 11,3 \pm 14,3 ^c |
| GEL | 66,4 \pm 4,6 ^a | 56,9 \pm 14,2 ^{ab} | 28,9 \pm 23,9 ^{cAB} | 49,2 \pm 18,9 ^{bA} | 21,0 \pm 22,7 ^c |

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si a $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

Para o mesmo parâmetro, médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si a $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

GGL - Meio Glicina Gema Leite; **GGpL** - Meio Glicina Gema purificada Leite; **GEL** - Meio Glicina Extrato Leite.

Corcine et al. (16) em estudo com sêmen canino refrigerado a 5°C utilizando como base o meio Tris-Glucose (TG) com diferentes concentrações de LBD (6, 8 e 10%) comparado ao controle com 20% de gema de ovo, obtiveram motilidade superior ($P < 0,01$) em todos os momentos da refrigeração (24, 48, 72 e 96 horas) nos meios com LBD em comparação ao controle.

A MT não foi influenciada pelo tempo de refrigeração independente do meio utilizado ($P > 0,05$), porém declinou ($P < 0,05$) após a refrigeração/exaustão (M2 e M4). Sousa (17), avaliando o desempenho do sêmen ovino em sistema de refrigeração e transporte (Equitainer® - Hamilton-Thorne Research, Beverly, MA, USA) utilizando o meio GGL com 20 % de gema de ovo, obteve declínio da MT e MP após teste de exaustão condizente com os resultados obtidos neste experimento. Para Maxwell e Salamon (18), o declínio da motilidade e da integridade morfológica dos espermatozoides são as mudanças mais observadas na refrigeração do sêmen ao longo do tempo.

Os parâmetros de retenção acrossomal (RA) e percentual de cauda espermática dobrada (CED) são apresentados na Tabela 2. O processo de refrigeração e incubação pós-refrigeração não depreciou substancialmente a qualidade da morfologia espermática, sendo que em nenhum dos momentos as médias da IA foram inferiores a 93,8% e as da CED superiores a 5,4%. Segundo Maxwell e Salamon (18) e Salamon e Maxwell (19), a gema de ovo atua prevenindo mudanças degenerativas do acrossomo.

A gema de ovo é um componente comum na composição dos meios diluidores, protegendo as células espermáticas contra o choque térmico e osmótico no processo de criopreservação (18-21). Atua na superfície da membrana espermática, restaurando a perda de fosfolipídios, prevenindo a ruptura da membrana plasmática (22). Os fosfolipídios que compõe a fração das LBD conferem proteção aos espermatozoides durante o processo de refrigeração (2, 23).

Os meios GGpL e GEL preservaram inalterada a RA durante a refrigeração por 24 ou 48 horas. Houve declínio da RA após a exaustão (M2 e M4, $P < 0,05$), porém o meio GGpL apresentou melhor desempenho no M4 ($P < 0,05$). Não houve efeito do meio sobre a ocorrência de CED, nos diferentes tempos de avaliações, entretanto o GGpL preveniu o aumento do dobramento de cauda espermática em todos os momentos estudados (Tab.2).

Tabela 2. Médias \pm desvio padrão dos parâmetros de integridade total da membrana espermática e morfologia espermática do sêmen ovino pré-refrigeração (M0), pós-refrigeração 24 (M1) e 48 (M3) horas, teste de exaustão 24 horas 120 (M2) minutos e 48 horas 120 (M4) minutos nos grupos GGL, GGpL e GEL.

| Meios | Refrigeração (h) | | | | |
|-------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| | M0 | 24 | | 48 | |
| | | M1 | M2 | M3 | M4 |
| | Retenção acrossomal - % | | | | |
| GGL | 99,8 \pm 0,4 ^a | 99,0 \pm 0,8 ^{ab} | 95,5 \pm 0,9 ^b | 98,1 \pm 1,5 ^b | 93,8 \pm 1,3 ^{CB} |
| GGpL | 99,8 \pm 0,4 ^a | 99,6 \pm 0,7 ^a | 95,8 \pm 0,9 ^b | 99,4 \pm 0,6 ^a | 95,4 \pm 1,0 ^{bA} |
| GEL | 99,9 \pm 0,3 ^a | 99,7 \pm 0,5 ^a | 94,7 \pm 1,0 ^b | 99,4 \pm 1,0 ^a | 93,9 \pm 1,1 ^{bB} |
| | Cauda espermática dobrada - % | | | | |
| GGL | 5,2 \pm 1,8 ^a | 4,6 \pm 1,4 ^{ab} | 3,3 \pm 1,3 ^b | 5,4 \pm 1,7 ^a | 3,5 \pm 1,2 ^b |
| GGpL | 4,1 \pm 1,2 ^a | 4,5 \pm 1,6 ^a | 3,1 \pm 1,2 ^a | 4,1 \pm 1,5 ^a | 3,4 \pm 0,9 ^a |
| GEL | 5,0 \pm 1,7 ^a | 4,7 \pm 1,7 ^{abc} | 3,4 \pm 1,3 ^{bc} | 5,0 \pm 1,1 ^a | 3,2 \pm 0,9 ^c |

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si a $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

Para o mesmo parâmetro, médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si a $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

GGL - Meio Glicina Gema Leite; **GGpL** - Meio Glicina Gema purificada Leite; **GEL** - Meio Glicina Extrato Leite.

Sousa (17) obteve melhores resultados ($P < 0,05$) para RA no meio GGL, comparado ao meio GL (Glicose Leite) em sêmen ovino após 24 horas de refrigeração e atribuiu esses resultados a presença da gema de ovo.

As LBD têm sido utilizadas em meios para congelamento nas diversas espécies. Moustacas et al. (24), em sêmen ovino congelado, observaram um maior número de lesões de acrossomo, utilizando meios com LBD liofilizada em comparação aos meios com LBD não-liofilizada. Bencharif et al. (25) e Ahmad et al. (26) obtiveram maior percentual de proteção do acrossomo com 6% de LBD no meio para espermatozoides de caninos e caprinos respectivamente.

Hu et al. (27) obtiveram maiores percentuais ($P < 0,05$) de RA, no meio contendo 8% de LBD frente aos meios com maiores e menores concentrações de LBD, no sêmen bovino criopreservado. No presente estudo, o alto percentual de acrossomos íntegros pode ser atribuído ao fato dos espermatozoides terem sido apenas refrigerados por 24 ou 48 horas.

Deve-se salientar que o sistema de refrigeração empregado utilizando o dispositivo de incubação, permite o estabelecimento de um declínio de temperatura entre 0,2-0,5°C/minuto e leva de 40 a 100 minutos para atingir 17°C, mantendo ritmo de declínio até atingir 5°C (7). Esse ritmo é considerado ideal para a preservação das características espermáticas de motilidade e morfologia, durante o processo de refrigeração.

CONCLUSÃO

A gema de ovo “purificada” e o extrato de lipoproteínas de baixa densidade podem substituir a gema de ovo *in natura* no meio diluente Glicina Gema Leite, para a refrigeração do sêmen ovino por até 48 horas, sem prejuízos aos parâmetros espermáticos de motilidade e morfologia.

Projeto de pesquisa aprovado no CEEA número: 200/2008 em 21/10/2008.

REFERÊNCIAS

1. Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gérard O, Courtens JL, et al. Bull semen in vitro fertility after criopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl[®], a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*. 2004;61:895-907.
2. Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. Low density lipoproteins extracted from hen Egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 2002;57:1695-706.
3. Bergeron A, Manjunath P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev*. 2006;73:1338-44.
4. Bousseau S, Brillard JP, Marquant-Le Guienne B, Guérin 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*. 1998;50:699-706.
5. Gil J, Rodriguez-Irazaqui M, Lundeheim N, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell[®] and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*. 2003;59:1157-70.
6. Gonzalez CIM, Oba E, Bicudo SD, Souza MIL. Cryopreservation of semen in Ideal rams with glycine-egg yolk-extender. In: *Proceedings of the 13^o International Congress of Animal Reproduction*; 1996, Sydney. Sidney: ICAR; 1996. p.2-9.
7. Davis RO, Rothmann SA, Overstreet MD. Accuracy and precision of computer-aided sperm analysis in multicenter studies. *Fertil Steril*. 1992;57:648-53.
8. Blom E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord Vet Med*. 1973;25:382-91.
9. Bicudo SD, Paschoal JPS, Ribeiro EFR, Papa FO. Dispositivo de incubação para o resfriamento de sêmen em pequenos volumes. *Rev Bras Reprod Anim*. 1991;2:456.
10. Paganini Filho P. Estudo da viabilidade do sêmen ovino frente a três diluentes em temperatura de 37°C e sob-refrigeração [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 1999.
11. Fisher LD, Belle GV. *Biostatistics a methodology for the health sciences*. New York: Wiley-Interscience; 1993.
12. Henry M, Neves JP. *Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal; 1996.
13. Karagiannidis A, Varsakeli S, Alexopoulos C, Amarantis I. Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. *Small Rumin Res*. 2000;37:125-30.
14. Boundy T. Collection and interpretation of ram semen under general practice conditions. *In Pract*. 1993;15:219-23.

15. Sousa DB, Bicudo SD, Papa FO, Ferreira JCP. Comparative study of two methods of collect the ram semen (artificial vagina and eletroejaculation) being used conventional and computerized analyses (HTMA-IVOS 10). In: Proceedings of the 26° World Veterinary Congress; 1999. Lyon. Lyon: WVA; 1999.
16. Corcine CD, Varela Jr AS, Ulguin RR, Bianchi I, Alvarenga MVF, Lucia Jr T, et al. Efeito da lipoproteína de baixa densidade da gema de ovo sobre a qualidade do sêmen canino resfriado a 5°C [Internet]. In: Anais do 13° Congresso de Iniciação Científica; 2004, Pelotas. Pelotas-RS: Universidade Federal de Pelotas; 2004 [acesso em 2008 Ago 29]. Disponível em: http://www.ufpel.edu.br/cic/2004/arquivos/CA_01100.rtf
17. Sousa DB. Viabilidade do sistema Equitainer® na refrigeração do sêmen ovino avaliado pelas análises computadorizada, de microscopia epifluorescente e inseminação artificial [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2002.
18. Maxwell WMC, Salamon S. Liquid storage of ram semen: a review. *Reprod Fertil Dev.* 1993;5:613-38.
19. Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci.* 2000;62:77-111.
20. Maxwell WMC, Watson PF. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci.* 1996;42:55-65.
21. Barbas JP, Mascarenhas RD. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank.* 2009;10:49-62.
22. Farstard W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim Reprod Sci.* 1996;42:251-60.
23. Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? *Theriogenology.* 2002;57:327-44.
24. Moustacas VS, Zaffalon MA, Lagares MA, Loaiza-Eccheverri AM, Varago FC, Neves MM, et al. Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology.* 2011;75:300-7.
25. Bencharif D, Amirat L, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, et al. The advantages of LDL (Low Density Lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology.* 2008;70:1478-88.
26. Ahmad MZAA, Chatagnon G, Amirat-Briand L, Moussa M, Tainturier D, Anton M, et al. Use of glutamine and low density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. *Reprod Domest Anim.* 2008;43:429-36.
27. Hu JH, Jiang ZL, Lv RK, Li QW, Zhang SS, Zan LS, et al. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology.* 2011;62:83-7.

Recebido em: 11/07/11

Aceito em: 17/10/12