

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO SÊMEN OVINO
REFRIGERADO NOS MEIOS GLICINA-GEMA-LEITE, GLICINA-
GEMA PURIFICADA-LEITE E GLICINA-EXTRATO DE
LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE-LEITE

MARCEL BARBOSA FALLEIROS

BOTUCATU – SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO SÊMEN OVINO
REFRIGERADO NOS MEIOS GLICINA-GEMA-LEITE, GLICINA-
GEMA PURIFICADA-LEITE E GLICINA-EXTRATO DE
LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE-LEITE

MARCEL BARBOSA FALLEIROS

Dissertação apresentada junto ao
programa de pós-graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Mestre.

Área de concentração: Reprodução
Animal.

Orientador: Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo

BOTUCATU – SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Falleiros, Marcel Barbosa.

Avaliação comparativa do sêmen ovino refrigerado nos meios Glicina-Gema-Leite, Glicina-Gema purificada-Leite e Glicina-Extrato de Lipoproteínas de baixa densidade-Leite / Marcel Barbosa Falleiros. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Sony Dimas Bicudo

Capes: 50504002

1. Lipoproteínas. 3. Ovino – Reprodução. 3. Sêmen.

Palavras-chave: Lipoproteínas de baixa densidade; Ovino; Sêmen refrigerado.

Nome do autor: Marcel Barbosa Falleiros
Título: Avaliação comparativa do sêmen ovino refrigerado nos meios
Glicina-Gema-Leite, Glicina-Gema purificada-Leite e Glicina-Extrato de
Lipoproteínas de baixa densidade-Leite.

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss
Membro
Departamento de Reprodução Animal
UFPR – Curitiba

Prof. Dra. Eunice Oba
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Data da Defesa: 20 de abril de 2011.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus Pais, Odilon e Neiva. Ao longo do tempo vamos aprendendo a admirar e nos espelhar em pessoas que sejam exemplos de caráter, honestidade e trabalho. Mas isto só é possível se o exemplo que tivermos em casa seja este. E vocês o são. São os maiores exemplos de caráter que conheço, de pessoas dedicadas à família e ao bem dos seus filhos. Além disso, vocês têm dado mais um exemplo que é o da força. Força essa que vem fazendo todos nós superarmos momentos difíceis e colocado em prova o amor que temos dentro da nossa família. Vocês são o meu e o nosso alicerce. Obrigado por sempre acreditarem em mim e em nós seus filhos e por continuarem a ser o nosso alicerce, a nossa força! Amo vocês!

Aos meus avós, maternos e paternos (*in memoriam*), sem o exemplo de vocês nada disso seria possível. A saudade é imensa, mas a certeza de um reencontro supera tudo isso.

AGRADECIMENTOS

À minha família. Ao meu irmão Andrigo, por ser um exemplo de profissional e por me apoiar em todos os momentos. Também aos 2, Carol e Andrigo, por trazerem uma alegria a mais na nossa vida, que será esse futuro sobrinho (a). As minhas irmãs Nabile, Paola e Fernanda. Sempre que preciso sei em quem confiar, e vocês estão em primeiro na lista. Amo vocês e obrigado por tudo.

Ao meu Tio Nei. Por ser um segundo pai ao longo de todos esses anos, sempre presente em todos os momentos. Obrigado meu Tio por tudo, te amo.

A minha noiva Mariana, que sempre esteve ao meu lado durante essa caminhada, algumas vezes me apoiando, outras nem tanto, mas crescendo junto comigo durante esse tempo, e se fazendo sempre presente, apesar da distancia. Amo você.

A família da Mariana, meu sogro Zico e sogra Élide, minha cunhada Fernanda e esposo Jean e a caçula Ana. Obrigado por todo apoio durante esse tempo e por todo o convívio ao longo desses anos. Vocês são especiais.

Ao amigo e mestre, Professor Sony. Um homem que é permeado pela ética, tornando-se exemplo a quem quer que seja. Obrigado por essa oportunidade de crescimento profissional e pessoal. O senhor é um dos grandes responsáveis por essa conquista.

Ao Professor e amigo Romildo. Obrigado por também fazer parte dessa conquista, pois foi você quem intermediou o contato com o Professor Sony e por isso hoje este trabalho está concluído.

A Professora Eunice. Obrigado pelas nossas conversas de corredor, me deram um novo animo para o trabalho e me mostraram que às vezes nem tudo acontece da forma como gostaríamos, mas que temos que tirar o melhor de cada situação.

Aos Professores do Departamento de Reprodução Animal Nereu, Papa, Marco, Denise, Meira, João e Fernanda. Cada um me marcou durante esse tempo em Botucatu. Pelas brincadeiras às vezes meio sem jeito, conversas de assuntos profissionais e aleatórios (sempre de cunho científico, aham!), viagem para o Paraná com conversas mais que divertidas (Nereu), “e ai tudo azul!”, pelo

estresse, que nem sempre o é (Papa) é mais o jeitão mesmo, pela risada fácil e divertida (João), “modelitos” sempre na moda (Denise), simplicidade em pessoa (Meira) e pelos exemplos de grandes mestres que o são. Obrigado.

Ao Professor Cuadrado (Medicina) que gentilmente cedeu boa parte do seu tempo me ensinando os princípios básicos da diálise. Foram fundamentais na execução do trabalho.

Aos amigos do futebol em Botucatu. Momentos únicos de diversão e terapia anti-estresse. Obrigado por tudo.

Aos amigos de república. André, Maradona, Pito, Du Véio e Ruffles, vocês estarão sempre em meus pensamentos. Obrigado amigos por serem parte da minha historia.

Ao amigo Leandro (Alemão). Foi com você que aprendi a maior parte das coisas aqui em Botucatu. Serei eternamente grato por isso. Ao amigo Thiago (Piolho) também sempre presente nos nossos trabalhos e nas cervejinhas e churrasco que fazíamos, obrigado amigo.

A Claudinha e Sabrina. Claudinha e Hugo por serem essas pessoas fora de série e Claudinha obrigado pelas conversas de estímulo, você foi muito importante nessa caminhada. Sabrina por estarmos juntos no laboratório, um ajudando o outro durante nossos experimentos. Obrigado.

Aos amigos do poker Zé, Braxola, Prepúcio, Duroc e a turma da farmácia, valeu pelos momentos de relaxamento e descontração, todos eles foram muito importantes.

Aos amigos do departamento Beizola, Carla, Betânia, Vivi, Guta, Camila, Leticia, Ian, Wolf, Jair, Gabriel, Natalia, Roberta, Bianca, Tati, Mateus, Dani, Cely, Luis, Carol, Renan, Tito, Rosiara, Carmo, Renatinha, Alfafa, Yeda, Elisa, Aline, Fernanda (Pira), Fernanda, Priscilla, Bruna, Rodrigão e todos aqueles que possa estar negligenciando aqui neste agradecimento, muito obrigado por fazer parte desse momento da minha vida. Todos tiveram sua parcela durante esse período.

A amiga Ana Isabel, que com muita paciência me ensinou os princípios da precipitação de levitinas, às vezes até deixando de fazer suas coisas para me ensinar. Obrigado.

Aos amigos de quase uma segunda casa, onde ia assistir aos mais variados jogos. Filão, Pão e Flor. Obrigado por tornarem esse tempo aqui mais divertido, vocês estarão sempre em meus pensamentos. Claro e lógico não poderia esquecer as crianças Maiada, Rabuja, Chico, Boomer, Farofa, Toti e a Turtle, as cobras deixa pra lá... hehehehe. Obrigado.

Aos estagiários que passaram pelo laboratório, obrigado por toda ajuda ao longo desse tempo.

Aos amigos do Laboratório Clínico Professor Raimundo, Marcião, Luisão, Vado e Ilson. Obrigado pela companhia na pescaria, pelas conversas e pelas jantãs divertidas, vocês são fora de série. Também do Laboratório os amigos, Tiago, Ana, Rê, Claudinha e todos estagiários que por lá estiveram durante esse período, obrigado pelas conversas engraças durante esse tempo.

Aos proprietários que gentilmente cederam seus reprodutores Dorper para a realização deste experimento Hélio Dias Santos Duarte e Flávio, obrigado.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária Cris, Edílson, Valter, Zé e Edivaldo. Obrigado por toda ajuda ao longo desse tempo em Botucatu.

Ao curso de Pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ-RARV UNESP-Botucatu-SP pela oportunidade oferecida para realização deste experimento.

À seção de Pós-graduação FMVZ-UNESP-Botucatu-SP, José Roberto, Maria e Patricia pela simpatia com que sempre me atenderam.

Aos meus animais de estimação Guria, Prenda (*in memorian*) e Piá. Cada dia que passa vocês me ensinam o real significado da palavra alegria.

A todas as pessoas de forma direta ou indireta que contribuíram para a execução desta dissertação.

“Quer você ache que pode, quer ache que não pode, de um jeito ou de outro você está certo.”

Henry Ford (1863-1947)

LISTA DE TABELAS

- 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 (M4) horas, teste de exaustão 24 horas 120 (M2) e 240 (M3) minutos e 48 horas 120 (M5) e 240 (M6) minutos nos grupos GGL, GGpL e GEL..... 31
- TABELA 2: Médias \pm desvio padrão dos parâmetros de cinética espermática (velocidades) avaliados no sistema computadorizado do sêmen ovino pré-refrigeração (M0), pós-refrigeração 24 (M1) e 48 (M4) horas, teste de exaustão 24 horas 120 (M2) e 240 (M3) minutos e 48 horas 120 (M5) e 240 (M6) minutos nos grupos GGL, GGpL e GEL..... 33
- TABELA 3: Médias \pm desvio padrão dos parâmetros de cinética espermática avaliados no sistema computadorizado do sêmen ovino pré-refrigeração (M0), pós-refrigeração 24 (M1) e 48 (M4) horas, teste de exaustão 24 horas 120 (M2) e 240 (M3) minutos e 48 horas 120 (M5) e 240 (M6) minutos nos grupos GGL, GGpL e GEL..... 34
- TABELA 4: 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 (M4) horas, teste de exaustão 24 horas 120 (M2) e 240 (M3) minutos e 48 horas 120 (M5) e 240 (M6) minutos nos grupos GGL, GGpL e GEL..... 36

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL	5
2.2. SÊMEN FRESCO E REFRIGERADO	6
2.3. CONSTITUINTES DOS MEIOS DILUENTES	8
2.4. A GEMA DE OVO E AS LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE	9
2.4.1. Gema de ovo e a criopreservação do sêmen	9
2.4.2. Extração das lipoproteínas de baixa densidade	10
2.4.3. Lipoproteínas de baixa densidade e a criopreservação do sêmen	11
2.5. ANÁLISE DO SÊMEN	14
2.5.1. Análise computadorizada do sêmen (CASA).....	15
2.5.2. Morfologia espermática	16
3. OBJETIVO	18
3.1. OBJETIVO ESPECÍFICO	18
4. HIPÓTESE	19
5. MATERIAL E MÉTODO	20
5.1. LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAIS	20
5.2. ANIMAIS EXPERIMENTAIS	20
5.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	20
5.4. CONFECÇÃO DOS MEIOS DILUENTES	21
5.4.1. Purificação da gema de ovo	22
5.4.2. Extração das lipoproteínas de baixa densidade	23
5.5. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	24
5.5.1. Colheita e diluição do sêmen.....	24
5.5.2. Refrigeração do sêmen	25
5.5.3. Teste de exaustão	26
5.5.4. Análises espermáticas	26
5.5.4.1. Análise computadorizada da cinética espermática	26
5.5.4.2. Análise da morfologia espermática.....	27
5.5.4.3. Análise da integridade das membranas plasmática.....	27
5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	28

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
7. IMPLICAÇÕES.....	40
8. CONCLUSÕES.....	41
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
10. TRABALHO CIENTÍFICO.....	54
11. ANEXO I.....	71
11.1. MEIO PARA REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN	71
11.2. SOLUÇÃO DE X-CELL® (IMV Technologies (IMV), França).	72
11.3. SONDAS FLUORESCENTES DIACETATO DE CARBOXIFLUORESCÉINA E IODETO DE PROPÍDIO (HARRISON e VICKERS, 1990).....	73
11.4. SOLUÇÃO DE PBS E SOLUÇÃO DE GLUTARALDEÍDO a 0,2% (BARTH e OKO, 1989).	74
11.5. “HAMILTON THORNE SETUP FOR IVOS-12”.....	75

RESUMO

FALLEIROS, M. B. Avaliação comparativa do sêmen ovino refrigerado nos meios Glicina-Gema-Leite, Glicina-Gema purificada-Leite e Glicina-Extrato de Lipoproteínas de baixa densidade-Leite. Botucatu, 2011. p.87 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Objetivou-se estudar os efeitos do extrato de lipoproteínas de baixa densidade sobre o sêmen ovino durante a refrigeração. Vinte amostras de 5 carneiros foram refrigeradas por 24 e 48 horas na geladeira para refrigeração Minitube, nos meios diluentes Glicina Gema Leite, Glicina Gema purificada Leite e Glicina Extrato Leite e submetidas a teste de exaustão (37°C/240 minutos) sendo avaliados *in vitro* por meio das análises da cinética espermática computadorizada, da morfologia e da integridade da membrana plasmáticas. Após 24 e 48 horas de refrigeração, os meios Glicina Gema purificada Leite e Glicina Extrato Leite apresentaram resultados superiores ao meio Glicina Gema Leite, após o teste de exaustão, para o parâmetro de integridade de membrana plasmática. Para a integridade de acrossomo o meio Glicina Gema purificada Leite foi superior ($P<0,05$) em relação ao meio Glicina Gema Leite durante o teste de exaustão. Nos demais parâmetros estudados de cinética espermática e morfologia (cauda dobrada), não houveram diferenças significativas ($P>0,05$) entre os meios. Entre os momentos, houve diferença significativa ($P<0,05$) em todos os meios durante o teste de exaustão.

Palavras chave: Lipoproteínas de baixa densidade; ovino; sêmen refrigerado.

ABSTRACT

FALLEIROS, M. B. Comparative evaluation of ram semen cooled in the extenders Glycine- Egg yolk-Milk, Glycine-Egg yolk purified-Milk and Glycine-Extract of Low Density Lipoproteins-Milk. Botucatu, 2011. p.87 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

The objective was to study the effects of extract of low density lipoproteins on ovine semen during cooling. Twenty samples of five sheep were chilled for 24 and 48 hours in the refrigerator for cooling Minitube, in extenders Glycine Yolk Milk, Glycine purified Yolk Milk and Glycine Extract Milk and tested to exhaustion (37 ° C/240 min) were evaluated in vitro by means of computerized analysis of sperm kinetics, morphology and plasma membrane integrity. After 24 and 48 hours of refrigeration, the extenders Glycine purified Yolk Milk and Glycine Extract Milk showed better results than extender Glycine Yolk Milk, after the exhaustion test, for the parameter of membrane integrity. For the integrity of the acrosome through Glycine purified Yolk Milk was higher ($P < 0.05$) than Glycine Yolk Milk during the exhaustion test. In other parameters of sperm kinetics and morphology, there were no significant differences ($P > 0.05$) among extenders. Between times, significant difference ($P < 0.05$) in all extenders during the exhaustion test.

Key Words: low density lipoprotein; ram; cooling semen.

1. INTRODUÇÃO

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

Neste contexto destacam-se as biotecnologias voltadas à reprodução assistida, entre elas a indução e sincronização do estro, bem como o emprego da inseminação artificial. Com a utilização dessas biotécnicas torna-se possível o aproveitamento total do potencial produtivo dos animais, como por exemplo, produzir até três gestações num período de dois anos, aumentando assim o ganho do produtor.

Para a maximização do desempenho dos machos, as biotécnicas envolvendo o sêmen vêm se aprimorando, levando a utilização de animais superiores em um maior número de matrizes no período de cobertura. Dentre as biotecnologias do sêmen, visando à produção de carne, a inseminação artificial cervical superficial utilizando-se sêmen *in natura*, ou diluído é de extrema importância, pois não requer utilização de equipamentos sofisticados e treinamento técnico para a sua realização.

A inseminação artificial cervical superficial abre a possibilidade de associação com outra biotecnologia importante, a refrigeração do sêmen, que visa o armazenamento e transporte do sêmen a longas distâncias para posterior utilização.

Várias técnicas de refrigeração foram desenvolvidas tanto em refrigeradores estacionários como em sistemas de refrigeração e transporte, que possibilitaram uma maior utilização do sêmen em todas as espécies. Com isso, surgiu a necessidade de aprimorar e testar meios diluidores para preservar, por um maior período de tempo, as características dos espermatozoides e sua capacidade fertilizante.

Neste contexto, propõe-se avaliar a utilização do extrato de lipoproteínas de baixa densidade (LBD) em substituição a gema de ovo, como constituintes de meio diluidor utilizado na refrigeração do sêmen ovino.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Sistemas modernos de produção de ovinos estão associados com vários níveis de intensificação, incluindo o manejo reprodutivo. Um passo essencial para o incremento do desempenho reprodutivo está na redução entre o tempo das parições. Para atingir esse objetivo, as biotecnologias de refrigeração e criopreservação do sêmen e inseminação artificial associadas às de sincronização e indução de estro, tornaram-se práticas populares nos sistemas modernos de criação (KARAGIANNIDIS et al., 2001).

2.1. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Dentre as biotecnologias da reprodução a inseminação artificial (IA) com sêmen fresco, recém coletado e diluído, é a mais simples, permitindo uma difusão rápida do material genético no rebanho e entre rebanhos. A IA a fresco, bem como a congelação do sêmen, permitem a exploração do maior potencial produtivo de um macho, pois este pode ser utilizado para fecundar um número muito superior de fêmeas, quando comparadas a monta natural. Outra grande vantagem é o controle de doenças que podem ser transmitidas pela monta natural.

Nas ovelhas os primeiros ensaios sobre IA aconteceram no início do século XX por Ivanov que analisou meios diluentes e a reprodução assistida, visando desenvolver um método prático de inseminação nas fazendas. Depois da Primeira Guerra Mundial, com estudos mais intensivos dirigidos por Milovanov, a IA com sêmen fresco e refrigerado passou a ser utilizada em larga escala nos programas reprodutivos dos ovinos (SALAMON & MAXWELL, 2000).

Concomitante com a evolução da IA com sêmen fresco, houve o desenvolvimento de técnicas relacionadas à preservação do material seminal, seja através da refrigeração ou da congelação (MAXWELL & WATSON, 1996). Para Watson (2000) e Naqvi et al., (2001), a preservação do germoplasma pode ser a maior contribuição na manutenção da biodiversidade, permitindo o amplo

uso de carneiros superiores para a IA, a conservação *ex situ* destes, viabilizando questões como a distância entre o local da colheita e o da inseminação.

Maxwell & Watson (1996), Naqvi et al., (1998) e Yoshida (2000) relataram uma limitação na inseminação artificial em ovinos com sêmen congelado devido à baixa fertilidade com o uso da técnica intracervical. Este fato pode ser atribuído à complexidade da anatomia cervical das ovelhas, devido às pregas cartilaginosas serem dispostas em diferentes planos e posições, dificultando a inseminação (NAQVI et al., 2001). Com o advento da IA por laparoscopia, houve um incremento nos índices de fertilidade, e um aumento do número de animais inseminados (PERKINS et al., 1996).

Apesar dos resultados mais favoráveis, comercialmente ainda há um fator limitante no uso da IA por laparoscopia devido aos altos custos do equipamento e da sincronização do estro, além da necessidade de um Médico Veterinário apto a sua utilização (MAXWELL & WATSON, 1996; WATSON, 2000). Nos bovinos, o sucesso da IA tem sido atribuído a disponibilidade de vários meios diluentes e ao fato do sêmen ser depositado diretamente no útero por via cervical durante a inseminação (UPRETI et al., 1995), podendo ser obtidas taxas de concepção comparáveis ou mesmo melhores que a monta natural (WATSON, 2000). Já em ovinos, apesar de estarem disponíveis grande quantidade de diluentes, ainda se verifica uma redução da qualidade do material seminal após ser criopreservado, que aliado a dificuldade de deposição intrauterina do sêmen levam a resultados menos expressivos (UPRETI et al., 1995).

2.2. SÊMEN FRESCO E REFRIGERADO

O sêmen refrigerado ovino quando comparado ao fresco apresenta menores porcentagens de motilidade e de integridade morfológica dos espermatozoides, acompanhadas por baixa sobrevivência no trato genital da fêmea, reduzindo a fertilidade e aumentando a morte embrionária. Entretanto, estas lesões espermáticas são menos pronunciadas no sêmen diluído e refrigerado que no congelado/descongelado (MAXWELL & SALAMON, 1993).

Com isso, o uso do sêmen a fresco ou refrigerado durante um curto espaço de tempo após a colheita, pode ser uma alternativa ao sêmen congelado na prática da inseminação (LÓPEZ et al., 1999).

Os principais métodos de preservação do sêmen ovino em estado líquido, são a refrigeração a temperaturas reduzidas de 0 a 5°C ou de 10 a 15°C (PAGANINI FILHO, 1999; SALAMON & MAXWELL, 2000). Para Yoshida (2000), há uma diminuição na taxa de fertilidade do sêmen independentemente da temperatura de armazenamento (5 ou 15°C) sendo, segundo relatos de Salamon & Maxwell (2000), de 10 a 35% ao dia. Para estes autores, uma das principais razões deste declínio seria a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Deve-se ter o cuidado com a rápida redução para baixas temperaturas, principalmente dentro da faixa de 20°C a 0°C devido à susceptibilidade ao choque térmico, causador de mudanças irreversíveis aos espermatozoides (MAXWELL & SALAMON, 1993; SALAMON & MAXWELL, 1995; WATSON, 2000).

Durante o resfriamento, os lipídios da membrana passam pela fase de transição, caracterizada pela reorganização das cadeias hidrocarbonadas, modificando a membrana de líquida-cristalina para o estado de gel. Neste processo ocorre um aumento excessivo da peroxidação lipídica, contribuindo para aumentar os danos celulares, causando a perda de motilidade e da capacidade fertilizante do sêmen, bem como o aumento da permeabilidade celular (PARKS, 1997).

O aumento da permeabilidade celular ocorre devido a um rearranjo anormal das proteínas integrais, que passam a permitir o transporte rápido de substâncias, a perda de numerosos componentes de membrana e intracelulares, como ATP, ácidos nucleicos, fosfolipídios, enzimas, potássio e magnésio, e diminuição da capacidade de regular a concentração de cálcio intracelular. O choque também prejudica a glicólise anaeróbica e o metabolismo aeróbico, limitando a capacidade do espermatozoide de gerar ATP, necessário para motilidade e outras funções celulares (WATSON, 1995; PARKS, 1997). Para isto, a composição do meio de congelação é de fundamental importância para se obter adequada taxa de sobrevivência.

2.3. CONSTITUINTES DOS MEIOS DILUENTES

O sêmen ovino *in natura* não possui antioxidantes, sendo geralmente adicionados aos diluentes antioxidantes sintéticos, como ácidos graxos insaturados, gema de ovo, plasma seminal ou citrato de sódio para inibir a peroxidação de fosfolipídios espermáticos (SALAMON & MAXWELL, 1995).

A gema de ovo preserva a motilidade e a integridade de membranas espermáticas, devido a sua ação protetora promovida pela fração fosfolipídica contra o choque térmico (MAXWELL & SALAMON, 1993; SALAMON & MAXWELL, 2000). Ela atua também com tampão osmótico, conferindo maior resistência às células tanto para meios hipotônicos quanto para hipertônicos (JONES & MARTIN, 1973). Mesmo algumas vezes sendo parcialmente substituída por outras substâncias, a gema de ovo continua sendo um importante componente para criopreservação do sêmen de ovinos (SALAMON & MAXWELL, 1995).

Além da gema de ovo, outras substâncias como açúcares e o leite tem fundamental importância na manutenção das células espermáticas. Os açúcares, como a glicose e a frutose, são adicionados aos meios diluidores atuando no aumento da osmolaridade do meio. Por não serem capazes de penetrar na célula, acabam balanceando o gradiente osmótico (MOUSTACAS et al., 2011). Além disso, tanto a glicose como a frutose são utilizadas como substrato para a produção de ATP pela célula espermática, sendo que a glicose é metabolizada preferencialmente, devido à maior afinidade com a enzima hexoquinase, responsável pela primeira etapa da glicólise (MANN, 1964).

O leite é isotônico ao sêmen e contém muitos compostos favoráveis a manutenção da viabilidade espermática. A eficiência dos meios diluentes a base de leite tem sido atribuída à sua composição proteica que atuaria como um tampão, além da sua propriedade quelante frente a metais pesados (WATSON, 1976; MAXWELL & SALAMON, 1993; SALAMON & MAXWELL, 2000). Salamon & Maxwell (2000) relataram ainda, uma proteção parcial contra a redução da temperatura durante o processo de refrigeração do sêmen.

2.4. A GEMA DE OVO E AS LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE

2.4.1. GEMA DE OVO E A CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN

A gema de ovo e o glicerol são elementos prevalentes na maioria dos diluidores de congelação, que têm ainda em suas composições um sistema tampão (Citrato, Tris, Tes Hepes, Mop, Mes, Pipes), açúcares (monossacarídeos - glicose, manose, frutose; dissacarídeos – sacarose, lactose), antibióticos e diversos aditivos, a exemplo dos antioxidantes (SALAMON & MAXWELL, 2000).

É possível obter-se sucesso na congelação do sêmen sem adição de glicerol, sendo necessária à utilização de concentrações em torno de 30% de gema de ovo. O choque térmico pode ser prevenido pela utilização rotineira da gema de ovo na proporção de 15 a 30% das soluções de criopreservação de sêmen de mamíferos. Com mais frequência, as concentrações utilizadas têm variado de 5 a 20% e sua redução é de grande interesse (SALAMON & MAXWELL, 2000).

A utilização de produtos biológicos, a exemplo da gema de ovo, na formulação dos meios de congelação, representa um risco constante de contaminação por bactérias, especialmente *Mycoplasma sp*, que se constituem em uma possível fonte de endotoxinas capazes de danificar a capacidade fertilizante dos espermatozoides. Conseqüentemente, a maioria dos países teme o risco da introdução de doenças exóticas através de produtos à base de gema de ovo. Assim, um substituto quimicamente definido e livre de patógenos de origem animal seria uma alternativa para substituir constituintes biológicos (WATSON, 2000).

Há interesse em se definir quais componentes, presentes na gema, apresentam propriedades crioprotetoras às células espermáticas. Em diversos estudos indica-se serem as lipoproteínas de baixa densidade que conferem proteção à membrana durante o processo de congelação/descongelação (PACE & GRAHAM, 1974; FOULKES, 1977; WATSON, 1981b; GRAHAM & FOOT, 1987).

Uma hipótese envolve as proteínas do plasma seminal (BSPs). Após a ejaculação, os espermatozoides bovinos são brevemente expostos às principais proteínas do plasma seminal, que cobrem a membrana do espermatozoide. Essa ligação interage com as lipoproteínas de alta densidade (LAD), resultando no sequestro de fosfolipídios e colesterol da membrana plasmática e, conseqüentemente, numa desestabilização com modificação da sua composição lipídica ou capacitação espermática (AZEVEDO, 2006). As lipoproteínas de baixa densidade se ligam as proteínas do plasma seminal, evitando a perda de fosfolipídios e colesterol, aumentando a estabilidade da membrana, além disso as LBD promovem a entrada de fosfolipídios e colesterol para a membrana dos espermatozoides. Desta forma, confere a célula espermática uma maior resistência ao choque térmico (BERGEROM et al., 2004).

2.4.2. EXTRAÇÃO DAS LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE

Pace e Graham (1974) desenvolveram um método para separação das Lipoproteínas utilizando ultracentrifugação de gradiente de densidade. Era feita uma ultracentrifugação a 90.000xg por 24 horas. Apesar do método conferir uma excelente pureza do extrato, é extremamente trabalhoso e resulta em pequena quantidade de Lipoproteína, impossibilitando a utilização dessa técnica em escala industrial.

Moussa et al., (2002), desenvolveram um método fácil para a extração das LBD da gema de ovo, atingindo 97% de pureza. Nele, os ovos são quebrados manualmente, separando-se a clara da gema. Cada gema é colocada sobre um papel filtro para remoção da chalaça e traços de clara aderida à membrana vitelínica. A membrana da gema é rompida e seu conteúdo colocado em um Becker e resfriado em gelo. Separa-se a fração plasmática da gema, segundo método descrito por McBee e Cotterill (1979), com a gema de ovo sendo diluída 1:1 com solução salina isotônica (0,17 M NaCl) e misturada por 1h. A seguir, a gema é centrifugada por 45 minutos à 4°C por 10.000xg e o sobrenadante centrifugado novamente para remover completamente os grânulos. O plasma da gema do ovo é misturado com o sulfato de amônia a 40% por 1h. O pH é fixado e

mantido em 8,7 e à temperatura de 4°C, em seguida centrifugado a 10.000xg por 45 minutos à 4°C, sendo o sobrenadante final rico em LBD, coletado para ser dialisado por um período mínimo de 6 horas com água destilada, para eliminação do sulfato de amônia. Após a diálise, o extrato de LBD é centrifugado novamente a 10.000xg por 45 minutos e o sobrenadante residual, rico em LBD foi coletado.

O método preconizado por Moussa, et al. (2002) tem sido amplamente utilizado na obtenção das frações de lipoproteína de baixa densidade, obtidas a partir da gema de ovo (AMIRAT et al., 2004; CORCINE et al., 2004; BENCHARIF et al., 2008; NEVES, 2008; VARELA Jr et al., 2009; TONIETO et al., 2010; MOUSTACAS et al., 2011; HU et al., 2011).

As lipoproteínas de baixa densidade representam 2/3 dos sólidos totais presentes na fração solúvel da gema de ovo. A extração descrita por Moussa et al. (2002) permite obter-se lipoproteínas com densidade de 0,982 g/ml, contendo 83 a 89% de lipídeos e 11 a 17% de proteínas. Desses lipídeos, aproximadamente 69% são triglicerídeos, 26 % são fosfolipídios e 5% colesterol.

A substituição parcial ou total da gema de ovo, pelo extrato de LBD nos meios diluidores para a criopreservação do sêmen dos animais domésticos, apresentam resultados iguais ou superiores, quanto aos parâmetros espermáticos qualitativos pós-descongelamento (AMIRAT et al., 2004; CORCINE et al., 2004; AHMAD et al., 2008; BENCHARIF et al., 2008; NEVES, 2008; VARELA Jr et al., 2009; TONIETO et al., 2010; MOUSTACAS et al., 2011).

2.4.3. LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE E A CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN

Pace e Graham (1974) congelaram sêmen de bovinos com meios contendo gema de ovo integral ou suas frações de lipoproteína de alta e baixa densidade, concluindo que o extrato de LBD confere a mesma ação crioprotetora que a gema integral.

Graham e Foot (1987) sugeriram que as lipoproteínas de baixa densidade se aderem à membrana espermática durante o processo de resfriamento e congelamento, preservando sua integridade. Essas LBD, da gema de ovo, atuam na superfície da membrana, restaurando a perda de fosfolipídeos e,

aparentemente, induzindo a alteração transitória de sua composição, prevenindo a ruptura da membrana plasmática.

Demaniowicz e Strezek (1996) propuseram que a fração da gema do ovo, composta por LBD, é a grande responsável pela resistência das células espermáticas ao choque térmico e pelo incremento da motilidade após a criopreservação em sêmen de javali.

Moussa et al., (2002), substituindo a gema de ovo pelo extrato lipídico de baixa densidade obtiveram melhores resultados na motilidade e nas características dos movimentos após descongelação em sêmen bovino. Foi utilizado o diluente Triladyl[®] como controle e base para substituição da gema do ovo, pelo extrato em diferentes concentrações, além do diluente Biociphos[®] Plus como segundo controle. No primeiro experimento os autores testaram a substituição da gema integral (20%) pelo extrato LBD nas concentrações de: 2,5, 5, 10, 15 e 20%. Concluíram que a concentração ideal de substituição estaria entre 5 e 10% de LBD. Assim, realizaram novo experimento utilizando as concentrações de: 5, 6, 7, 8, 9 e 10% determinando que a concentração ideal de extrato de LBD é de 8%. Nessa concentração obtiveram melhor resultado de motilidade com relação ao controle com diluente Triladyl[®], não observando diferença do controle com Biociphos[®] Plus. Em ambos experimentos os parâmetros espermáticos avaliados foram a motilidade e características de movimento.

Gil et al. (2003), comparando o efeito sobre os parâmetros espermáticos durante a refrigeração a 5°C, entre um meio a base de leite contendo 5% (M5), 10% (M10), 15% (M15) e 20% (M20) de gema de ovo, glicerotizado a 15°C com um meio comercial (Bioexcell[®] - IMV, L'Aigle, França), observaram que não houve diferença significativa no aumento da concentração de gema de ovo acima de 10%, nas motilidades total/progressiva (M5 – 82/66%, M10 – 81/62%, M15 – 84/61% e M20 – 82/61%).

Já Amirat et al., (2004), também obtiveram com sêmen bovino, melhores resultados quando comparado a um diluidor comercial. Foi utilizado como controle o diluente Optidyl[®] (Biovet, França) e preparado diluente com 8% de LBD. Testaram motilidade, integridade de membrana, integridade do acrossomo e

fertilidade *in vitro*. Houve diferença significativa ($P < 0,05$) na motilidade e fertilidade *in vitro*, o que não ocorreu para os demais parâmetros.

Corcine et al., (2004) também obtiveram resultados melhores com sêmen canino refrigerado, utilizando o diluente Tris-glucose com 20% de gema de ovo como controle, em comparação ao Tris-glucose com LDL a 6, 8 e 10%. Os resultados também foram melhores com relação à integridade de membrana quando comparada ao diluente com gema de ovo.

Ahmad et al., (2008), obtiveram melhores resultados de motilidade e integridade de membrana com sêmen caprino criopreservado nas análises pós-descongelamento. Utilizaram diferentes concentrações de glutamina e LDL, substituindo a gema de ovo, chegando à concentração ideal dos dois componentes.

Bencharif et al., (2008), compararam a adição de LBD em seis diferentes concentrações (4, 5, 6, 7, 8 e 10%) ao meio controle contendo 20% de gema de ovo. Testaram parâmetros de motilidade, integridade de acrossoma e fertilidade *in vivo*. Obtiveram diferenças significativas em todos os parâmetros quando comparado ao controle. No teste de fertilidade *in vivo* foram inseminadas seis cadelas da raça Beagle e todas ficaram prenhes. Ainda foi definida a concentração ideal de LBD em 6% por apresentar os melhores resultados.

Silva et al., (2008), trabalharam com lipoproteínas de baixa densidade em substituição à gema de ovo no resfriamento do sêmen de ovinos, nas concentrações de 5, 10 e 20%. Não foram observados efeitos benéficos das LBD sobre a motilidade espermática pós-resfriamento, porém a integridade de membrana foi preservada de forma semelhante ao meio com 16% de gema de ovo.

Varela Jr et al., (2008), verificaram o efeito da adição de LBD, na composição de diluentes utilizados para congelamento e resfriamento a 5°C do sêmen canino. No primeiro experimento utilizaram como controle o Tris-glicose a 20% (gema integral) e substituíram a gema pela LBD em diferentes concentrações (6, 8 e 10%), avaliando motilidade, integridade de membrana e morfologia do sêmen resfriado as 24, 48, 72 e 96 horas. No segundo experimento utilizaram os mesmos parâmetros do primeiro, avaliando o sêmen após

descongelamento. Obtiveram diferença significativa com relação ao controle para os parâmetros de motilidade e integridade de membrana, não observando diferença com relação à morfologia, nos dois experimentos.

Moustacas et al., (2011), observaram em sêmen ovino que as LBD são capazes de manter a viabilidade das células espermáticas após a criopreservação, da mesma forma que a gema total, utilizando como base o triglicose-gema, pois não observaram diferença significativa para os parâmetros estudados como motilidade, integridade de membrana e morfologia espermática.

Hu et al., (2011), testaram a substituição da gema de ovo por lipoproteína de baixa densidade na concentração de 7, 8 e 9%, em meios diluidores para bovinos, fazendo análise pós-descongelamento. No meio com 8% de LBD os espermatozoides apresentaram melhores parâmetros de motilidade, integridade acrossomal e de membrana, quando comparado ao meio contendo 20% de gema de ovo.

2.5. ANÁLISE DO SÊMEN

A avaliação *in vitro* da qualidade do sêmen pode ser usada para verificação do potencial fertilizante do sêmen ou do reprodutor, servindo não apenas para pesquisa da fisiologia espermática e de sua preservação, mas também para programas de inseminação artificial (LÓPEZ et al., 1999). Essa avaliação tem por objetivo mostrar o estado estrutural ou funcional de alguns atributos espermáticos de uma forma prática e rápida, procurando estimar o grau de lesão causada pelo método de preservação ao longo do tempo (MOUSTACAS, 2009).

Motilidade, morfologia e concentração espermáticas são os parâmetros tradicionais mais simples a serem avaliados, porém estão longe de prever a real qualidade seminal (MOUSTACAS, 2009). Critérios mais sensíveis de aferição da motilidade e/ou lesões da membrana plasmática têm sido propostos como avaliações finais complementares (SOUSA, 2002). O desenvolvimento de tecnologias computadorizadas e as variedades de fluorocromos forneceram novas ferramentas de acesso à funcionalidade dos espermatozoides (YOSHIDA, 2000).

2.5.1. ANÁLISE COMPUTADORIZADA DO SÊMEN (CASA)

Tradicionalmente, a avaliação da motilidade depende de uma estimativa subjetiva, onde se utiliza um microscópio para visualizar a diferença da proporção entre espermatozoides com movimento e parados (SOUSA, 2002). É um método simples, rápido e barato, mas as variações podem ser de 30 a 60% dependendo do examinador e/ou laboratório onde se faz a análise (MOSES et al., 1994; MALMGREN, 1997).

Diversos sistemas de análise computadorizada do sêmen (CASA) têm sido desenvolvidas nas últimas décadas, com intuito de minimizar as falhas da análise subjetiva e aprofundar os estudos acerca da cinética espermática (MALMGREN, 1997; TARDIF et al., 1997). Apesar do seu alto custo, o CASA oferece automação, rapidez, objetividade e repetibilidade nas avaliações, possibilitando detalhar melhor a qualidade do sêmen analisado, fornecendo informações adicionais sobre as características de movimento dos espermatozoides (MOSES et al., 1994; MALMGREN, 1997; YOSHIDA, 2000).

Neste sistema os espermatozoides são identificados em imagens sucessivas, que permitem estabelecer sua trajetória e diversas velocidades de deslocamento, além de características específicas do movimento espermático, como linearidade, amplitude de deslocamento lateral da cabeça, entre outros (MALMGREN, 1997).

Dentre os parâmetros mais utilizados no sistema CASA, estão: Motilidade Total (MT-%), como percentual total de células móveis; Motilidade Progressiva (MP-%), percentual de espermatozoides com movimento progressivo; Velocidade Curvilínea (VAP- $\mu\text{m/s}$), sendo o comprimento geral da trajetória do espermatozoide/tempo; Velocidade Progressiva (VSL- $\mu\text{m/s}$), comprimento da trajetória considerando-a como uma reta entre o ponto inicial e o final/tempo; Velocidade curvilínea (VCL- $\mu\text{m/s}$), como distância total entre cada posição do centro da célula durante a captura da imagem/tempo; Amplitude de Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH- μm); Frequência de Batimentos Flagelares (BCF-Hz); Retilinearidade (STR-%), relação entre o espaço percorrido pelo espermatozoide

e sua trajetória real ($VSL/VAP \times 100$) e a Linearidade (LIN-%), comparação entre os trajetos retos e curvilíneos ($VSL/VCL \times 100$) (SOUSA et al., 1999).

A validação destas informações dependerá de uma preparação cuidadosa da amostra e um ajuste adequado do equipamento, visando identificar corretamente células móveis, imóveis e outras partículas, geralmente estáticas, que não são espermatozoides, obtendo-se resultados seguros nas análises (MOSES et al., 1994; TARDIF et al., 1997).

2.5.2. MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

A morfologia espermática é um importante parâmetro para se analisar a qualidade do sêmen (MALMGREN, 1997). Em sua determinação é possível observar alterações na conformação celular, as quais podem estar diretamente correlacionadas à baixa fertilidade de um reprodutor (BARTH & OKO, 1989). Para Garner (1997) ela é um dos critérios mais seguros na avaliação a campo, pois sofre pouca influência do processo de colheita.

Diversas técnicas podem ser adotadas para avaliação morfológica, através do emprego de grande variedade de corantes ou pela técnica de preparação úmida. Esta tem a vantagem de evitar a interação entre célula e reagente, permitindo uma observação precisa da estrutura celular. Porém apresenta uma desvantagem, pois necessita um microscópio com maiores recursos e, portanto mais caro (SOUSA et al., 1999).

A integridade de membrana espermática é essencial à proteção, funcionamento celular e fundamental ao processo de fertilização, sendo um importante parâmetro de avaliação (MALMGREN, 1997; PAGANINI FILHO, 1999). Segundo López et al. (1999), as principais causas de lesões nas membranas espermáticas no processamento do sêmen ovino são decorrentes da manipulação do sêmen, em temperaturas de 35 a 37°C, da redução da temperatura de 37°C para 5°C, devido ao choque térmico e/ou durante sua incubação a 5°C.

As alterações morfológicas da membrana dos espermatozoides ovinos são provocadas pela desorganização dos lipídios, que ocorre durante a fase de refrigeração, entre as temperaturas de 30 e 5°C (OLLERO et al., 1998; WATSON,

2000), estando associadas às mudanças na permeabilidade e na indução da fusão da membrana (HOLT & NORTH, 1986), prejudicando a função das proteínas de membrana que são necessárias à integridade estrutural celular ou ao metabolismo iônico, resultando em uma baixa viabilidade espermática (OEHNINGER et al., 2000).

Para Maxwell & Watson (1996), a viabilidade dos espermatozoides analisada através da motilidade foi maior do que sua real capacidade de fertilização, em decorrência das alterações nas membranas celulares durante a refrigeração e estocagem. Diversos métodos de avaliação da integridade de membrana utilizam a associação de sondas fluorescentes (VALCÁRCEL et al., 1994; MALMGREN, 1997; LÓPEZ et al., 1999; NEILD et al., 1999; CELEGHINI et al., 2007). Essas sondas funcionam como substratos, que quando ligados a compostos ou regiões específicas das células, emitem colorações fluorescentes, que podem ser observadas sob microscopia de epifluorescência (SOUSA, 2002).

Uma variedade de sondas tem sido utilizada na avaliação dos componentes celulares, entre elas o diacetato de carboxifluoresceína em combinação com o iodeto de propídio (MALMGREN, 1997; NEILD et al., 1999), que se baseiam na retenção de corantes fluorogênicos mediante a integridade das membranas (NEILD et al., 1999).

Fonseca et al. (1992) referiram a importância de testes complementares como os testes de exaustão na avaliação do comportamento das células espermáticas. Porém, a real capacidade funcional dos espermatozoides somente é avaliada por sua capacidade de fertilização (MAXWELL & SALAMON, 1993).

3. OBJETIVO

Propor modificações metodológicas ao processo de preservação do sêmen ovino por refrigeração, visando alternativas à utilização da gema de ovo *in natura* em meios diluidores.

3.1. OBJETIVO ESPECÍFICO

Testar a eficiência da gema de ovo “purificada” através de centrifugação e diálise e do extrato de lipoproteínas de baixa densidade (LBD) na substituição do constituinte gema de ovo, no meio diluidor Glicina Gema Leite, para a refrigeração de sêmen ovino por 24 e 48 horas.

4. HIPÓTESE

A gema de ovo “purificada” através da centrifugação (10.000xg) e diálise ou o extrato de lipoproteínas de baixa densidade podem substituir a gema de ovo *in natura* no meio diluidor Glicina Gema Leite, na refrigeração do sêmen ovino, conferindo incremento aos parâmetros espermáticos de cinética e morfologia.

5. MATERIAL E MÉTODO

5.1. LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL

O experimento foi conduzido no Laboratório de Estudos em Biotecnologia da Reprodução de Ovinos e Caprinos na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu – SP (latitude 22° 53' S, longitude 48° 29' W), durante dois períodos. De julho a outubro de 2010 foram realizados os procedimentos para extração e testes preliminares das lipoproteínas de baixa densidade (LBD). No período de novembro a dezembro de 2010 foram realizadas as coletas e análises de refrigeração do sêmen.

5.2. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram selecionados por meio de exame andrológico cinco carneiros da raça Dorper com idade entre um e quatro anos. No momento da chegada todos os animais foram pesados (51 Kg a 100 Kg), vermifugados conforme seus pesos e mantidos, durante o período experimental, sob as mesmas condições de instalações, alimentação e manejo. Continuamente os reprodutores eram avaliados para acompanhamento da manutenção do estado físico e certificação da higidez. A alimentação era composta por feno de tifton, triturado de “capim elefante” e ração de manutenção.

5.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Delineou-se utilizar dos cinco carneiros quatro colheitas de sêmen em vagina artificial. Cada uma das amostras de sêmen obtidas, após análise em suas características macro e microscópicas, eram diluídas na proporção final de 1×10^8 espermatozoides/100 μ L, nos três meios diluidores, constituindo-se assim os três tratamentos experimentais pareados com a seguinte denominação:

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

Meio GGpL – Fração diluída em meio Glicina Gema purificada Leite;

Meio GEL – Fração diluída em meio Glicina Extrato Leite.

Para cada tratamento eram constituídas duas alíquotas a fim de que uma fosse refrigerada por 24 horas e outra por 48 horas, perfazendo-se então seis alíquotas para cada uma das coletas.

Ao final do período de refrigeração (**24 ou 48 horas**), um conjunto de alíquotas representando cada um dos tratamentos, era destinado ao Teste de Exaustão com duração de 240 minutos.

Em cada uma dessas etapas o sêmen era avaliado quanto às características de cinética e morfologia espermáticas constituindo-se sete 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 24horas, ao início do teste de exaustão;

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

M3 – (Momento 3): após refrigeração por 24horas, e com 240 minutos do início do teste de exaustão;

M4 – (Momento 4): após refrigeração por 48horas, ao início do teste de exaustão;

M5 – (Momento 5): após refrigeração por 48horas, e com 120 minutos do início do teste de exaustão;

M6 – (Momento 6): após refrigeração por 48horas, e com 240 minutos do início do teste de exaustão.

5.4. CONFECÇÃO DOS MEIOS DILUENTES

Foram confeccionados três meios com base no diluente Glicina Gema Leite e isentos de glicerol (GONZALEZ et al., 1996) (Anexo I) 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 completa substituição do constituinte gema de ovo pela gema de ovo purificada na formulação (Anexo I) e meio Glicina Extrato Leite (GEL) pela completa substituição do constituinte gema de ovo pelo extrato de LBD na formulação (Anexo I).

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, após foram mecanicamente rompidas e o seu conteúdo coletado em um copo Becker mantido em gelo, formando um “pool” de aproximadamente 150 ml. Este “pool” foi dividido em 3 frações para confecção dos meios diluidores, Glicina Gema Leite (GGL) com gema *in natura*; meio com gema centrifugada/dialisada/centrifugada (GGpL); e meio com extrato das LBD (GEL).

5.4.1. 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 (0,17 M NaCl) e misturada por uma hora em um agitador vortex, e sob refrigeração a 4°C, sendo em seguida centrifugada (**1^acent.**) a 10.000xg por 45 minutos à 4°C e o sobrenadante centrifugado (**2^acent.**) novamente sob refrigeração por igual tempo e intensidade, para remoção completa dos grânulos. Depois das duas centrifugações o sobrenadante, livre de grânulos, foi colocado para ser dialisado por um período mínimo de 8 horas tendo como eluente a água destilada, em reservatório de troca de 1000mL, 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, peso molecular de 12.000-16.000 e porosidade de 25 angstroms (INLAB Diagnóstica – Cód. 133 – Diadema – SP). Após a diálise foi realizada nova centrifugação (**3^acent.**) por 45 minutos a 10.000xg. sob refrigeração a 4°C. O sobrenadante purificado foi coletado e armazenado no freezer de -20°C em tubos do tipo Falcon de 50 mL, para posterior confecção do meio diluente (GGpL) para refrigeração.

5.4.2. EXTRAÇÃO DAS LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE

A extração das lipoproteínas de baixa densidade (LBD) foi realizada seguindo o método descrito por Moussa et al., (2002). Para isto a gema de ovo foi diluída 1:1 com solução salina isotônica (0,17 M NaCl) e misturada por uma hora em um agitador vortex, e sob refrigeração a 4°C., em seguida centrifugada (**1^acent.**) por 45 minutos à 4°C por 10.000xg e o sobrenadante centrifugado (**2^acent.**) novamente por igual tempo, intensidade e temperatura, para remoção completa dos grânulos. O plasma da gema de ovo foi misturado com o sulfato de amônia saturado a 40% por uma hora no mesmo sistema fechado e refrigerado (4°C) e o pH foi ajustado para 8,7 com solução de hidróxido de sódio (NaOH 0,1 M). Na sequência a solução foi centrifugada (**3^acent.**) a 10.000xg por 45 minutos à 4°C, sendo o sobrenadante coletado para ser dialisado por um período mínimo de 8 horas tendo como eluente a água destilada, em reservatório de troca de 1000mL, 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, peso molecular de 12.000-16.000 e porosidade de 25 angstroms. 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 a última centrifugação (**4^acent.**), novamente a 10.000xg por 45 minutos e o sobrenadante residual, rico em LBD foi coletado.

O extrato foi então acondicionado em tubos do tipo Falcon de 50 mL, armazenados em freezer de -20°C, para posterior confecção do meio diluente (GEL) para refrigeração.

5.5. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

5.5.1. COLHEITA E DILUIÇÃO DO SÊMEN

Foram realizadas quatro colheitas de sêmen de cada reprodutor por meio de vagina artificial a temperatura de 42°C, com copo coletor graduado pré-aquecido em estufa a 37°C utilizando-se uma ovelha contida. As colheitas foram realizadas em grupos de dois machos a cada dia sendo uma colheita em cada período (manhã/tarde). A cada duas colheitas era observado um intervalo mínimo de dois dias para manutenção dos parâmetros espermáticos.

Visando-se assegurar que as amostras estivessem dentro de padrões de cinética espermática adequados para a aprovação em prosseguir no experimento, foi feita uma diluição de 5 µL de sêmen em 500 µL de X-Cell[®] (Anexo I) aquecido em bloco térmico a 37°C (Kacil – Série nº: 0021-00). Nela foi realizada análise computadorizada da cinética espermática (Hamilton Thorn Motility Analyser - HTMA – IVOS 12 – Hamilton Research – Beverly, MA, USA), utilizando-se câmara de Makler a 37°C, onde apenas um campo foi avaliado.

O volume ejaculado foi determinado pela graduação do copo coletor e dez microlitros (µL) de sêmen foram diluídos em quatro mililitro (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 foram feitas as diluições do ejaculado à 37°C para posterior refrigeração. Cada uma das amostras de sêmen obtidas foi diluída na proporção final de 1×10^8 espermatozoides/100µL, nos três meios diluidores, sendo constituídas duas alíquotas para cada tratamento a fim de que uma fosse refrigerada por 24 horas e outra por 48 horas, perfazendo-se então seis alíquotas para cada uma das coletas. Cada alíquota foi colocada em microtubos de fundo cônico de polipropileno de 600µL, de tal maneira a ocupar a

capacidade máxima do microtubo e que nenhum espaço ficasse após o seu fechamento, que pudesse conter bolha de ar.

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® para realização das análises de cinética, morfologia e integridade da membrana plasmática dos espermatozoides **(M0)**.

5.5.2. REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN

Realizadas as análises, as alíquotas foram transferidas a um dispositivo (BICUDO et al., 1991) com capacidade para 12 microtubos (2 carneiros, 6 amostras cada um), que havia sido mantido em estufa a 37°C. O dispositivo, constituído por um recipiente retangular de alumínio, com capacidade para 600 mL de água, parede de 9 mm de espessura tendo no fundo uma manta de borracha com 2 mm. A utilização do dispositivo de refrigeração visou à realização de uma curva de resfriamento gradual, uma vez que a curva de resfriamento fica entre 0,5 e 0,2°C/minuto e leva de 40 a 100 minutos para atingir 17°C, mantendo o ritmo de declínio até atingir os 5°C. O conjunto foi então levado à geladeira Minitube, já previamente resfriada a 5°C, e mantido lá por 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. Após 48 horas de refrigeração o dispositivo era retirado com as alíquotas remanescentes para análise e teste de exaustão. Foram utilizados simultaneamente três dispositivos de refrigeração para realização do experimento.

Após 24 horas, avaliou-se uma alíquota de sêmen de cada grupo **(M1)**. Previamente, as amostras foram transferidas para microtubos de fundo cônico de polipropileno de 1,5 mL, aquecidas e estabilizadas em bloco térmico à 37°C, sendo acrescidos 30% do meio diluente original à alíquota inicial (PAGANINI FILHO, 1999) em cada tratamento (GGL, GGpL e GEL). A seguir realizou-se uma diluição de 1:20 (v:v) em solução X-Cell® para proceder-se as análises

computadorizada, morfologia espermática e integridade das membranas plasmáticas.

Os mesmos procedimentos e análises foram realizados após 48 horas de refrigeração (**M4**) com as alíquotas remanescentes na geladeira Minitube.

5.5.3. TESTE DE EXAUSTÃO

Após a retirada da geladeira Minitube e das análises pós-refrigeração, as alíquotas foram submetidas a um teste de exaustão no bloco térmico a 37°C durante 240 minutos (PAGANINI FILHO, 1999) sendo repetidas as análises computadorizada, morfologia espermática e integridade das membranas plasmáticas aos 120 minutos (**M2 e M5**) e 240 minutos (**M3 e M6**) da incubação. Esse teste foi feito tanto para as alíquotas refrigeradas por 24 horas, quanto às refrigeradas por 48 horas.

5.5.4. ANÁLISES ESPERMÁTICAS

5.5.4.1. Análise computadorizada da cinética espermática

A análise da cinética espermática foi realizada utilizando-se Hamilton Thorn Motility Analyser – HTMA (IVOS 12 – Hamilton Research – Beverly, MA, USA) em câmara de Makler a 37°C. Avaliaram-se em três campos, o primeiro escolhido pelo operador e outros dois aleatórios, os parâmetros (SOUSA et al., 1999):

- **MT** - Motilidade total (%);
- **MP** - Motilidade progressiva (%);
- **VAP** - Velocidade espermática ao longo de uma trajetória média ($\mu\text{m/s}$);
- **VSL** - Velocidade espermática considerando-se uma trajetória reta ($\mu\text{m/s}$);
- **VCL** - Velocidade espermática ao longo da trajetória real ($\mu\text{m/s}$);
- **ALH** - Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (μm);
- **BCF** - Frequência de batimentos flagelares (Hz);
- **STR** - Retilinearidade (%);

- **LIN** - Linearidade (%).

5.5.4.2. Análise da morfologia espermática

Para a análise da morfologia espermática foram diluídos 10 µL de sêmen obtidos em cada alíquota, em 500 µL de solução de Glutaraldeído a 0,2% aquecida a 37°C (Anexo I). A preparação foi acondicionada em microtubos de fundo cônico de polipropileno de 1,5 mL e estocados à temperatura entre 4 e 5 °C para posterior leitura. As análises foram realizadas em microscopia de contraste de fase com aumento de 1000x sob imersão através de preparações úmidas, colocando uma gota entre lâmina e lamínula e classificando duzentas células por preparação, de acordo com Blom (1973). Nas análises dos dados, enfocaram-se os espermatozoides com integridade de acrossomo (%) e aqueles com cauda dobrada (%).

5.5.4.3. Análise da integridade das membranas plasmática

A análise da integridade das membranas plasmáticas dos espermatozoides foi realizada pelo emprego da combinação das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (DIC) e iodeto de propídio (IP) (HARRISON e VICKERS, 1990). Foi preparada uma solução de trabalho adicionando a cada mililitro (mL) de solução salina, 20µL de formaldeído, 20µL de diacetato de carboxifluoresceína (DIC) e 10µL de iodeto de propídio (IP) (Anexo I). Para realizar a análise, 50µL da solução de trabalho foi depositado em microtubos de fundo cônico de polipropileno de 1,5 mL, em seguida foi acrescida uma alíquota de sêmen, ficando com uma concentração final de 10^7 espermatozoide/mL. Depois de incubado por no mínimo 8 minutos à temperatura de 30°C, 5µL dessa suspensão era depositado entre lâmina e lamínula e observado em aumento de 400x em microscópio de epifluorescência com filtro de excitação (BP) 450-490nm, espelho dicromático 510nm e filtro de supressão (LP) 515nm, onde 100 células/lâmina foram avaliadas e distribuídas percentualmente (%) nas seguintes classificações:

- Íntegros – acúmulo de DIC (cor verde) ao longo da cabeça e flagelo, sem acúmulo de IP;
- Lesados – acúmulo de IP (cor vermelha) ao longo de qualquer compartimento do espermatozoide, com ou sem acúmulo de DIC.

5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Como havia interesse em se comparar os tratamentos e os momentos (Teste de Exaustão), os dados foram analisados em um delineamento de blocos ao acaso, com três tratamentos (GGL, GGpL e GEL), 7 momentos (momento 0, momento 1, momento 2, momento 3, momento 4, momento 5 e momento 6) e 5 blocos (carneiros). Para a análise dos dados utilizaram-se as médias dos valores obtidos das quatro amostras. Como as variáveis apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey. O nível de significância utilizado foi de 5% (FISHER & BELLE, 1993). Foi utilizado o programa SPSS 16.0 para *software* Windows® (Statistical Package for Social Sciences, Inc., Chicago, IL, EUA).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A preocupação sobre o uso da gema de ovo nos meios diluidores tem sido debatida dentro dos centros de processamento de material genético de bovino e ovino, e nos últimos anos, vários estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de reduzir ou substituí-la por completo (BOUSSEAU et al., 1998; GIL et al., 2000). Por questões sanitárias debate-se o uso da gema de ovo nos meios de congelação, devido ao risco de contaminação bacteriana e por micoplasmas, introduzindo doenças exóticas e a produção de endotoxinas, que altera a estrutura da membrana, prejudicando a capacidade fertilizante dos espermatozoides (BOUSSEAU et al., 1998).

A gema de ovo é um componente comum na composição da maioria dos meios diluidores, protegendo as células espermáticas contra o choque térmico e osmótico durante o processo de criopreservação (MAXWELL & SALAMON, 1993; MAXWELL & WATSON, 1996; SALAMON & MAXWELL, 2000; BARBAS & MASCARENHAS, 2009).

Numerosos estudos têm demonstrado que existe uma grande variação na composição da gema de ovo quanto aos níveis de ácidos graxos, fosfolipídios e colesterol, devido à linhagem das galinhas, idade do ovo e nutrição das aves, resultando em diferenças na criopreservação (SU et al., 2008; SILVA et al., 2008).

A gema de ovo atua na superfície da membrana plasmática, restaurando a perda de fosfolipídios e, aparentemente, induzindo alteração transitória de sua composição, prevenindo a ruptura da membrana plasmática (FARSTARD, 1996). Os fosfolipídios que compõe a fração das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) da gema de ovo protegem o sêmen, especificamente durante o processo de refrigeração a 5 °C (MEDEIROS et al., 2002; MOUSSA et al., 2002).

No presente estudo os vinte ejaculados obtidos dos cinco carneiros apresentaram volume médio de $1,41 \pm 0,26$ mL e uma concentração média de $4,71 \pm 1,08 \times 10^9$ espermatozoides/mL. O sêmen utilizado para as avaliações encontrava-se dentro dos padrões esperados para a espécie, pois segundo Henry & Neves (1996) e Karagiannidis et al., (2000), o volume médio do ejaculado ovino

é de aproximadamente 0,7 a 2 ml e para Boundy (1993) o sêmen ovino de boa qualidade contem aproximadamente de $3,5$ a $6,0 \times 10^9$ espermatozoides/mL.

O procedimento de diluição na solução de X-Cell[®] fez-se necessário pela alta concentração espermática das amostras, que inviabiliza as análises computadorizada, devido ao cruzamento das trajetórias dos espermatozoides, e para facilitar a análise de integridade das membranas espermáticas, ratificando observações feitas em equinos por Varner et al., (1991), Malmgren (1997) e Ferreira (2000).

A escolha do número de campos para análise computadorizada baseou-se nos achados de Varner et al., (1991) que concluíram não haver diferença significativa entre avaliações de três a sete campos. Só o primeiro campo foi selecionador pelo observador, estando frequentemente perto da parte central da câmara de Makler. Os demais campos foram avaliados automaticamente pelo computador, seguindo as indicações de Anzar et al., (1991).

Os valores médios e respectivos desvios padrão das motilidades total (MT) e progressiva (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 em todos os momentos, são apresentados na Tabela 1.

Comparando-se os tratamentos (GGL, GGpL e GEL), a média da motilidade total (MT) não houve diferença significativa ($P > 0,05$) em nenhum dos momentos. Na comparação das médias de motilidade progressiva (MP) houveram 2 momentos (**M2** e **M4**) onde houve uma diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos. No **M2** (momento 2; teste de exaustão com 120 minutos) a média do tratamento GGpL (39,7%) foi superior ao tratamento controle GGL (21,5%) e igual ao tratamento GEL (28,9%). No **M4** (momento 4) pós 48 horas de refrigeração a média do tratamento GEL (49,2%) foi superior a do tratamento GGL (31,2%) e igual a do tratamento GGpL (41%).

Na refrigeração, os espermatozoides submetidos à variação de temperatura, principalmente entre 30 e 0°C, sofrem uma perda prematura da motilidade e redução da produção de energia (WATSON, 2000; MEDEIROS et al., 2002).

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 (M4) horas, teste de exaustão 24 horas 120 (M2) e 240 (M3) minutos e 48 horas 120 (M5) e 240 (M6) minutos nos grupos GGL, GGpL e GEL.

Meios	Refrigeração (h)						
	M0	24			48		
		M1	M2	M3	M4	M5	M6
MT (Motilidade total - %)							
GGL	91,8 ^a	87,4 ^a	49,0 ^b	8,9 ^c	71,7 ^{ab}	23,5 ^c	5,1 ^c
	$\pm 4,2$	$\pm 14,4$	$\pm 25,1$	$\pm 14,3$	$\pm 27,7$	$\pm 18,7$	$\pm 9,2$
GGpL	90,4 ^a	90,5 ^a	66,8 ^{bc}	14,0 ^{cd}	74,3 ^{ab}	28,8 ^c	4,4 ^d
	$\pm 6,0$	$\pm 6,9$	$\pm 23,1$	$\pm 22,0$	$\pm 20,0$	$\pm 23,0$	$\pm 7,8$
GEL	90,5 ^a	90,6 ^a	49,6 ^b	6,9 ^c	83,4 ^a	39,7 ^a	10,6 ^c
	$\pm 5,4$	$\pm 4,6$	$\pm 37,5$	$\pm 14,4$	$\pm 18,8$	$\pm 37,1$	$\pm 27,8$
MP (Motilidade progressiva - %)							
GGL	62,1 ^a	51,1 ^a	21,5 ^{bcB}	3,2 ^d	31,2 ^{bB}	6,1 ^{cd}	0,9 ^d
	$\pm 8,0$	$\pm 14,4$	$\pm 16,8$	$\pm 7,0$	$\pm 17,3$	$\pm 6,3$	$\pm 2,8$
GGpL	64,6 ^a	61,8 ^a	39,7 ^{bA}	6,9 ^c	41,0 ^{bAB}	11,3 ^c	1,3 ^c
	$\pm 5,2$	$\pm 10,2$	$\pm 19,8$	$\pm 13,7$	$\pm 17,7$	$\pm 14,3$	$\pm 3,7$
GEL	66,4 ^a	56,9 ^{ab}	28,9 ^{cAB}	2,4 ^e	49,2 ^{bA}	21,0 ^{cd}	5,7 ^{de}
	$\pm 4,6$	$\pm 14,2$	$\pm 23,9$	$\pm 6,3$	$\pm 18,9$	$\pm 22,7$	$\pm 15,9$

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.

Com relação à Motilidade Total (MT) não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre o **M0** (momento 0), **M1** e **M4** (momentos 1 e 4; pós-refrigeração 24 e 48 horas) para todos os tratamentos. Entretanto, observou-se diferença significativa ($P < 0,05$) nos valores da motilidade total (MT) no teste de exaustão em relação aos momentos iniciais. Para Maxwell & Salamon (1993), a redução da motilidade e da integridade morfológica dos espermatozoides foram às mudanças mais observadas na refrigeração do sêmen ao longo do tempo. Sousa (2002), avaliando o desempenho do container Equitainer[®] (Hamilton-Thorne Research, Beverly, MA, USA), sistema de refrigeração e transporte, no sêmen de ovino utilizando o meio GGL com 20 % de gema de ovo, obteve diferença significativa

($P < 0,05$) para o parâmetro de motilidade total (MT) entre os momentos pós-refrigeração e teste de exaustão condizendo com os resultados obtidos neste experimento.

Como no trabalho de Sousa (2002) ao final das 4 horas do teste de exaustão, o sêmen refrigerado por 24 horas mostrou-se superior ao refrigerado por 48 horas para os parâmetros de MT e MP. Apesar de não avaliado, este fato pode ser atribuído por hipótese ao maior consumo energético durante o período de refrigeração, com conseqüente posterior redução do metabolismo e morte celular ou a lesões morfofuncionais dos espermatozoides.

Os parâmetros de velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL) e velocidade curvilínea (VCL) estão apresentados na Tabela 2. Para esses parâmetros não houve diferença significativa ($P > 0,05$), entre os tratamentos (GGL, GGpL e GEL) e nem em todos os momentos estudados. Sousa (2002) obteve valores superiores no parâmetro VCL entre os tratamentos na geladeira e no sistema Equitainer[®]. Essa superioridade foi atribuída a provável estabilidade da temperatura no sistema Equitainer[®], havendo menos depleção da fonte energética devido à manutenção do metabolismo espermático reduzido, permitindo uma melhor qualidade do sêmen ao final do período. A temperatura média na geladeira após 24 horas foi de $5,4 \pm 1,8^{\circ}\text{C}$ ($4,0^{\circ}\text{C}$ a $6,8^{\circ}\text{C}$). No presente experimento, na geladeira Minitube a temperatura média foi de $5,1 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$ ($4,8^{\circ}\text{C}$ a $5,6^{\circ}\text{C}$), parecendo haver uma maior estabilidade nesse sistema que na geladeira convencional utilizada por Sousa (2002).

Entre os momentos pré (**M0**), e pós-refrigeração (**M1** e **M4**) não houve diferença significativa ($P > 0,05$), em nenhum dos parâmetros de velocidade (Tab.2), para nenhum dos tratamentos. Diferentemente dos parâmetros de motilidade, ao final de 4 horas do teste de exaustão não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre o sêmen refrigerado por 24 e 48 horas, nos três tratamentos. Pode-se atribuir estes resultados ao fato de não haver dependência entre os parâmetros de motilidade com aqueles da velocidade, mostrando que os espermatozoides móveis após 48 horas de refrigeração e 4 horas de teste de exaustão, mantêm valores de velocidade semelhantes aos daqueles com 24 horas de refrigeração e 4 horas de teste de exaustão.

TABELA 2: Médias \pm desvio padrão dos parâmetros de cinética espermática (velocidades) avaliados no sistema computadorizado do sêmen ovino pré-refrigeração (M0), pós-refrigeração 24 (M1) e 48 (M4) horas, teste de exaustão 24 horas 120 (M2) e 240 (M3) minutos e 48 horas 120 (M5) e 240 (M6) minutos nos grupos GGL, GGpL e GEL.

Meios	Refrigeração (h)						
	M0	24			48		
		M1	M2	M3	M4	M5	M6
VAP (Velocidade de trajeto - $\mu\text{m/s}$)							
GGL	156,4 ^a $\pm 19,2$	131,5 ^{ab} $\pm 20,9$	97,3 ^c $\pm 19,5$	30,9 ^d $\pm 33,7$	110,8 ^{bc} $\pm 30,0$	77,4 ^c $\pm 35,7$	22,0 ^d $\pm 32,5$
GGpL	164,8 ^a $\pm 13,5$	144,9 ^{ab} $\pm 14,7$	104,7 ^c $\pm 21,2$	36,9 ^d $\pm 37,9$	115,9 ^{bc} $\pm 15,9$	83,8 ^c $\pm 19,7$	30,2 ^d $\pm 38,1$
GEL	170,2 ^a $\pm 14,2$	137,8 ^{ab} $\pm 9,9$	84,9 ^c $\pm 38,8$	21,7 ^d $\pm 35,2$	127,5 ^b $\pm 20,7$	78,9 ^c $\pm 54,6$	25,5 ^d $\pm 44,0$
VSL (Velocidade progressiva - $\mu\text{m/s}$)							
GGL	135,4 ^a $\pm 19,6$	107,8 ^{ab} $\pm 21,7$	75,5 ^{cd} $\pm 21,1$	24,7 ^{ef} $\pm 27,2$	79,9 ^{bc} $\pm 23,7$	49,9 ^{de} $\pm 25,1$	15,0 ^f $\pm 22,2$
GGpL	146,1 ^a $\pm 15,4$	121,7 ^a $\pm 18,0$	86,0 ^{bc} $\pm 18,9$	30,5 ^{de} $\pm 31,9$	90,2 ^b $\pm 17,8$	58,9 ^{cd} $\pm 18,6$	20,2 ^e $\pm 25,6$
GEL	150,6 ^a $\pm 16,5$	111,7 ^b $\pm 14,8$	71,2 ^c $\pm 32,6$	20,0 ^d $\pm 32,2$	101,2 ^b $\pm 22,1$	61,2 ^c $\pm 44,2$	16,5 ^d $\pm 35,0$
VCL (Velocidade curvilínea - $\mu\text{m/s}$)							
GGL	232,1 ^a $\pm 26,1$	225,6 ^a $\pm 30,3$	166,7 ^{bc} $\pm 27,8$	54,9 ^d $\pm 59,4$	201,9 ^{ab} $\pm 54,6$	140,5 ^c $\pm 63,0$	38,3 ^d $\pm 56,8$
GGpL	240,2 ^a $\pm 16,9$	245,7 ^a $\pm 22,0$	178,7 ^b $\pm 30,1$	65,7 ^c $\pm 66,6$	207,0 ^{ab} $\pm 33,3$	154,4 ^b $\pm 31,3$	54,8 ^c $\pm 70,3$
GEL	246,6 ^a $\pm 21,6$	258,5 ^a $\pm 15,0$	146,0 ^b $\pm 70,0$	35,5 ^c $\pm 58,6$	241,4 ^a $\pm 37,5$	143,0 ^b $\pm 100,5$	35,5 ^c $\pm 78,4$

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha 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.

Os parâmetros de amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimentos flagelares (BCF), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN) são apresentados na Tabela 3. Para esses parâmetros não houve diferença significativa ($P > 0,05$) em nenhum dos momentos. Já entre os momentos as diferenças apresentaram o mesmo comportamento dos parâmetros de velocidade.

TABELA 3: Médias \pm desvio padrão dos parâmetros de cinética espermática avaliados no sistema computadorizado do sêmen ovino pré-refrigeração (M0), pós-refrigeração 24 (M1) e 48 (M4) horas, teste de exaustão 24 horas 120 (M2) e 240 (M3) minutos e 48 horas 120 (M5) e 240 (M6) minutos nos grupos GGL, GGpL e GEL.

Meios	Refrigeração (h)						
	M0	24			48		
		M1	M2	M3	M4	M5	M6
ALH (Amplitude de deslocamento lateral da cabeça - μm)							
GGL	6,9 ^a $\pm 0,8$	7,7 ^a $\pm 0,9$	6,2 ^{ab} $\pm 0,8$	2,2 ^{bc} $\pm 2,8$	7,2 ^a $\pm 2,6$	5,0 ^{abc} $\pm 3,1$	1,6 ^c $\pm 2,9$
GGpL	6,9 ^a $\pm 0,8$	7,7 ^a $\pm 0,8$	6,5 ^a $\pm 0,7$	2,2 ^{bc} $\pm 2,8$	7,5 ^a $\pm 1,1$	5,9 ^{ab} $\pm 2,2$	1,2 ^c $\pm 2,5$
GEL	6,8 ^a $\pm 0,7$	9,3 ^a $\pm 1,1$	8,1 ^a $\pm 14,2$	1,6 ^b $\pm 2,9$	8,9 ^a $\pm 1,3$	5,1 ^{ab} $\pm 3,7$	1,2 ^b $\pm 2,9$
BCF (Frequência de batimentos flagelares - Hz)							
GGL	43,2 ^a $\pm 3,2$	42,2 ^{ab} $\pm 3,6$	38,5 ^{ab} $\pm 3,5$	20,0 ^c $\pm 19,1$	36,0 ^{ab} $\pm 9,1$	30,1 ^{bc} $\pm 10,9$	10,6 ^d $\pm 15,3$
GGpL	44,2 ^a $\pm 2,8$	43,6 ^a $\pm 3,8$	39,7 ^a $\pm 2,9$	17,8 ^b $\pm 18,7$	38,8 ^a $\pm 3,1$	34,9 ^a $\pm 3,5$	13,5 ^b $\pm 15,8$
GEL	43,9 ^a $\pm 3,1$	37,8 ^{ab} $\pm 4,8$	35,8 ^{ab} $\pm 12,8$	12,3 ^c $\pm 19,3$	36,9 ^{ab} $\pm 3,1$	30,4 ^b $\pm 16,3$	7,0 ^c $\pm 14,4$
STR (Retilinearidade - %)							
GGL	81,9 ^a $\pm 4,3$	77,4 ^a $\pm 6,1$	74,2 ^a $\pm 8,6$	42,1 ^{bc} $\pm 39,7$	66,5 ^{ab} $\pm 17,0$	58,3 ^{ab} $\pm 21,1$	24,8 ^c $\pm 35,3$
GGpL	84,3 ^a $\pm 3,1$	81,1 ^a $\pm 4,8$	79,3 ^a $\pm 4,3$	43,3 ^{bc} $\pm 40,3$	74,9 ^a $\pm 6,1$	68,8 ^{ab} $\pm 8,2$	31,7 ^c $\pm 36,4$
GEL	85,3 ^a $\pm 4,1$	78,8 ^a $\pm 6,4$	73,0 ^a $\pm 25,7$	26,5 ^b $\pm 41,7$	76,1 ^a $\pm 7,3$	62,1 ^a $\pm 32,5$	16,2 ^b $\pm 33,6$
LIN (Linearidade - %)							
GGL	56,3 ^a $\pm 5,6$	46,4 ^{ab} $\pm 6,8$	44,1 ^{ab} $\pm 7,4$	25,7 ^c $\pm 25,8$	37,1 ^{bc} $\pm 9,5$	32,5 ^{bc} $\pm 12,0$	15,4 ^d $\pm 23,5$
GGpL	58,6 ^a $\pm 5,1$	48,7 ^{ab} $\pm 5,1$	46,9 ^{ab} $\pm 3,8$	25,4 ^c $\pm 24,5$	43,1 ^{ab} $\pm 4,6$	38,3 ^{bc} $\pm 5,9$	19,0 ^d $\pm 22,2$
GEL	59,6 ^a $\pm 5,7$	43,1 ^{ab} $\pm 5,7$	44,6 ^{ab} $\pm 17,7$	16,9 ^c $\pm 27,0$	42,1 ^b $\pm 5,2$	36,1 ^b $\pm 19,4$	8,5 ^c $\pm 17,4$

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha 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.

Os valores de retilinearidade (STR) são uma comparação da linha reta com a média das trajetórias, onde fornecem uma indicação da relação entre o espaço ganho e a trajetória geral do espermatozoide. Um alto valor de STR mostra que o caminho médio seria próximo do caminho em linha reta e um valor baixo indica o caminho médio mais curvilíneo (MORTIMER, 1997). Neste trabalho os valores de STR não tiveram diferenças significativas ($P>0,05$) entre os tratamentos, nos respectivos momentos.

Moustacas (2009) estudou o sêmen ovino, comparando o meio Tris-glicose-gema formulado com diversas concentrações de LBD fresca e liofilizada (8, 12, 16 e 20% para ambas). Para o parâmetro de deslocamento lateral da cabeça (ALH) houve diferença significativa ($P<0,05$) do meio LBD com 20% em relação a todos os meios de LBD liofilizada. Já para os parâmetros de linearidade (LIN) e retilinearidade (STR) o meio Tris-glicose-gema e todos os meios com LBD fresca obtiveram melhores resultados que os meios com LBD liofilizada.

O comportamento de todos os parâmetros ao longo dos momentos apresentando declínio após o teste de exaustão pode estar relacionado ao desgaste energético que ocorre com o sêmen durante os processos de refrigeração (24 e 48 horas), pois este processo reduz o metabolismo celular, não o abolindo por completo, conforme afirmam López et al. (1999). Desta forma, os espermatozoides têm, ao longo do tempo do teste de exaustão, uma menor quantidade de substratos disponíveis entre eles a frutose, presente nos meios (SALAMON & MAXWELL, 2000).

Os parâmetros de integridade da membrana plasmática, integridade de acrossomo e cauda dobrada são apresentados na Tabela 4. Também para estes parâmetros houve uma queda nos valores ao longo dos momentos de avaliação, constatados pela diferença significativa ($P<0,05$) entre eles. Para a de integridade da membrana plasmática não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os meios nos momentos pré-refrigeração (GGL- 72,2% – GGpL- 77,2% – GEL- 75,1%), pós 24 horas de refrigeração (GGL- 62,7% – GGpL- 71,4% – GEL- 72,3%) e pós 48 horas de refrigeração (GGL- 57,5% – GGpL-66,8% – GEL- 71,2%). O mesmo fato também ocorreu para os parâmetros de integridade de acrossomo e cauda dobrada ($P>0,05$).

TABELA 4: 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 (M4) horas, teste de exaustão 24 horas 120 (M2) e 240 (M3) minutos e 48 horas 120 (M5) e 240 (M6) minutos nos grupos GGL, GGpL e GEL.

Meios	Refrigeração (h)						
	M0	24			48		
		M1	M2	M3	M4	M5	M6
Integridade de membrana plasmática*							
GGL	72,2 ^a $\pm 10,4$	62,7 ^a $\pm 12,1$	33,5 ^{bB} $\pm 13,5$	20,6 ^{bB} $\pm 11,5$	57,5 ^a $\pm 16,6$	30,0 ^{bB} $\pm 10,1$	17,9 ^{bB} $\pm 8,2$
GGpL	77,2 ^a $\pm 8,2$	71,4 ^a $\pm 8,7$	54,9 ^{bA} $\pm 13,4$	32,0 ^{cAB} $\pm 15,3$	66,8 ^{ab} $\pm 7,2$	51,3 ^{bA} $\pm 20,0$	28,1 ^{cAB} $\pm 11,3$
GEL	75,1 ^a $\pm 7,4$	72,3 ^{ab} $\pm 11,4$	57,6 ^{bcA} $\pm 15,5$	39,1 ^{deA} $\pm 22,7$	71,2 ^{ab} $\pm 10,4$	52,0 ^{cdA} $\pm 19,9$	34,5 ^{eA} $\pm 20,1$
Integridade de acrossomo**							
GGL	99,8 ^a $\pm 0,4$	99,0 ^{ab} $\pm 0,8$	95,5 $\pm 0,9$	93,7 ^{cdA} $\pm 1,6$	98,1 ^b $\pm 1,5$	93,8 ^{cB} $\pm 1,3$	92,4 ^{dA} $\pm 2,3$
GGpL	99,8 ^a $\pm 0,4$	99,6 ^a $\pm 0,7$	95,8 ^b $\pm 0,9$	94,5 ^{bcA} $\pm 1,0$	99,4 ^a $\pm 0,6$	95,4 ^{bA} $\pm 1,0$	93,2 ^{cA} $\pm 0,7$
GEL	99,9 ^a $\pm 0,3$	99,7 ^a $\pm 0,5$	94,7 ^b $\pm 1,0$	91,1 ^{cB} $\pm 1,6$	99,4 ^a $\pm 1,0$	93,9 ^{bB} $\pm 1,1$	89,9 ^{cB} $\pm 2,2$
Cauda dobrada**							
GGL	5,2 ^a $\pm 1,8$	4,6 ^{ab} $\pm 1,4$	3,3 ^b $\pm 1,3$	4,0 ^{ab} $\pm 0,8$	5,4 ^a $\pm 1,7$	3,5 ^b $\pm 1,2$	4,2 ^{ab} $\pm 1,4$
GGpL	4,1 ^a $\pm 1,2$	4,5 ^a $\pm 1,6$	3,1 ^a $\pm 1,2$	4,0 ^a $\pm 1,1$	4,1 ^a $\pm 1,5$	3,4 ^a $\pm 0,9$	3,6 ^a $\pm 1,0$
GEL	5,0 ^a $\pm 1,7$	4,7 ^{abc} $\pm 1,7$	3,4 ^{bc} $\pm 1,3$	4,8 ^{ab} $\pm 1,1$	5,0 ^a $\pm 1,1$	3,2 ^c $\pm 0,9$	4,7 ^{abc} $\pm 1,2$

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.

* Combinação de sondas Fluorescentes Diacetato de carboxifluoresceína (DIC) e Iodeto de Propídio (IP).

** Preparação úmida em solução de Glutaraldeído.

- **GGL** - Meio Glicina Gema Leite;

- **GGpL** - Meio Glicina Gema purificada Leite;

- **GEL** - Meio Glicina Extrato Leite.

Sousa (2002) comparando dois meios, Glicose Leite (GL) e Glicina Gema Leite (GGL) obteve melhores resultados ($P < 0,05$) para integridade de acrossomo no meio GGL após 24 horas de refrigeração. Essa maior porcentagem de

acrossomos íntegros deve-se a presença da gema de ovo no meio diluente GGL. Segundo Maxwell & Salamon (1993) e Salamon & Maxwell (2000), a gema de ovo atua prevenindo mudanças degenerativas do acrossomo.

Moustacas et al. (2011) observaram um maior número de lesões de acrossomo, sendo o destacamento da região apical o principal deles. Isto ocorreu com maior frequência nos meios com LBD liofilizada. Quinn et al. (1969) demonstraram que a região apical do espermatozoide ovino é mais susceptível às crioinjúrias. Bencharif et al. (2008) e Ahmad et al. (2008) obtiveram maior percentual de proteção do acrossomo após o descongelamento com 6% de LBD no meio diluidor para espermatozoides de caninos e caprinos respectivamente. Neste trabalho o maior percentual de acrossomos íntegros pode ser explicado pelo fato de os espermatozoides não terem passado pelo processo de congelação/descongelação.

No parâmetro de integridade de membrana plasmática foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os meios diluidores em 4 momentos distintos. Nos momentos 2 e 3 (24 horas, 120 e 240 minutos) o meio diluidor GEL foi superior em ambos ao meio diluidor GGL. Já o meio diluidor GGpL(54,9) apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) no momento 2 em relação ao meio GGL(33,5), mas no momento 3 não houve diferença entre esses. O mesmo fato ocorreu durante os momentos 5 e 6 (48 horas, 120 e 240 minutos), onde o meio GEL foi superior ao meio GGL em ambos os momentos. Este resultado mostra que o meio GEL teve uma maior eficiência na proteção à membrana durante o período do teste de exaustão. O meio GGpL também apresentou resultados superiores ao controle (GGL), mas no final do teste de exaustão, para ambos os períodos de refrigeração, não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) entre estes. Esse achado confirma o papel da LBD na proteção da membrana plasmática dos espermatozoides durante o resfriamento e a criopreservação. Diversos autores comprovaram esta função das LBD nos seus trabalhos (PACE & GRAHAM, 1974; FOULKES, 1977; WATSON, 1981a; MOUSSA et al., 2002; BERGERON & MANJUNATH, 2006; TONIETO et al., 2010; MOUSTACAS et al., 2011; HU et al., 2011).

Tonieto et al. (2010) testaram o uso das LBD associado ou não a Trealose na congelação do sêmen ovino. Durante as análises pós congelação obtiveram diferença significativa ($P < 0,05$) para os meios diluidores com LBD e Trealose e sem Trealose para os parâmetros de motilidade e integridade de membrana plasmática. Os diluidores que continha 8% de LBD com 5% de glicerol e 8% de LBD com 100 mM (miliMolar) de trealose, obtiveram resultados superiores aos meios controle Tris-gema (20% gema de ovo) e a associação de 8% de LBD com 5% de glicerol e 100 mM de trealose, para os parâmetros citados anteriormente.

Hu et al. (2011) trabalharam com diferentes concentrações de LBD (7, 8 e 9%) em um meio base com Tris, em comparação ao meio Tris com 20% de gema de ovo na congelação do sêmen bovino. Obtiveram diferenças significativas ($P < 0,05$) para os parâmetros de integridade do acrossomo e de membrana plasmática, do meio contendo 8% de LBD para os demais testados.

Na integridade do acrossomo, também apareceram diferenças significativas ($P < 0,05$) para alguns momentos específicos. Assim como na integridade de membrana plasmática, foram nos momentos do teste de exaustão que estas diferenças apareceram (momentos 3, 5 e 6). Diferentemente do ocorrido na integridade de membrana, o meio que obteve melhores resultados foi o GGpL, tendo resultados superiores, em um momento (5), aos demais meios e nos outros momentos (3 e 6) não houve diferença ($P > 0,05$) em relação ao meio GGL. Isso corrobora com os resultados obtidos por Tonieto et al. (2010) onde não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os meios para a integridade do acrossomo, nas análises feitas após descongelação no sêmen ovino.

Neste trabalho tanto o meio contendo LBD quanto o meio com gema purificada conferiram maior proteção à membrana plasmática e acrossomo, respectivamente, durante o teste de exaustão. Varias hipóteses são levantadas nos estudos de qual o real mecanismo de atuação das LBD sobre a membrana do espermatozoide, mas este ainda não está completamente elucidado.

Outro fator que pode estar associado à manutenção da morfofisiologia do espermatozoide é a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Apesar do sêmen ter sido mantido em microtubos de polipropileno de 600 μ L (durante o processo de refrigeração), praticamente repletos, a interface entre a tampa dos

microtubos e a superfície do sêmen pode conter oxigênio suficiente para manter o metabolismo aeróbico. Dentro de um meio aeróbico ou mesmo parcialmente aeróbico, a produção de ROS é inevitável, levando aos problemas anteriormente citados (LÓPEZ et al., 1999). Já durante o teste de exaustão o sêmen era transferido para microtubos de polipropileno de 1,5 mL onde era acrescido 30% do meio original, portanto durante esse teste a quantidade de oxigênio dentro do tubo era muito maior, se comparado à refrigeração, o que leva a uma maior formação de ROS.

Para Maxwell & Watson (1996), a incubação do sêmen ovino à 37°C durante 6 horas levaria estes processos, assim como um decréscimo significativo da fertilidade tanto no sêmen a fresco como no congelado. A maior formação de ROS durante o teste de exaustão pode ser um dos fatores que contribuíram para um menor desempenho do meio GGL frente aos outros, no parâmetro da integridade de membrana.

Segundo Vishwanath & Shannon (2000), a gema de ovo seria uma importante fonte de aminoácidos aromáticos para a formação de radicais livres, principalmente de peróxidos de hidrogênio (H_2O_2), e a taxa de formação de ROS teria relação direta com a da concentração de gema de ovo no meio diluente. Frente a isto, torna-se importante uma redução na concentração da gema de ovo ou mesmo sua substituição, reduzindo assim também a produção de ROS.

7. IMPLICAÇÕES

- A “purificação” da gema de ovo, com a metodologia empregada neste trabalho, pode ser uma alternativa para o incremento nos parâmetros de morfologia espermática e integridade de membrana plasmática. Novos estudos devem ser realizados para o aprimoramento metodológico da “purificação” e definição do mecanismo de ação da gema “purificada”, bem como a determinação dos constituintes presentes após a “purificação”;
- Há indicações de que a fração lipoproteica de baixa densidade da gema de ovo é responsável pela proteção da membrana plasmática frente ao processo de refrigeração e congelação (PACE & GRAHAM, 1974; FOULKES, 1977; WATSON 1981a; MOUSSA et al., 2002). Neste sentido, estudos mais completos devem ser feitos para descobrir o real mecanismo de proteção da membrana plasmática;
- Atribui-se aos constituintes da gema de ovo um importante papel na geração dos ROS durante o processo de refrigeração e congelação (LÓPEZ et al., 1999; VISHWANATH & SHANNON, 2000). Estudos devem ser direcionados para constatação das implicações, que a redução da gema de ovo ou de sua substituição nos meios diluidores tem sobre a formação dos ROS;
- O processo de extração das lipoproteínas de baixa densidade pode ainda ser incrementado, no intuito de se determinar com precisão os ingredientes presentes nesse extrato, visando à confecção de meios quimicamente definidos, ampliando as fronteiras biotecnológicas na utilização do sêmen ovino.

8. CONCLUSÕES

Diante das condições experimentais e com base nos dados obtidos, conclui-se:

1. A gema de ovo “purificada” mostrou-se capaz de substituir a gema de ovo *in natura* no meio diluente Glicina Gema Leite sem prejuízos aos parâmetros morfofisiológicos dos espermatozoides no sêmen refrigerado ovino;

2. A substituição da gema de ovo *in natura* pelo extrato de lipoproteínas de baixa densidade, no meio diluente Glicina Gema Leite para refrigeração do sêmen ovino é viável sem prejuízos aos parâmetros morfofisiológicos dos espermatozoides;

3. A gema de ovo “purificada” e o extrato de lipoproteínas de baixa densidade conferiram um incremento nos parâmetros de morfologia espermática para o sêmen refrigerado ovino.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, M.Z.A.A.; CHATAGNON, G.; AMIRAT-BRIAND, L. *et al.* Use of Glutamine and Low Density Lipoproteins Isolated from Egg Yolk to Improve Buck Semen Freezing. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.429–436, 2008;

AMIRAT, L.; TAINURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GÉRARD, O.; COURTENS, J.L.; ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after criopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, v.61, p.895-907, 2004;

ANZAR, M.; HASSAN, M.M. GRAHAM, E.F.; DEYO, R.C.M.; SINGH, G. Efficacy of the Hamilton Thorn Motility Analyzer (HTM-2030) for evaluation of bovine semen. **Theriogenology**, v. 36, p. 307-17, 1991.

AZEVEDO, H.C. **Integridade e funcionalidade dos espermatozóides ovinos submetidos à criopreservação após a incorporação de colesterol, desmosterol, ácido oléicolinoléico e α -lactoalbumina.** 2006. 214p., Tese (doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP;

BARBAS, J.P.; MASCARENHAS, R.D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell Tissue Bank**. v.10, p.49-62, 2009;

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

BENCHARIF,D.; AMIRAT, L.; ANTON, M.; SCHMITT, E.; DESHERCES, S.; DELHOMME, G.; LANGLOIS, M.L.; BARRIE`RE, P.; LARRAT, M.; TAINURIER, D. The advantages of LDL (Low Density Lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. **Theriogenology**, v.70, p.1478–1488, 2008;

BERGERON, A.; CRÊTE, M.H.; BRINDLE, Y.; MANJUNATH, P. Low-density lipoprotein fraction from hen`s egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v.70, p.708-717, 2004;

BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular and Reproduction and Development**, v.73, p.1338-1344, 2006;

BICUDO, S.D.; PASCHOAL, J.P.S; RIBEIRO, E.F.R.; PAPA, F.O. Dispositivo de incubação para o resfriamento de sêmen em pequenos volumes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, (Supl. 2) p.456, 1991;

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nord. Veterinaarmed.**, v.25, p.382-391, 1973;

BOUNDY, T. Collection and interpretation of ram semen under general practice conditions. **In Pract.**, v. 15, p 219-23, 1993;

BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J.P.; 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**, v.50, p.699-706, 1998;

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p. 479-488, 2007;

CORCINE, C.D.; VARELA Jr., A.S.; ULGUIN, R.R.; BIANCHI, I.; ALVARENGA, M.V.F. *et al.* **Efeito da lipoproteína de baixa densidade da gema de ovo sobre a qualidade do sêmen canino resfriado a 5°C.** IN: Congresso de Iniciação Científica, Universidade Federal de Pelotas XIII, 2004, Pelotas-RS. **Anais...** http://www.ufpel.edu.br/cic/2004/arquivos/CA_01100.rtf acesso em 29/08/2008;

DEMANIOWICZ, W.; STRZEZEK, J. The effect of lipoprotein fraction from egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, p.279-80, 1996;

FARSTARD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 251-260, 1996;

FERREIRA, J.C.P. **Avaliação subjetiva e computadorizada do movimento espermático pós-descongelamento do sêmen eqüino.** Botucatu, 2000. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho";

FISHER, L.D.; BELLE, G.V. **Biostatistics A Methodology for the health Sciences.**Wiley-Interscience, New York, 991p, 1993;

FONSECA, V.O.; VALE FILHO, V.R.; MIES FILHO, A. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** Belo Horizonte, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 40p, 1992;

FOULKES, J.A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. **Journal Reproduction and Fertility**, v.49, p.277-284, 1977;

GARNER, D.L. Ancillary tests of bull semen quality. **Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.**, v. 13, n. 2, p. 313-27, 1997;

GIL, J.; JANUSKAUSKAS, A.; HAARD, M.C. et al. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-Plus and Tryladil. **Reproduction Domestic Animal**, v.35, p.69 – 77, 2000;

GIL, J.; RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M.; LUNDEHEIM, N.; SÖDERQUIST, L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcel[®] and used for cervical artificial insemination. **Theriogenology**, v.59, p.1157-1170, 2003;

GONZALEZ, C.I.M.; OBA, E.; BICUDO, S.D.; SOUZA, M.I.L. Cryopreservation of semen in Ideal rams with glycine-egg yolk-extender. In: International Congress of Animal Reproduction, 13, 1996, Sydney. **Proceedings...Sidney**, p. 2-9, 1996;

GRAHAM, J.K.; FOOT, R.H. Effect of several lipids fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. **Cryobiology**, v.24, p.42-52, 1987;

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

HENRY, M.; NEVES, J. P. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen Animal**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - Cbra, p.40-5, 1996;

HOLT, W.V.; NORTH, R.D. Thermotropic phase transitions in plasma membrane of ram spermatozoa. **Journal Reproduction and Fertility**, v.78, p.447- 457, 1986;

HU, J.-H.; JIANG, Z.-L.; LV, R.-K.; LI, Q.-W.; ZHANG, S.-S.; ZAN, L.-S.; LI, Y.-K.; LI, X.; The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. **Cryobiology**, v.62, p.83-87, 2011;

JONES, R.C.; MARTIN, I.C.A. The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5° C on the ultrastructure of ram spermatozoa. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 35, p. 311-20, 1973;

KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S.; ALEXOPOULOS, C.; AMARANTIS, I. Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. **Small Ruminant Res.**, v. 37, p. 125-30, 2000;

KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S.; KARATZAS, G.; BROZOS, C. Effect of time of artificial insemination on fertility of progestagen and PMSG treated indigenous Greek ewes, during non-breeding season. **Small Ruminant Res.**, v. 39, p. 67-71, 2001;

LÓPEZ, A.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm viability in ram semen diluted and stored in three different extenders. **Acta Vet. Scand.**, v. 40, p. 1-9, 1999;

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

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

MAXWELL, W.M.C.; SALAMON, S. Liquid storage of ram semen: a review. **Reproduction Fertility Development**, v. 5, p. 613-38, 1993;

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

MCBEE, L.; COTTERILL, O. Ion exchange chromatography and electrophoresis of egg yolk. **Journal Food Science**, v.44, p.656-660, 1979;

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, p.327-344, 2002;

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

MOSES, D.F.; DE LAS HERAS, M.A.; VALCÁRCEL, A.; PÉREZ, L.; BALDASSARRE, H. Use of computerized motility analyser for the evaluation of frozen-thawed ram spermatozoa. **Andrologia**, v. 27, p. 25-9, 1994;

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen Egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.57, p.1695–706, 2002;

MOUSTACAS, V.S. **Viabilidade *in vitro* de espermatozoides Ovinos criopreservado em meios contendo Lipoproteína de baixa densidade fresca e Liofilizada**. 2009. 46p., Dissertação (mestrado), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG;

MOUSTACAS, V.S.; ZAFFALON, M.A.; LAGARES, M.A.; LOAIZA-ECCHEVERRI, A.M.; VARAGO, F.C.; NEVES, M.M.; HENEINE, L.G.D.; ARRUDA, R.P.; HENRY, M. Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were na acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram sêmen. **Theriogenology**, v.75, p.300-307, 2011;

NAQVI, S.M.K.; JOSHI, A.; BAG, S.; PAREEK, S.R.; MITTAL, J. P. Cervical penetration and transcervical AI of tropical sheep (Malpura) at natural oestrus using frozen-thawed semen. Technical note. **Small Ruminant Research**, v. 29, p. 329-33, 1998;

NAQVI, S.M.K.; JOSHI, A.; DAS, G.K.; MITTAL, J.P. Development and application of ovine reproductive technologies: an Indian experience. **Small Ruminant Research**, v. 39, p. 199-208, 2001;

NEILD, D.; CHAVES, G.; FLORES, M.; MORA, N.; BECONI, M.; AGÜERO, A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.51, p.721-727, 1999;

NEVES, M.M. **Extração das Lipoproteínas de Baixa Densidade da gema do ovo de *Gallus domesticus* e sua aplicação na criopreservação do sêmen canino**. 2008. 117p., Tese (doutorado), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG;

OEHNINGER, S.; DURU, N.K.; SRISOMBUT, C.; MORSHEDI, M. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. **Molecular Cell Endocrinology**, v.169, p.3-10, 2000;

OLLERO, M.; PEREZ-PE, R.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIAN-PEREZ, J.A. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. **Cryobiology**, v.37, p.1-12, 1998;

PACE, M.M.; GRAHAM, E.F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. **Journal Animal Science**, v.39, p.1144-9, 1974;

PAGANINI FILHO, P. **Estudo da viabilidade do sêmen ovino frente a três diluentes em temperatura de 37°C e sob refrigeração**. Botucatu, 1999. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”;

PARKS, J.E. Hypothermia and mammalian gametes. In: KAROW, A.M.; CRISTSER, J.K. (Eds.). **Reproductive tissue banking, scientific principles**. London: Academic, p.229-261, 1997;

PERKINS, N.R.; HILL, J.R.; PEDRANA, R.G. Laparoscopic insemination of frozen-thawed semen into one or both uterine without regard to ovulation site in synchronized merino ewes. **Theriogenology**, v. 46, p. 541-5, 1996;

QUINN, P.J.; WHITE, I.G.; CLELAND, K.W. Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 18, p. 209-220, 1969;

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen. Review 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;

SILVA, M.C.; SNOECK, P.P.N.; SILVAS, S.C.B. *et al.* **Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre a viabilidade dos espermatozoides ovinos resfriados**. In: 35º CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2008, Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 2008;

SOUSA, D.B.; BICUDO, S.D.; PAPA, F.O.; FERREIRA, J.C.P. Comparative study of two methods of collect the ram semen (artificial vagina and eletroejaculation) being used conventional and computerized analyses (HTMA-IVOS 10). In: WORLD VETERINARY CONGRESS, 26, 1999, Lyon, **Proceedings...**, Lyon, 1999;

SOUSA, D.B. **Viabilidade do sistema Equitainer na refrigeração do sêmen ovino avaliado pelas análises computadorizada, de microscopia epifluorescente e inseminação artificial**. Botucatu, 2002. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”;

SU, L.; LI, X., QUAN, J.; YANG, S.; LI, Y.; HE, X.; TANG, X. A comparison of the protective action of added egg yolk from five avian species to the cryopreservation of bull sperm. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.212-219, 2008;

TARDIF, A.L.; FARRELL, P.B.; TROUERN-TREND, V.; FOOTE, R.H. Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. **Journal Dairy Science**, v. 80, p. 1606-12, 1997;

TONIETO, R.A.; GOULARTE, K.L.; GASTAL, G.D.A.; SCHIAVON, R.S.; DESCHAMPS J.C.; LUCIA JR. T. Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. **Small Ruminant Research**, v. 93, p. 206-09, 2010;

UPRETI, G.C.; OLIVER, J.E.; DUGANZICH, D.M.; MUNDAY, R.; SMITH, J.F. Development of a chemically defined ram semen diluent (RSD-1). **Animal Reproduction Science**, v. 37, p. 143-57, 1995;

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

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

VARNER, D. D., VAUGHAN, S. D., JOHNSON, L. Use of a computerized system for evaluation of equine spermatozoal motility. **Am. J. Vet. Res.**, v. 52, p. 224-30, 1991;

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.23-53, 2000;

WATSON, P. F. The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5°C and deep freezing. **J. Therm. Biol.**, v. 1, p. 137-41, 1976;

WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm membranes. In: CLARKE, A.; MORRIS, G.J. (Eds.). **Effects of low temperatures on biological membranes**. London: Academic press, p.189-218, 1981a;

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

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

WATSON, P.F. The causes of reduce fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-1, p.481-492, 2000;

YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 349-55, 2000;

10. TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho enviado para o periódico Revista “**Veterinária e Zootecnia**”

ISSN: 0102-5716

Normas para publicação disponível em:

<http://www.fmvz.unesp.br/revista/port/instrucoes.htm>

1 **IMPLICAÇÕES DA UTILIZAÇÃO DO EXTRATO DE LIPOPROTEÍNAS DE**
2 **BAIXA DENSIDADE E DA GEMA DE OVO “PURIFICADA”, SOBRE A**
3 **MOTILIDADE TOTAL E PROGRESSIVA DO SÊMEN OVINO REFRIGERADO**
4 **POR 24 E 48 HORAS**

5 Marcel Barbosa Falleiros¹
6 Sony Dimas Bicudo²
7 Leandro Rodello¹
8 Claudia Dias Monteiro¹
9 Sabrina Missae Sakashita¹
10 Romildo Romualdo Weiss³

11 **RESUMO**

12 Objetivou-se estudar os efeitos do extrato de lipoproteína de baixa densidade e da gema de
13 ovo “purificada” sobre os parâmetros de motilidade total (MT) e motilidade progressiva
14 (MP), nos espermatozoides ovinos refrigerados por 24 e 48 horas e submetidos a um teste
15 de exaustão de 4 horas. Foram utilizados 20 ejaculados, colhidos através de vagina
16 artificial de 5 carneiros da raça Dorper. Após avaliações macro e microscópicas o sêmen
17 era diluído em 3 tratamentos nos meios diluentes Glicina Gema Leite (controle), Glicina
18 Gema purificada Leite e Glicina Extrato Leite. Realizadas as diluições era feita a primeira
19 análise denominado M0 (momento 0). Realizadas as análises em todos os tratamentos as
20 alíquotas eram encaminhadas para a refrigeração na geladeira Minitube em um dispositivo
21 de incubação. Após 24 horas de refrigeração as alíquotas eram analisadas novamente. Feita
22 a análise as alíquotas remanescentes eram submetidas a um teste de exaustão durante 4
23 horas e as análises eram repetidas aos 120 e 240 minutos. Os mesmos procedimentos eram
24 repetidos para as alíquotas refrigeradas por 48 horas. Para o parâmetro de motilidade total
25 (MT) não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos. Entre os momentos
26 houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os momentos iniciais e os momentos do teste
27 de exaustão. No parâmetro de motilidade progressiva em dois momentos (M2 e M4), os
28 meios Glicina Gema purificada Leite e Glicina Extrato Leite apresentaram resultados
29 superiores ao meio Glicina Gema Leite. Este resultado mostra, que a substituição da gema
30 de ovo *in natura* pelo extrato de lipoproteínas de baixa densidade ou pela gema
31 “purificada”, pode ser feita sem prejuízos aos parâmetros de motilidade dos
32 espermatozoides ovinos refrigerados por 24 e 48 horas.

33 **Palavras chave:** Lipoproteínas de baixa densidade; ovino; sêmen refrigerado.

34 ¹ Pós-graduando, DRARV- FMVZ – UNESP, Botucatu-SP

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

36 ³ Docente, DRA – UFPR – Curitiba-PR

37 Marcel Barbosa Falleiros. Rua Adolpho César, 217, CEP 18608-780, Jd. Eldorado, Botucatu-SP, Fone:(14)
38 81315778

1 **IMPLICATIONS OF THE USE OF EXTRACT OF LOW DENSITY**
2 **LIPOPROTEINS AND AN EGG YOLK PURIFIED ON THE MOTILITY TOTAL**
3 **AND PROGRESSIVE IN RAM SEMEN COOLED BY 24 AND 48 HOURS**
4

5 **ABSTRACT**

6 The objective was to study the effects of the extract of low density lipoprotein and egg
7 yolk purified on parameters total motility (TM) and progressive motility (PM) on the ovine
8 spermatozoa cooled for 24 and 48 hours and subjected to an exhaustion test of 4 hours. We
9 used 20 ejaculates collected by artificial vagina from 5 Dorper sheep. After macroscopic
10 and microscopic assessments the semen was diluted with 3 treatments in the extenders
11 Glycine Yolk Milk (control), Glycine purified Yolk Milk and Glycine Extract Milk.
12 Dilutions performed the first analysis was done called M0 (moment 0). Performed the
13 analysis for all treatments aliquots were sent to the cooling in the refrigerator Minitube in a
14 device incubation. After 24 hours of cooling the aliquots were analyzed again. After the
15 analysis the remaining aliquots were subjected to an exhaustion test for 4 hours and
16 analysis were repeated at 120 and 240 minutes. The same procedures were repeated for
17 aliquots refrigerated for 48 hours. For the parameter of total motility (TM), there was no
18 significant difference ($P < 0.05$) among treatments. Between times there was a significant
19 difference ($P > 0.05$) between the initial moments and the moments of exhaustion test. In
20 the parameter of motility at two moments (M2 and M4), the means Glycine purified Yolk
21 Milk and Glycine Extract Milk showed better results in extender Glycine Yolk Milk. This
22 result shows that the substitution of fresh egg yolk by extract of low density lipoproteins or
23 by the "purified" yolk can be made without altering the parameters of motility sheep
24 spermatozoa cooled for 24 and 48 hours.

25
26 Key words: low density lipoprotein; ram; cooling semen.
27
28
29
30
31
32
33

1 **IMPLICACIONES DEL USO DE EXTRACTO DE LIPOPROTEINAS DE BAJA**
2 **DENSIDAD Y YEMA DE HUEVO PURIFICADA EN LA MOTILIDAD TOTAL Y**
3 **PROGRESIVA DE SEMEN DE OVINOS REFRIGERADO POR LA 24 Y 48**
4 **HORAS**
5

6 **RESUMEN**

7 El objetivo fue estudiar los efectos del extracto de lipoproteína de baja densidad y yema de
8 huevo purificada en los parámetros de la motilidad total (TM) y la motilidad progresiva
9 (MP) en los espermatozoides de las especies ovina enfriado durante 24 y 48 horas y se
10 sometió a una prueba de agotamiento de 4 horas. Se utilizaron 20 eyaculados recogidos por
11 vagina artificial a partir de 5 ovinos Dorper. Después de evaluaciones macroscópicas y
12 microscópicas del semen se diluyó con 3 tratamientos en los medios extensores Glicina
13 Yema Leche (control), Glicina Yema purificado Leche y Glicina Extracto Leche. Realizó
14 diluciones el primer análisis se realizó llamada M0 (momento 0). Realizó el análisis para
15 todos los tratamientos, alícuotas fueron enviados a la refrigeración en el refrigerador
16 Minitube en un dispositivo de incubación. Después de 24 horas de refrigeración las
17 alícuotas fueron analizadas de nuevo. Después del análisis de las alícuotas restantes fueron
18 sometidos a una prueba de agotamiento durante 4 horas y el análisis fue repetido a 120 y
19 240 minutos. El mismo procedimiento se repite para alícuotas refrigerado por 48 horas.
20 Para el parámetro de la motilidad total (TM) no hubo diferencias significativas ($P < 0,05$)
21 entre los tratamientos. Entre los tiempos hubo una diferencia significativa ($P > 0.05$) entre
22 los primeros momentos y los momentos de prueba de agotamiento. En el parámetro de la
23 movilidad en dos (M2 y M4), los medios Glicina Yema purifica Leche y de Glicina
24 Extracto Leche mostró mejores resultados que lo medio Glicina Yema Leche. Este
25 resultado muestra que la sustitución de la yema de huevo fresco por extracto de
26 lipoproteínas de baja densidad e la yema de huevo "purificada" se puede hacer sin alterar
27 los parámetros de motilidad de los espermatozoides ovinos refrigerados por 24 y 48 horas.

28
29 Palabras Clave: Lipoproteínas de baja densidad; ovino; semen refrigerado
30
31
32
33

1 INTRODUÇÃO

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

6 Para a maximização do desempenho dos machos, as biotécnicas envolvendo o
7 sêmen vêm se aprimorando, levando à utilização de animais superiores em um maior
8 número de matrizes no período de cobertura. Dentre elas a inseminação artificial cervical
9 superficial utilizando-se sêmen *in natura*, ou diluído é de extrema importância, pois não
10 requer utilização de equipamentos sofisticados nem treinamento técnico sofisticado para a
11 sua realização.

12 O meio diluidor de sêmen exerce importante papel no processo da criopreservação
13 e a variação em sua composição influencia as taxas de sobrevivência espermática após a
14 refrigeração. Nas últimas décadas, dezenas de formulações de meios diluidores têm sido
15 propostas e vários tipos de substâncias crioprotetoras foram incorporadas em suas
16 composições. As substâncias, com reconhecida ação crioprotetora, atualmente mais
17 utilizadas são a gema de ovo e o glicerol.

18 Devido seu efeito benéfico sobre a conservação de espermatozoides, a incorporação
19 de gema de ovo (1,5 a 50%) aos diluidores é de uso consagrado sendo o constituinte mais
20 prevalente em boa parte das formulações. A gema de ovo associada a outros ingredientes
21 previne o choque térmico, preserva a motilidade e a integridade das membranas
22 plasmáticas e acrossomal (AMIRAT et al., 2004). Atua também, como um protetor
23 osmótico, permitindo uma maior tolerância dos espermatozoides a soluções hipo e
24 hiperosmóticas. A proteção que exerce durante a criopreservação se deve a sua adesão à
25 membrana plasmática, especialmente dada pela fração lipoprotéica de baixa densidade
26 (LBD) (MOUSSA et al., 2002; BERGERON e MANJUNATH, 2006).

27 Porém, nos últimos anos a sua utilização tem sido questionada devido à
28 variabilidade em sua composição e risco sanitário em veicular agentes microbiológicos
29 específicos para regiões isentas, conseqüente à deficiente rastreabilidade de sua origem. Há
30 também um constante risco potencial de contaminação por microrganismos como bactérias
31 e micoplasmas, que podem acarretar na geração de endotoxinas deletérias à capacidade
32 fertilizante do espermatozoide (BOUSSEAU et al., 1998; GIL et al., 2003).

1 Várias técnicas de refrigeração são empregadas utilizando-se refrigeradores
2 estacionários bem como sistemas de refrigeração e transporte. Com isso, surgiu a
3 necessidade de aprimorar e testar meios diluidores para preservar, por um maior período de
4 tempo, as características dos espermatozoides e sua capacidade fertilizante.

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

8 **MATERIAL E MÉTODOS**

9 **Animais experimentais**

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

14 Foram selecionados por meio de exame andrológico 5 carneiros da raça Dorper
15 com idade entre 1 e 4 anos. No momento da chegada todos os animais foram pesados (51
16 Kg a 100 Kg), vermifugados conforme seus pesos e mantidos, durante o período
17 experimental, sob as mesmas condições de instalações, alimentação e manejo. O sêmen foi
18 colhido por meio de vagina artificial aquecida a 42°C com copo coletor graduado pré-
19 aquecido a 37°C. Foram colhidos 4 ejaculados de cada carneiro, perfazendo um total de 20
20 amostras.

21 **Delineamento experimental**

22 Cada uma das amostras de sêmen obtidas, após análise em suas características
23 macro e microscópicas, eram diluídas na proporção final de 1×10^8
24 espermatozoides/100µL, nos três meios diluidores, constituindo-se assim os três
25 tratamentos experimentais pareados com a seguinte denominação:

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

28 **Meio GGpL** – Fração diluída em meio Glicina Gema purificada Leite;

29 **Meio GEL** – Fração diluída em meio Glicina Extrato Leite.

30 Para cada tratamento eram constituídas duas alíquotas a fim de que uma fosse
31 refrigerada por 24 horas e outra por 48 horas, perfazendo-se então seis alíquotas para cada
32 uma das coletas. Ao final do período de refrigeração (**24 ou 48 horas**), um conjunto de

1 alíquotas representando cada um dos tratamentos, era destinado ao Teste de Exaustão com
2 duração de 240 minutos.

3 Em cada uma dessas etapas o sêmen era avaliado quanto às características de
4 cinética e morfologia espermáticas constituindo-se sete conjuntos de análises de acordo
5 com o momento de sua realização:

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

7 **M1** – (Momento 1): após refrigeração por 24horas, ao início do teste de exaustão;

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

10 **M3** – (Momento 3): após refrigeração por 24horas, e com 240 minutos do início do teste
11 de exaustão;

12 **M4** – (Momento 4): após refrigeração por 48horas, ao início do teste de exaustão;

13 **M5** – (Momento 5): após refrigeração por 48horas, e com 120 minutos do início do teste
14 de exaustão;

15 **M6** – (Momento 6): após refrigeração por 48horas, e com 240 minutos do início do teste
16 de exaustão.

17 **Confecção dos meios diluentes**

18 Foram confeccionados três meios com base no diluente Glicina Gema Leite e
19 isentos de glicerol (GONZALEZ et al., 1996) (Anexo I) sendo na formulação original
20 empregada a gema de ovo *in natura* (20%), constituindo-se o controle (GGL), e os outros
21 dois denominados meio Glicina Gema purificada Leite (GGpL) pela completa substituição
22 do constituinte gema de ovo pela gema de ovo purificada na formulação e meio Glicina
23 Extrato Leite (GEL) pela completa substituição do constituinte gema de ovo pelo extrato
24 de LBD na formulação.

25 Foram coletadas as gemas de dez ovos frescos provenientes de galinhas criadas e
26 mantidas em sistemas de produção segundo o conceito *orgânico* e com alimentação
27 variada. Os ovos foram quebrados manualmente sendo separada a gema do albúmen. Para
28 total remoção da chalaça e dos restos de albúmen impregnados na membrana vitelínica, as
29 gemas foram cuidadosamente roladas em papel filtro, após foram mecanicamente rompidas
30 e o seu conteúdo coletado em um copo Becker mantido em gelo, formando um “pool” de
31 aproximadamente 150 ml. Este “pool” foi dividido em 3 frações para confecção dos meios

1 diluidores, Glicina Gema Leite (GGL) com gema *in natura*; meio com gema
2 centrifugada/dialisada/centrifugada (GGpL); e meio com extrato das LBD (GEL).

3 **Purificação da gema de ovo**

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

7 Parte do “pool” das gemas de ovo, foi separada, e diluída 1:1 em solução salina
8 isotônica (0,17 M NaCl) e misturada por uma hora em um agitador vortex, e sob
9 refrigeração a 4°C, sendo em seguida centrifugada (**1^acent.**) a 10.000xg por 45 minutos à
10 4°C e o sobrenadante centrifugado (**2^acent.**) novamente sob refrigeração por igual tempo e
11 intensidade, para remoção completa dos grânulos. Depois das duas centrifugações o
12 sobrenadante, livre de grânulos, foi colocado para ser dialisado por um período mínimo de
13 8 horas tendo como eluente a água destilada, em reservatório de troca de 1000mL, num
14 sistema de fluxo contínuo com volume de troca de 125 ml/hora e em temperatura
15 controlada entre 4 e 5,5°C. Foi utilizada membrana de celulose regenerada, com tamanho
16 de 33x21mm, peso molecular de 12.000-16.000 e porosidade de 25 angstroms (INLAB
17 Diagnóstica – Cód. 133 – Diadema – SP). Após a diálise foi realizada nova centrifugação
18 (**3^acent.**) por 45 minutos a 10.000xg. sob refrigeração a 4°C. O sobrenadante purificado foi
19 coletado e armazenado no freezer de -20°C em tubos do tipo Falcon de 50 ml, para
20 posterior confecção do meio diluente (GGpL) para refrigeração.

21 **Extração das lipoproteínas de baixa densidade**

22 A extração das lipoproteínas de baixa densidade (LBD) foi realizada seguindo o
23 método descrito por Moussa et al., (2002). Para isto a gema de ovo foi diluída 1:1 com
24 solução salina isotônica (0,17 M NaCl) e misturada por uma hora em um agitador vortex, e
25 sob refrigeração a 4°C., em seguida centrifugada (**1^acent.**) por 45 minutos à 4°C por
26 10.000xg e o sobrenadante centrifugado (**2^acent.**) novamente por igual tempo, intensidade
27 e temperatura, para remoção completa dos grânulos. O plasma da gema de ovo foi
28 misturado com o sulfato de amônia saturado a 40% por uma hora no mesmo sistema
29 fechado e refrigerado e com solução de hidróxido de sódio (NaOH 0,1 M), e ajuste ao
30 pH8,7 em temperatura de 4°C. Na sequência a solução foi centrifugada (**3^acent.**) a
31 10.000xg por 45 minutos à 4°C, sendo o sobrenadante coletado para ser dialisado por um
32 período mínimo de 8 horas tendo como eluente a água destilada, em reservatório de troca

1 de 1000mL, num sistema de fluxo contínuo com volume de troca de 125 ml/hora e em
2 temperatura controlada entre 4 e 5,5°C. Foi utilizada membrana de celulose regenerada,
3 com tamanho de 33x21mm, peso molecular de 12.000-16.000 e porosidade de 25
4 angstroms. Cada membrana tinha capacidade máxima, calculada conforme dimensões, de
5 90 ml. Observava-se o máximo preenchimento da membrana para minimizar a entrada de
6 eluente, evitando-se a diluição da solução. Após a diálise, foi realizada a última
7 centrifugação (*4^{cent.}*), novamente a 10.000xg por 45 minutos e o sobrenadante residual,
8 rico em LBD foi coletado.

9 O extrato foi então acondicionado em tubos do tipo Falcon de 50 ml, armazenados
10 em freezer de -20°C, para posterior confecção do meio diluente (GEL) para refrigeração.

11 **Colheita e diluição do sêmen**

12 O volume ejaculado foi determinado pela graduação do copo coletor e dez
13 microlitros (μL) de sêmen foram diluídos em quatro mililitro (ml) de água destilada (taxa
14 de diluição de 1:400 – volume:volume – v:v) para determinação da concentração
15 espermática em câmara de Neubauer.

16 Determinada a concentração espermática foram feitas as diluições do ejaculado à
17 37°C para posterior refrigeração. Cada uma das amostras de sêmen obtidas foi diluída na
18 proporção final de 1×10^8 espermatozoides/100 μL , nos três meios diluidores, sendo
19 constituídas duas alíquotas para cada tratamento a fim de que uma fosse refrigerada por 24
20 horas e outra por 48 horas, perfazendo-se então seis alíquotas para cada uma das coletas.
21 Cada alíquota foi colocada em microtubos de fundo cônico de polipropileno de 600 μL , de
22 tal maneira a ocupar a capacidade máxima do microtubo e que nenhum espaço ficasse após
23 o seu fechamento, que pudesse conter bolha de ar.

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

28 **Refrigeração e teste de exaustão do sêmen**

29 Realizadas as análises, as alíquotas foram transferidas a um dispositivo (BICUDO
30 et al., 1991) com capacidade para 12 microtubos (2 carneiros, 6 amostras cada um), que
31 havia sido mantido em estufa a 37°C. O conjunto foi então levado à geladeira Minitube, já
32 previamente resfriada a 5°C, e mantido lá por 48 horas. As amostras destinadas a análise e

1 teste de exaustão, após 24 horas de refrigeração, foram retiradas todas de uma só vez,
2 reduzindo-se assim o tempo de abertura da geladeira e evitando-se o risco de elevação da
3 temperatura interna. Após 48 horas de refrigeração o dispositivo era retirado com as
4 alíquotas remanescentes para análise e teste de exaustão. Foram utilizados
5 simultaneamente três dispositivos de refrigeração para realização do experimento.

6 Após 24 horas, avaliou-se uma alíquota de sêmen de cada grupo (**M1**).
7 Previamente, as amostras foram transferidas para microtubos de fundo cônico de
8 polipropileno de 1,5 ml, aquecidas e estabilizadas em bloco térmico à 37°C, sendo
9 acrescido 30% do meio diluente original à alíquota inicial (PAGANINI FILHO, 1999) em
10 cada tratamento (GGL, GGpL e GEL). A seguir realizou-se uma diluição de 1:20 (v:v) em
11 solução X-Cell[®] para proceder-se as análises computadorizada das motilidades.

12 Os mesmos procedimentos e análises foram realizados após 48 horas de
13 refrigeração (**M4**) com as alíquotas remanescentes na geladeira Minitube.

14 Após a retirada da geladeira Minitube e das análises pós-refrigeração, as alíquotas
15 foram submetidas a um teste de exaustão no bloco térmico a 37°C durante 240 minutos
16 (PAGANINI FILHO, 1999) sendo repetidas as análises computadorizada das motilidades
17 aos 120 minutos (**M2 e M5**) e 240 minutos (**M3 e M6**) da incubação. Esse teste foi feito
18 tanto para as alíquotas refrigeradas por 24 horas, quanto às refrigeradas por 48 horas.

19 **Análise computadorizada da cinética espermática (CASA)**

20 A análise da cinética espermática foi realizada utilizando-se Hamilton Thorn
21 Motility Analyser – HTMA (IVOS 12 – Hamilton Research – Beverly, MA, USA) em
22 câmara de Makler a 37°C. Avaliaram-se em três campos, o primeiro escolhido pelo
23 operador e outros dois aleatórios, os parâmetros (SOUSA et al., 1999):

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

26 **Análise estatística**

27 Como havia interesse em se comparar os tratamentos e os momentos (Teste de
28 Exaustão), os dados foram analisados em um delineamento de blocos ao acaso, com três
29 tratamentos (GGL, GGpL e GEL), 7 momentos (momento 0, momento 1, momento 2,
30 momento 3, momento 4, momento 5 e momento 6) e 5 blocos (carneiros). Para a análise
31 dos dados utilizaram-se as médias dos valores obtidos das quatro amostras. Como as
32 variáveis apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias, foi utilizada a

1 análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey. O nível de significância
2 utilizado foi de 5% (FISHER & BELLE, 1993). Foi utilizado o programa SPSS 16.0 para
3 *software* Windons[®] (Statistical Package for Social Sciences, Inc., Chicago, IL, EUA).

4 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

5 Os valores médios e respectivos desvios padrão das motilidades total (MT) e
6 progressiva (MP) após as diluições nos meios Glicina Gema Leite (GGL), Glicina Gema
7 purificada Leite (GGpL) e Glicina Extrato Leite (GEL), após a refrigeração e teste de
8 exaustão em todos os momentos, são apresentados na Tabela 1.

9 A gema de ovo é um componente comum na composição da maioria dos meios
10 diluidores, protegendo as células espermáticas contra o choque térmico e osmótico durante
11 o processo de criopreservação (MAXWELL & SALAMON, 1993; MAXWELL &
12 WATSON, 1996; SALAMON & MAXWELL, 2000; BARBAS & MASCARENHAS,
13 2009).

14 Numerosos estudos têm demonstrado que existe uma grande variação na
15 composição da gema de ovo quanto aos níveis de ácidos graxos, fosfolipídios e colesterol,
16 devido à linhagem das galinhas, idade do ovo e nutrição das aves, resultando em diferenças
17 na criopreservação (SU et al., 2008; SILVA et al., 2008).

18 A gema de ovo atua na superfície da membrana plasmática, restaurando a perda de
19 fosfolipídios e, aparentemente, induzindo alteração transitória de sua composição,
20 prevenindo a ruptura da membrana plasmática (FARSTARD, 1996). Os fosfolipídios que
21 compõe a fração das lipoproteínas de baixa densidade (LBD) da gema de ovo protegem o
22 sêmen, especificamente durante o processo de refrigeração a 5 °C (MEDEIROS et al.,
23 2002; MOUSSA et al., 2002).

24 No presente estudo os vinte ejaculados obtidos dos cinco carneiros apresentaram
25 volume médio de $1,41 \pm 0,26$ ml e uma concentração média de $4,71 \pm 1,08 \times 10^9$
26 espermatozoides/ml. O sêmen utilizado para as avaliações encontrava-se dentro dos
27 padrões esperados para a espécie, pois segundo Henry & Neves (1996) e Karagiannidis et
28 al., (2000), o volume médio do ejaculado ovino é de aproximadamente 0,7 a 2 ml e para
29 Boundy (1993) o sêmen ovino de boa qualidade contem aproximadamente de 3,5 a 6,0 x
30 10^9 espermatozoides/ml.

31 O procedimento de diluição na solução de X-Cell[®] fez-se necessário pela alta
32 concentração espermática das amostras, que inviabiliza as análises computadorizada,

1 devido ao cruzamento das trajetórias dos espermatozoides, e para facilitar a análise de
2 integridade das membranas espermáticas, ratificando observações feitas em equinos por
3 Varner et al., (1991), Malmgren (1997) e Ferreira (2000).

4 Comparando-se os tratamentos (GGL, GGpL e GEL), a media da motilidade total
5 (MT) não houve diferença significativa ($P>0,05$) em nenhum dos momentos. Na
6 comparação das medias de motilidade progressiva (MP) houveram 2 momentos onde
7 houve uma diferença significativa ($P<0,05$) entre os tratamentos. No **M2** (momento 2; teste
8 de exaustão com 120 minutos) a media do tratamento GGpL (39,7%) foi superior ao
9 tratamento controle GGL (21,5%) e igual ao tratamento GEL (28,9%). No **M4** (momento
10 4) pós 48 horas de refrigeração a media do tratamento GEL (49,2%) foi superior a do
11 tratamento GGL (31,2%) e igual a do tratamento GGpL (41%).

12 Na refrigeração, os espermatozoides submetidos à variação de temperatura,
13 principalmente entre 30 e 0°C, sofrem uma perda prematura da motilidade e redução da
14 produção de energia (WATSON, 2000; MEDEIROS et al., 2002).

15 Gil et al. (2003), comparando o efeito sobre os parâmetros espermáticos durante a
16 refrigeração a 5°C, entre um meio a base de leite contendo 5% (M5), 10% (M10), 15%
17 (M15) e 20% (M20) de gema de ovo, glicerolizado a 15°C com um meio comercial
18 (Bioexcell[®] - IMV, L'Aigle, França), observaram que não houve diferença significativa no
19 aumento da concentração de gema de ovo acima de 10%, nas motilidades total/progressiva
20 (M5 – 82/66%, M10 – 81/62%, M15 – 84/61% e M20 – 82/61%).

21 Moussa et al. (2002) ao desenvolverem o método de extração, utilizado como base
22 deste experimento, fez 2 experimentos com sêmen bovino comparando dois meios
23 diluentes, Triladyl[®] (Minitube, Tiefenbach, Alemanha) a base de gema de ovo e
24 Biociphos[®] (IMV, L'Aigle, França). No primeiro experimento utilizaram diferentes
25 concentrações do extrato de LBD (2,5, 5, 10, 15 e 20%) no meio em comparação aos meios
26 Triladyl[®] e Biociphos[®]. Obtiveram resultados significativamente superiores para os
27 parâmetros de motilidade para os meios Biociphos[®] e o meio com 10% de LBD em
28 comparação ao meio Triladyl[®]. No segundo experimento compararam as concentrações
29 entre 5 e 10% de LBD com os meios Triladyl[®] e Biociphos[®]. Chegaram à conclusão que a
30 concentração ideal de LBD no meio é de 8% onde teve diferenças significativas ($P<0,05$)
31 para os parâmetros de motilidade em comparação ao meio Triladyl[®]. Quando comparado
32 ao meio Biociphos[®] não houve diferença significativa ($P>0,05$) nos parâmetros estudados.

1 Corcine et al. (2004) estudando sêmen canino resfriado a 5°C obtiveram melhores
2 resultados de motilidade com a utilização das LBD. No experimento utilizou como base o
3 meio diluente Tris-Glucose (TG) com diferentes concentrações de LBD (6, 8 e 10%)
4 comparado ao controle com 20% de gema de ovo. Os parâmetros de motilidade foram
5 avaliados com 24, 48, 72 e 96 horas e em todos os momentos a diferença foi significativa
6 ($P<0,01$) do controle em comparação com os meios com LBD.

7 Hu et al. (2011) estudaram os parâmetros pós-descongelamento do sêmen bovino com
8 meios a base de Tris contendo LBD (7, 8, 9% e 20% controle). Obteve diferença
9 significativa ($P<0,05$) superior para o parâmetro de motilidade o meio com 8% de LBD.

10 Com relação à Motilidade Total (MT) não houve diferença significativa ($P>0,05$)
11 entre o **M0** (momento 0), **M1** e **M4** (momentos 1 e 4; pós-refrigeração 24 e 48 horas) para
12 todos os tratamentos. Entretanto, observou-se diferença significativa ($P<0,05$) nos valores
13 da motilidade total (MT) no teste de exaustão em relação aos momentos iniciais. Para
14 Maxwell & Salamon (1993), a redução da motilidade e da integridade morfológica dos
15 espermatozoides foram às mudanças mais observadas na refrigeração do sêmen ao longo
16 do tempo. Sousa (2002), avaliando o desempenho do container Equitainer[®] (Hamilton-
17 Thorne Research, Beverly, MA, USA), sistema de refrigeração e transporte, no sêmen de
18 ovino utilizando o meio GGL com 20 % de gema de ovo, obteve diferença significativa
19 ($P<0,05$) para o parâmetro de motilidade total (MT) entre os momentos pós-refrigeração e
20 teste de exaustão condizendo com os resultados obtidos neste experimento.

21 Como no trabalho de Sousa (2002) ao final das 4 horas do teste de exaustão, o
22 sêmen refrigerado por 24 horas mostrou-se superior ao refrigerado por 48 horas para os
23 parâmetros de MT e MP. Apesar de não avaliado, este fato pode ser atribuído por hipótese
24 ao maior consumo energético durante o período de refrigeração, com consequente posterior
25 redução do metabolismo e morte celular ou a lesões morfofuncionais dos espermatozoides.

26 **CONCLUSÃO**

27 A gema de ovo “purificada” e o extrato de lipoproteínas de baixa densidade podem
28 substituir a gema de ovo *in natura* no meio diluente Glicina Gema Leite, sem alterar os
29 parâmetros de motilidade do sêmen ovino refrigerado.

30
31 **Projeto de pesquisa aprovado no CEEA número: 200/2008.**

32

1 REFERÊNCIAS

- 2 AMIRAT, L.; TAINURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GÉRARD, O.;
- 3 COURTENS, J.L.; ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after criopreservation using
- 4 egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender.
- 5 **Theriogenology**, v.61, p.895-907, 2004.
- 6 BARBAS, J.P.; MASCARENHAS, R.D. Cryopreservation of domestic animal
- 7 sperm cells. **Cell Tissue Bank**. v.10, p.49-62, 2009.
- 8 BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms
- 9 of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular and Reproduction and**
- 10 **Development**, v.73, p.1338-1344, 2006.
- 11 BICUDO, S.D.; PASCHOAL, J.P.S; RIBEIRO, E.F.R.; PAPA, F.O. Dispositivo de
- 12 incubação para o resfriamento de sêmen em pequenos volumes. **Revista Brasileira de**
- 13 **Reprodução Animal**, (Supl. 2) p.456, 1991.
- 14 BOUNDY, T. Collection and interpretation of ram semen under general practice
- 15 conditions. **In Pract.**, v. 15, p 219-23, 1993.
- 16 BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J.P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GUÉRIN, B.;
- 17 CAMUS, A.; LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk
- 18 sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk
- 19 or lecithin based diluents. **Theriogenology**, v.50, p.699-706, 1998.
- 20 CORCINE, C.D.; VARELA Jr., A.S.; ULGUIN, R.R.; BIANCHI, I.; ALVARENGA,
- 21 M.V.F. *et al.* **Efeito da lipoproteína de baixa densidade da gema de ovo sobre a**
- 22 **qualidade do sêmen canino resfriado a 5°C**. IN: Congresso de Iniciação Científica,
- 23 Universidade Federal de Pelotas XIII, 2004, Pelotas-RS. **Anais...**
- 24 http://www.ufpel.edu.br/cic/2004/arquivos/CA_01100.rtf acesso em 29/08/2008.
- 25 FARSTARD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction**
- 26 **Science**, v. 42, p. 251-260, 1996.
- 27 FERREIRA, J.C.P. **Avaliação subjetiva e computadorizada do movimento espermático**
- 28 **pós-descongelção do sêmen eqüino**. Botucatu, 2000. Tese (Doutorado em Medicina
- 29 Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual
- 30 Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- 31 FISHER, L.D.; BELLE, G.V. **Biostatistics A Methodology for the health**
- 32 **Sciences**.Wiley-Interscience, New York, 991p, 1993.

- 1 GIL, J.; RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M.; LUNDEHEIM, N.; SÖDERQUIST, L.;
2 RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell[®] and used for
3 cervical artificial insemination. **Theriogenology**, v.59, p.1157-1170, 2003.
- 4 GONZALEZ, C.I.M.; OBA, E.; BICUDO, S.D.; SOUZA, M.I.L. Cryopreservation of
5 semen in Ideal rams with glycine-egg yolk-extender. In: International Congress of Animal
6 Reproduction, 13, 1996, Sydney. **Proceedings...**Sidney, p. 2-9, 1996.
- 7 HENRY, M.; NEVES, J. P. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de**
8 **sêmen Animal**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - Cbra, p.40-5,
9 1996.
- 10 HU, J.-H.; JIANG, Z.-L.; LV, R.-K.; LI, Q.-W.; ZHANG, S.-S.; ZAN, L.-S.; LI, Y.-K.; LI,
11 X.; The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen.
12 **Cryobiology**, v.62, p.83-87, 2011.
- 13 KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S.; ALEXOPOULOS, C.; AMARANTIS, I.
14 Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. **Small**
15 **Ruminant Res.**, v. 37, p. 125-30, 2000.
- 16 MALMGREM, L. Assessing the quality of raw semen: a review. **Theriogenology**, v.48,
17 p.523-530, 1997.
- 18 MAXWELL, W.M.C.; SALAMON, S. Liquid storage of ram semen: a review. **Reprod.**
19 **Fertil. Dev.**, v. 5, p. 613-38, 1993.
- 20 MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen.
21 **Anim. Rep. Sci.**, v.42, p.55-65, 1996.
- 22 MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Current
23 status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, p.327-344,
24 2002.
- 25 MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low
26 density lipoproteins extracted from hen Egg yolk by an easy method: cryoprotective effect
27 on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.57, p.1695-706, 2002.
- 28 PAGANINI FILHO, P. **Estudo da viabilidade do sêmen ovino frente a três diluentes**
29 **em temperatura de 37°C e sob-refrigeração**. Botucatu, 1999. Dissertação (Mestrado em
30 Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade
31 Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

- 1 SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Anim. Rep. Sci.**, v.62, p.77-
2 111, 2000.
- 3 SILVA, M.C.; SNOECK, P.P.N.; SILVAS, S.C.B. *et al.* **Efeito da lipoproteína de baixa**
4 **densidade sobre a viabilidade dos espermatozoides ovinos resfriados.** In: 35°
5 CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2008, Gramado. **Anais...**
6 Gramado: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 2008.
- 7 SOUSA, D.B. **Viabilidade do sistema Equitainer[®] na refrigeração do sêmen ovino**
8 **avaliado pelas análises computadorizada, de microscopia epifluorescente e**
9 **inseminação artificial.** Botucatu, 2002. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária),
10 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de
11 Mesquita Filho”.
- 12 SU, L.; LI, X., QUAN, J.; YANG, S.; LI, Y.; HE, X.; TANG, X. A comparison of the
13 protective action of added egg yolk from five avian species to the cryopreservation of bull
14 sperm. **Animal Reproduction Science** v.104, p.212-219, 2008.
- 15 VARNER, D. D., VAUGHAN, S. D., JOHNSON, L. Use of a computerized system for
16 evaluation of equine spermatozoal motility. **Am. J. Vet. Res.**, v. 52, p. 224-30, 1991.
- 17 WATSON, P.F. The causes of reduce fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod.**
18 **Sci.**, v.60-1, p.481-492, 2000.
- 19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

1 **IMPLICAÇÕES DA UTILIZAÇÃO DO EXTRATO DE LIPOPROTEINAS DE**
 2 **BAIXA DENSIDADE EM SUBSTITUIÇÃO A GEMA DE OVO, SOBRE A**
 3 **MOTILIDADE TOTAL E PROGRESSIVA DO SÊMEN OVINO REFRIGERADO**
 4 **POR 24 E 48 HORAS**

5
 6
 7 **TABELA 1:** Médias \pm desvio padrão dos parâmetros de cinética espermática (motilidades)
 8 avaliados no sistema computadorizado do sêmen ovino pré-refrigeração (M0), pós-refrigeração 24
 9 (M1) e 48 (M4) horas, teste de exaustão 24 horas 120 (M2) e 240 (M3) minutos e 48 horas 120
 10 (M5) e 240 (M6) minutos nos grupos GGL, GGpL e GEL.

Meios	Refrigeração (h)						
	M0	24			48		
		M1	M2	M3	M4	M5	M6
MT (Motilidade total - %)							
GGL	91,8 ^a $\pm 4,2$	87,4 ^a $\pm 14,4$	49,0 ^b $\pm 25,1$	8,9 ^c $\pm 14,3$	71,7 ^{ab} $\pm 27,7$	23,5 ^c $\pm 18,7$	5,1 ^c $\pm 9,2$
GGpL	90,4 ^a $\pm 6,0$	90,5 ^a $\pm 6,9$	66,8 ^{bc} $\pm 23,1$	14,0 ^{cd} $\pm 22,0$	74,3 ^{ab} $\pm 20,0$	28,8 ^c $\pm 23,0$	4,4 ^d $\pm 7,8$
GEL	90,5 ^a $\pm 5,4$	90,6 ^a $\pm 4,6$	49,6 ^b $\pm 37,5$	6,9 ^c $\pm 14,4$	83,4 ^a $\pm 18,8$	39,7 ^a $\pm 37,1$	10,6 ^c $\pm 27,8$
MP (Motilidade progressiva - %)							
GGL	62,1 ^a $\pm 8,0$	51,1 ^a $\pm 14,4$	21,5 ^{bcB} $\pm 16,8$	3,2 ^d $\pm 7,0$	31,2 ^{bB} $\pm 17,3$	6,1 ^{cd} $\pm 6,3$	0,9 ^d $\pm 2,8$
GGpL	64,6 ^a $\pm 5,2$	61,8 ^a $\pm 10,2$	39,7 ^{bA} $\pm 19,8$	6,9 ^c $\pm 13,7$	41,0 ^{bAB} $\pm 17,7$	11,3 ^c $\pm 14,3$	1,3 ^c $\pm 3,7$
GEL	66,4 ^a $\pm 4,6$	56,9 ^{ab} $\pm 14,2$	28,9 ^{cAB} $\pm 23,9$	2,4 ^e $\pm 6,3$	49,2 ^{bA} $\pm 18,9$	21,0 ^{cd} $\pm 22,7$	5,7 ^{de} $\pm 15,9$

11 Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si a $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.
 12 Para o mesmo parâmetro, médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si a $P < 0,05$
 13 pelo teste de Tukey.
 14 - **GGL** - Meio Glicina Gema Leite;
 15 - **GGpL** - Meio Glicina Gema purificada Leite;
 16 - **GEL** - Meio Glicina Extrato Leite.

11. ANEXO I

11.1. MEIO PARA REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN

INGREDIENTE	MEIO DILUIDOR		
	GGL	GGpL	GEL
Solução A			
Glicina - Botica ao veado d'ouro	0,42g	0,42g	0,42g
Citrato de sódio	0,89g	0,89g	0,89g
Água destilada	30mL	20mL	30mL
Solução B			
Frutose	0,9g	0,9g	0,9g
Água destilada	30mL	20mL	30mL
Solução A+B			
Aminacina	0,012g	0,012g	0,012g
MEIO I			
Solução A+B	60mL	40mL	60mL
Gema de ovo	20mL	40mL	20mL
Orvus es Paste - OEP – Procter & Gambler	0,4mL	0,4mL	-
Leite desnatado 11% - La Serenissima	15mL	15mL	15mL
Água destilada	4,6mL	4,6mL	5mL

11.2. SOLUÇÃO DE X-CELL[®] (IMV Thechnologies (IMV), França).

FÓRMULA DO X-CELL[®]	
Glucose Anidra	76,6g
Citrato de Sódio Bi-hidratado	14,3g
Bicarbonato de Sódio	2,6g
EDTA	8,6g
Cloreto de Potássio	2,5g
Sulfato de Gentamicina	0,4g

SOLUÇÃO DE X-CELL[®]	
X-Cell [®]	43,4g
Água Mili Q (qsp)	1000mL

Obs.: - pH e Osmolaridade da em torno de 6,89 e 274 mOsm/Kg respectivamente;
- armazenar a 5°C.

**11.3. SONDAS FLUORESCENTES DIACETATO DE
 CARBOXIFLUORESCEINA E IODETO DE PROPÍDIO (HARRISON e VICKERS,
 1990).**

SOLUÇÃO ESTOQUE

SOLUÇÃO DE FORMALDEÍDO (2,5mg/ml)

Formaldeído a 37%	10 μ L
Água destilada	1500 μ L
Armazenar entre 4 a 8°C por no máximo 4 dias	

SOLUÇÃO DE DIACETATO DE CARBOXIFLUORESCEINA (DIC)

Diacetato de carboxifluoresceína	0,46mg
DMSO	1mL
Após o preparo armazenar protegido da luz a -20°C	

SOLUÇÃO DE IODETO DE PROPÍDIO (IP)

Iodeto de propídio	0,5mg
Solução salina isotônica	1mL
Após o preparo armazenar protegido da luz a -20°C	

SOLUÇÃO DE TRABALHO

Solução Salina	1mL
Solução de formaldeído	20 μ L
Solução de DIC	20 μ L
Solução de IP	10 μ L

11.4. SOLUÇÃO DE PBS E SOLUÇÃO DE GLUTARALDEÍDO a 0,2% (BARTH e OKO, 1989).

Solução estoque de NaH_2PO_4

NaH_2PO_4 (Sigma – S5011)	0,8g
Água destilada q.s.p.	100mL

Solução estoque de Na_2HPO_4

Na_2HPO_4	0,947g
Água destilada q.s.p.	100mL

Solução final de PBS

Solução estoque de NaH_2PO_4	30,0mL
Solução estoque de Na_2HPO_4	70,0mL
NaCl (JT-Baker – 3624-19)	0,45g

Solução de Glutaraldeído a 0,2%

Solução de Glutaraldeído a 50% (Vetec – S0805)	0,4mL
PBS (q.s.p.)	100,0mL

Armazenar a 5°C

11.5. "HAMILTON THORNE SETUP FOR IVOS-12"

ANALYSIS SETUP - RAM		
IMAGE CAPTURE		
Frames Per Sec.		60Hz
No. of Frames		30
CELL DETECTION		
Minimum Contrast		60
Minimum Cell Size		5pix
DEFAULTS (if < 5 Motile Cells)		
Cell Size		5pix
Cell Intensity		55
PROGRESSIVE CELLS		
Path Velocity (VAP)		75 μ /s
Straightness (STR)		80,0%
SLOW CELLS		
Slow Cells		Static
VAP Cutoff		21,9 μ /s
VSL Cutoff		6,0 μ /s
STATIC GATES (on QC Plots)		
MINIMUM		MAXIMUM
0.25	Static intensity gates	1,50
0.60	Static size gates	8,00
0	Static elongation gates	95
CALIBRATION		
Magnification		1,95
VIDEO SOURCE		
Frequency		60Hz
Field		Dark
ILUMINATION		
Intensity		
Photometer	Low	73
	High	125
ANALYSIS CHAMBER		
Chamber type		Makler
Chamber depth		10.0 μ m
Stage position		14.3mm
Field selection		Automatic
Set stage temperature		37°C

