

IMPLICAÇÕES DA REDUÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE GEMA DE OVO NO MEIO GLICINA-GEMA-LEITE SOBRE A CINÉTICA, MORFOLOGIA E INTEGRIDADE DE MEMBRANAS ESPERMÁTICAS EM SÊMEN OVINO CRIOPRESERVADO

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

RESUMO

Este estudo foi conduzido para determinar os efeitos da redução na proporção da gema de ovo no meio diluidor Glicina-Gema-Leite (GGL), utilizando-se quatro reprodutores da raça Santa Inês e quatro da raça Dorper. Quatro ejaculados por reprodutor foram colhidos com vagina artificial. Após as avaliações macro e microscópicas, o sêmen foi mantido a 32°C e diluído para atingir-se concentração de 400×10^6 espermatozoides/mL nos meios contendo 20 % (GGL20), 15 % (GGL15), 10 % (GGL10) ou 5 % (GGL5) (v/v) de gema de ovo, e então envasado em palhetas de 0,25 mL (IMV, France), refrigerado e congelado em sistema com controle automatizado. A descongelação foi feita em banho-maria à 40°C/20 segundos. A cinética espermática foi determinada em sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA). A morfologia espermática avaliada em microscopia de contraste de fase por meio de preparações úmidas e a integridade de membranas espermáticas verificada pela combinação dos fluorocromos diacetato de carboxifluoresceína (DIC) e iodeto de propídio (IP), em microscopia de epifluorescência. As motilidades espermáticas total (MT) e progressiva (MP) nos tratamentos GGL10 e GGL5 foram maiores ($P < 0,05$) do que no GGL20. O sêmen criopreservado nos meios GGL10 e GGL5 apresentou maior percentual de espermatozoides com membranas íntegras do que no meio GGL20 ($P < 0,05$). Em conclusão, é possível reduzir a proporção de gema de ovo do meio diluidor Glicina-Gema-Leite para até 5% (v/v), sem alterar parâmetros qualiquantitativos do sêmen ovino criopreservado.

Palavras chave: criopreservação; diluidor; gema de ovo; sêmen ovino.

IMPLICATIONS OF REDUCTION IN CONCENTRATION OF EGG YOLK IN THE EXTENDER GLYCINE-YOLK-MILK ON THE KINETICS, MORPHOLOGY AND SPERMATOOA MEMBRANES INTEGRITY IN SEMEN CRYOPRESERVED OVINE

ABSTRACT

This study was conducted to determine the effects of reduction in the proportion of egg yolk in the extender Glycine-yolk-milk (GGL), using four Santa Ines rams and four Dorper rams. Four ejaculates per ram were obtained by artificial vagina. After the macro and microscopic evaluation the semen was kept at 32°C and diluted to achieve concentrations up to 400×10^6 spermatozoa/mL in the extender containing 20 % (GGL20), 15 % (GGL15), 10 % (GGL10)

¹ Pós-graduando, DRARV- FMVZ – UNESP, Botucatu-SP. Leandro Rodello, Rua Manoel José A. L. Gimenes, 288, CEP 18609-390, Botucatu-SP, Fone: (14) 3814-0833 e-mail: rodellovet@hotmail.com

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

or 5 % (GGL5) (v/v) of egg yolk, and packaged in 0.25 mL straws (IMV, France), cooled and frozen in automated control system. Thawing was performed in a water bath at 40°C/20 seconds. Sperm kinetics was determined in computer-assisted semen analysis (CASA). Morphology of spermatozoa were observed using a wet preparation examined under phase-contrast microscopy and the integrity of sperm membranes was verified by the combination of the probes fluorochromes carboxyfluorescein diacetate (DIC) and propidium iodide (IP), under fluorescence microscopy. The total sperm motility (MT) and progressive motility (MP) in treatments, GGL10 and GGL5 were higher ($P<0.05$) than in GGL20. Semen cryopreserved in both extender, GGL10 and GGL5 had the highest percentage of sperm with intact membranes than in GGL20 ($P<0.05$). In conclusion, it is possible to reduce the proportion of egg yolk in extender Glycine-yolk-milk up to 5 % (v/v) without alteration on the qualitative and quantitative parameters of cryopreserved ovine semen.

Key words: cryopreservation; extender; egg yolk; ovine semen.

IMPLICACIONES DE LA REDUCCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE YEMA DE HUEVO EN EL MEDIO GLICINA-YEMA-LECHE SOBRE LA CINÉTICA, MORFOLOGÍA E INTEGRIDAD DE MEMBRANAS ESPERMÁTICAS EN SEMEN OVINO CRIOPRESERVADO.

RESUMEN

Este estudio se realizó para determinar los efectos de la reducción del porcentaje de yema de huevo en el diluyente Glicina-Yema-Leche (GYL), con cuatro carneros de la raza Santa Inés y cuatro de la raza Dorper. Cuatro eyaculados de cada carnero fueron colectados por la vagina artificial. Después de evaluaciones macro y microscópicas, el semen fue mantenido a 32 ° C y diluido hasta alcanzar la concentración de 400×10^6 espermatozoides/mL en diluyentes conteniendo 20 % (GYL 20), 15 % (GYL 15), 10 % (GYL 10) o 5 % (GYL 5) (v/v) de yema de huevo, y embotellado en pajuelas de 0,25 mL (IMV, Francia), refrigerados y congelados en el sistema con control automatizado. La descongelación fue hecha en baño maría a 40°C/20 segundos. La cinética espermática fue determinada en el sistema computarizado de análisis de semen (CASA). La morfología espermática se evaluó en microscopio de contraste de fase por medio de preparación húmeda y la integridad de las membranas espermáticas observada por la combinación de fluorocromos diacetato de carboxifluoresceína (DIC) y yoduro de propidio (YP), en la microscopía de fluorescencia. Las motilidades espermáticas total (MT) y progresiva (MP) en los tratamientos GYL10 y GYL5 fueron mayores ($P<0,05$) de que en GYL20. El semen criopreservado en los diluyentes GYL10 y GYL5 presentó mayor porcentaje de espermatozoides con membranas intactas que en el diluyente GYL20 ($P<0,05$). En conclusión, es posible reducir la proporción de la yema de huevo del diluyente de Glicina-Yema-Leche hasta en 5 % (v/v) sin cambiar los parámetros cualitativos y cuantitativos del semen ovino criopreservado.

Palabras Clave: criopreservación; diluyente; yema de huevo; semen ovino.

INTRODUÇÃO

O processo de criopreservação é extremamente complexo e vários são os fatores que podem influenciar seus resultados, havendo sempre uma subpopulação de espermatozoides não adaptados a tal processo (1).

O diluidor exerce importante papel no processo da criopreservação e a variação em sua composição influencia as taxas de sobrevivência espermática após a congelação/descongelação. Nas últimas décadas, dezenas de formulações de meios diluidores têm sido propostas e vários tipos de substâncias crioprotetoras foram incorporados em suas composições. Os componentes com reconhecida ação crioprotetora atualmente mais utilizados são a gema de ovo (GO) e o glicerol (1, 2).

Devido a seu efeito benéfico sobre a conservação de espermatozóides, a incorporação de GO (1,5 a 50 %) ao diluidor em associação a outros ingredientes previnem o choque térmico, preserva a motilidade e a integridade das membranas plasmática e acrossomal (3). A gema de ovo atua também, como protetor osmótico, conferindo maior tolerância aos espermatozóides à soluções hipo e hiperosmóticas. A proteção que exerce durante a congelação se deve a sua adesão à membrana plasmática, especialmente dada pela fração lipoprotéica de baixa densidade (LDL) (4,5).

Porém, nos últimos anos a utilização de GO tem sido questionada devido à variabilidade em sua composição e o risco sanitário em veicular agentes microbiológicos específicos para regiões isenta desses agentes, aliada à deficiente rastreabilidade de sua origem. Há também um constante risco potencial de contaminação por micro-organismos como bactérias e micoplasmas, que podem acarretar geração de endotoxinas deletérias à capacidade fertilizante do espermatozóide (6). A uniformidade na preparação dos diluidores de sêmen contendo GO é difícil de ser atingida devido às suas características individuais, momento de sua utilização em relação ao da postura, espécie (7) e da alimentação das aves.

Atribui-se a GO presente no diluidor de sêmen de bodes efeito de redução no número de espermatozóides com integridade acrossomal (8), e em altas concentrações (50%) reduz a viabilidade espermática pós-descongelação em carneiros (9,10), cachacos e bovinos (10).

Vishwanath & Sannon (11), apontaram a GO como uma importante fonte de aminoácidos aromáticos para a formação de radicais livres, principalmente de H_2O_2 , e a taxa de formação de ROS teria relação direta com a da concentração de GO no meio diluente. Entretanto, ao reduzirem a concentração deste componente de 20 % para 5 % em meio de congelação, não constataram interferência sobre os índices de fertilidade.

O objetivo deste estudo foi testar as implicações da redução na proporção de gema de ovo do diluidor Glicina-Gema-Leite (GGL) sobre a cinética, morfologia e integridade de membranas espermáticas no sêmen ovino criopreservado.

MATERIAL E MÉTODOS

Colheita do sêmen

Foram utilizados quatro reprodutores da raça Santa Inês e quatro da raça Dorper, com idade de 10 a 84 meses e pesos entre 60 e 110 kg. O sêmen foi colhido com vagina artificial a temperatura de 42°C com copo coletor graduado pré-aquecido à 37°C. De cada reprodutor foram colhidos quatro ejaculados.

Após cada colheita o sêmen foi avaliado quanto ao aspecto e o volume pela graduação do copo coletor e mantido em banho-maria a 32°C. A concentração espermática foi realizada em câmara de Neubauer, com taxa de diluição 1:400.

Análise computadorizada da cinética espermática (CASA)

Para a avaliação a fresco e pós-descongelação, uma alíquota do sêmen foi diluída em X-Cell[®] (IMV, France), mantendo uma concentração final de aproximadamente 48×10^6

espermatozoides/mL (12). Em seguida seis microlitros (μL) do sêmen diluído foram transferidos para câmara de Makler (Makler Counting Chamber – Sefi-Medical, Haifa, Israel) aquecida a 37°C e submetida à CASA (Hamilton Thorn Motility Analyser - HTMA – IVOS 12 – Hamilton Research – Beverly, MA, USA). Em três campos definidos randomicamente foram avaliados os seguintes parâmetros: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos do flagelo (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

Os padrões utilizados para o ajuste do equipamento de análise foram: *frame per second: 60; frame acquire: 30; minimum contrast: 60; minimum cell size: 5pix; cell size: 5 pix; cell intensity: 55; path velocity (VAP): 75 μs ; straightness (STR): 80.0 %; slow cells: static; VAP cut off: 21.9 μs ; VSL cut off: 6.0 μs .*

Análise da Morfologia Espermática

Para a análise da morfologia espermática, 10 μL de sêmen foram diluídos em 500 μL de solução de Glutaraldeído à 0,2 % (13). A leitura foi realizada em microscopia de contraste de fase (Olympus BX-40, Tokyo, Japan) em aumento de 1000x sob imersão em preparações úmidas, colocando-se uma gota entre lâmina e lamínula e classificando-se 100 células por preparação, de acordo com Blom (14). Nas análises dos dados, enfocaram-se o percentual de espermatozoides com integridade de acrossomo (ACROS) e aqueles com cauda dobrada (CAUDA).

Análise de Integridade das membranas espermáticas

Para a análise de integridade das membranas espermáticas (IMB) do sêmen a fresco e pós-descongelamento, foi preparada uma solução de trabalho utilizando os fluorocromos diacetato de carboxifluoresceína (DIC) e iodeto de propídio (IP), descrito por Harrison & Vickers (15). Para realizar a análise, 50 μL da solução de trabalho foi depositado em microtubos de fundo cônico de polipropileno com capacidade para 1,5 mL, e em seguida acrescida uma alíquota de sêmen, resultando na concentração final de 10^7 espermatozoides/mL. Dessa suspensão 5 μL foi avaliada entre lâmina e lamínula em aumento de 400x em microscópio de epifluorescência (Leica DM LB, Germany) com filtro de excitação (BP) 450-490 nm, espelho dicromático 510 nm e filtro de supressão (LP) 515 nm.

Foram avaliadas 100 células/lâmina e distribuídas percentualmente (%) em duas categorias: Íntegros – espermatozoides com acúmulo de DIC (fluorescência verde) ao longo da cabeça e flagelo, sem acúmulo de IP (fluorescência vermelha), e Lesados - espermatozoides com acúmulo de IP ao longo da cabeça e flagelo, sem acúmulo de DIC; acúmulo de DIC na peça intermediária, acúmulo de IP na cabeça unicamente e acúmulo de fluorescência amarelada na região acrossomal; acúmulo de IP na cabeça e de DIC na peça intermediária.

Criopreservação do sêmen

Após as avaliações do ejaculado, as amostras do sêmen foram divididas em quatro tratamentos tendo como base e controle o diluidor GGL (16) com 20 % (v/v) de GO (GGL20, Osmolaridade: 277 mOsm e pH: 7,01); 15 % (v/v) de GO (GGL15, Osmolaridade: 287 mOsm e pH: 7,01); 10 % (v/v) de GO (GGL10, Osmolaridade: 279 mOsm e pH: 7,11) e 5 % (v/v) de GO (GGL5, Osmolaridade: 288 mOsm e pH: 7,20) (Tabela 1).

Rodello L. Implicações da redução na concentração de gema de ovo no meio glicina-gema-leite sobre a cinética, morfologia e integridade de membranas espermáticas em sêmen ovino criopreservado. Vet. e Zootec. 2011 jun.; 18(2): 239-248.

As diluições foram feitas em duas etapas em temperatura de 32°C: primeiramente a fração I não glicerolizada e em seguida a fração II glicerolizada. O sêmen diluído foi envasado em palhetas (IMV, France) de 0,25 mL na concentração final de 400×10^6 espermatozoides/mL e colocadas no sistema automatizado de refrigeração e congelamento (TK 3000[®], TK Congelações, Brasil). A refrigeração de 32°C a 5°C ocorreu a uma taxa de descenso de 0,5°C/min. Após um período de 90 minutos, realizava-se a curva de congelamento em duas etapas, a primeira na razão de 15°C/min (de 5°C à -80°C), e a segunda na razão de 10°C/min (de -80°C à -120°C), sendo então as palhetas submersas em nitrogênio líquido, acondicionadas em raques e armazenadas em botijão criogênico a -196°C.

Tabela 1. Composição dos diluidores Glicina-Gema-Leite com 20 % (GGL20), 15 % (GGL15), 10 % (GGL10) ou 5 % (GGL5) de gema de ovo.

COMPONENTE	MEIO DILUIDOR			
	GGL20	GGL15	GGL10	GGL5
FRAÇÃO I				
Solução A+B em partes iguais (mL)	60	65	70	75
Gema de ovo (mL)	20	15	10	5
<i>Orvus Es Paste</i> - OEP – Procter & Gambler (mL)	0,4	0,4	0,4	0,4
Leite desnatado 11% - La Serenissima (mL)	15	15	15	15
Água destilada (mL)	4,6	4,6	4,6	4,6
FRAÇÃO II				
Solução A+B em partes iguais (mL)	54	59	64	69
Gema de ovo (mL)	20	15	10	5
<i>Orvus Es Paste</i> – OEP (mL)	0,4	0,4	0,4	0,4
Leite desnatado 11% (mL)	15	15	15	15
Glicerol – Sigma, G2025 (mL)	10	10	10	10
SOLUÇÃO A				
Glicina - Sigma, G7126	1,4 g			
citrato de sódio – Sigma, S4641	2,97 g			
Água destilada	100 mL			
SOLUÇÃO B				
Frutose – Sigma, F3510	3,0 g			
Amicacina	0,04 g			
Água destilada	100 mL			

A descongelamento foi realizada em banho-maria a 40°C por 20 segundos. O sêmen foi depositado em um microtubo e mantido aquecido a 37°C para realizar a CASA, análise da Morfologia Espermática e IMB.

Análise estatística

Os dados foram analisados em um delineamento de blocos ao acaso, com quatro tratamentos e oito blocos (reprodutores). Para a análise dos dados utilizaram-se às médias dos valores obtidos das quatro amostras de cada reprodutor. As variáveis apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias, sendo utilizado como métodos estatísticos ANOVA e teste de Tukey empregando-se o programa Biostat[®] versão 5.0. O nível de significância utilizado foi de 5 % (17).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises computadorizadas da cinética espermática, da Morfologia Espermática, e de Integridade das membranas espermáticas pós-descongelção, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Médias \pm erro padrão dos parâmetros da cinética espermática avaliada no sistema computadorizado, morfologia e integridade das membranas espermáticas pós-descongelção do sêmen ovino congelado nos diluidores Glicina-Gema-Leite com 20 % (GGL20), 15 % (GGL15), 10 % (GGL10) ou 5 % (GGL5) de gema de ovo.

PARÂMETROS	DILUIDORES			
	GGL20	GGL15	GGL10	GGL5
MT (%)	40,5 \pm 3,0 ^{Bc}	47,7 \pm 2,3 ^{bc}	52,2 \pm 2,9 ^{ab}	58,5 \pm 2,3 ^{Aa}
MP (%)	23,9 \pm 2,6 ^{Bc}	30,7 \pm 2,2 ^{bc}	35,0 \pm 3,0 ^{ab}	40,9 \pm 2,3 ^{Aa}
VAP (μ m/s)	105,7 \pm 5,4 ^{Bb}	113,2 \pm 5,0 ^a	115,0 \pm 5,1 ^{Aa}	117,7 \pm 4,8 ^{Aa}
VSL (μ m/s)	91,9 \pm 5,2 ^{Bb}	99,6 \pm 4,8 ^{ab}	99,9 \pm 4,8 ^{ab}	102,2 \pm 4,6 ^{Aa}
VCL (μ m/s)	156,5 \pm 7,8 ^{Bb}	171,8 \pm 8,8 ^{Bb}	191,3 \pm 10,1 ^{Aa}	200,7 \pm 8,6 ^{Aa}
ALH (μ m)	5,4 \pm 0,2 ^{Cb}	5,4 \pm 0,2 ^{BCb}	6,2 \pm 0,2 ^{ABa}	6,3 \pm 0,2 ^{Aa}
BCF (Hz)	41,0 \pm 0,7 ^{Cc}	43,3 \pm 0,8 ^{BCbc}	44,7 \pm 0,8 ^{ABbc}	46,5 \pm 0,6 ^{Aa}
STR (%)	82,8 \pm 1,2	83,0 \pm 1,1	82,9 \pm 0,7	83,0 \pm 0,8
LIN (%)	58,5 \pm 1,4 ^{Aa}	56,9 \pm 1,6 ^{ABa}	52,1 \pm 1,1 ^{BCb}	50,2 \pm 1,0 ^{Cb}
ACROS (%)	87,6 \pm 0,5 ^b	86,9 \pm 0,4 ^{ab}	88,1 \pm 0,4 ^{ab}	88,4 \pm 0,4 ^a
CAUDA (%)	6,9 \pm 0,6	6,2 \pm 0,4	5,1 \pm 0,2	5,0 \pm 0,2
IMB (%)	34,6 \pm 1,7 ^b	40,6 \pm 1,8 ^{ab}	41,9 \pm 2,1 ^a	42,5 \pm 2,1 ^a

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha (maiúsculas, $P < 0,01$ e minúsculas, $P < 0,05$) diferem entre si pelo teste de Tukey.

Análise computadorizada (CASA) – MT – Motilidade total; MP – Motilidade progressiva; VAP – Velocidade de trajeto; VSL – Velocidade progressiva; VCL – Velocidade curvilínea; ALH – Amplitude lateral da cabeça; BCF – Frequência de batimento; STR – Retilinearidade; LIN – Linearidade.

Morfologia espermática em preparação úmida - Acros – acrossomos íntegros e Cauda – caudas dobradas.

IMB –Integridade das membranas espermáticas em microscopia epifluorescente.

Após a descongelção a MT e MP nos tratamentos com 10 % (52,2 e 35,0 %) e 5 % (58,5 e 40,9 %) foram superiores ao meio com 20 % (40,5 e 23,9 %) de GO (Tabela 2, $P < 0,05$). Em experimento realizado por Marco-Jimenez et al. (18), utilizando GO em pó ou *in natura* na proporção de 10 %, 15 % ou 20 % em meio TRIS, constatou-se diferença na MT entre GO em pó (69 %) e *in natura* (60 %), porém as porcentagens de MT foram semelhantes entre as concentrações 10 % (65 %), 15 % (62 %) e 20 % (65 %) de GO tanto em pó quanto *in natura*. No presente estudo concentrações de 10 % ou 5 % de GO no diluente GGL, também não interferiram negativamente na MT. Devido ao lauril sulfato de sódio (*Orvus Es Paste* – OEP) ter propriedade detergente, sua ação é exercida sobre a solubilização dos fosfolipídios da GO e aumento da permeabilidade das membranas espermáticas (19). A diminuição na proporção de GO, no presente experimento, propiciou um aumento na relação OEP/GO. Conforme sugerido por El-Alamy & Foote (19) os efeitos na redução da GO pode

ter ocorrido pela interação entre a maior proporção relativa do OEP com o glicerol, levando a uma redução no estresse osmótico decorrente do processo de congelamento/descongelamento.

As velocidades espermáticas aferidas pela CASA estão apresentadas na Tabela 2. A VAP dos espermatozóides criopreservados em GGL15 (113,2 $\mu\text{m/s}$), GGL10 (115,0 $\mu\text{m/s}$) e GGL5 (117,7 $\mu\text{m/s}$) foi significativamente maior ($P < 0,05$) que no GGL20 (105,7 $\mu\text{m/s}$). Para a VSL, o GGL5 (102,2 $\mu\text{m/s}$) foi superior ($P < 0,01$) ao GGL20 (91,9 $\mu\text{m/s}$). A VCL nos diluidores GGL10 (191,3 $\mu\text{m/s}$) e GGL5 (200,7 $\mu\text{m/s}$) foi maior do que no GGL20 (156,5 $\mu\text{m/s}$) e GGL15 (171,8 $\mu\text{m/s}$) ($P < 0,01$).

De uma maneira geral a redução na concentração de GO propiciou um incremento nas velocidades de deslocamento dos espermatozóides. Segundo Aisen et al. (20), a glicina é sintetizada a partir da serina e fornece uma maior quantidade de substrato energético para a movimentação espermática, podendo ser degradada à piruvato, gerando dois ATP. No preparo dos meios, devido à redução na concentração da GO, foi necessário modificar as proporções dos outros componentes, resultando em aumento na quantidade final de glicina e frutose (Tabela 1).

O ALH foi maior ($P < 0,05$) nos espermatozóides criopreservados com os meios diluidores GGL10 (6,2 μm) e GGL5 (6,3 μm), do que com GGL20 (5,4 μm) e GGL15 (5,4 μm) (Tabela 2). O ALH corresponde à largura média da oscilação da cabeça do espermatozóide durante o seu deslocamento, e é utilizada como um reflexo do batimento flagelar (21). Com o refinamento dos estudos de cinética espermática pela CASA, tornou-se possível evidenciar parâmetros indicativos da hiperativação espermática. Mortimer & Maxwell (22), utilizando a cinética individualizada de espermatozóides ovinos determinaram que as células hiperativadas são caracterizadas por altos valores de ALH ($\geq 9,0 \mu\text{m}$) e VCL ($> 250,0 \mu\text{m/s}$) e baixos da VSL ($\leq 100,0 \mu\text{m/s}$) e LIN ($\leq 30 \%$). No presente experimento os resultados são representados pelas médias (\pm erro padrão) de uma população celular, impossibilitando deduzir-se sobre a presença de hiperativação espermática nas amostras analisadas.

A frequência de batimento flagelar (BCF) nos espermatozóides criopreservados em GGL5 (46,5 Hz) foi maior ($P < 0,05$) do que nos congelados em GGL20 (41,0 Hz), GGL15 (43,3 Hz) e GGL10 (44,7 Hz), sendo nestes iguais entre si (Tabela 2). A BCF determina a medida da frequência com a linha da cabeça espermática atravessa a trajetória retilínea em qualquer direção (23). A linearidade (LIN) foi significativamente maior ($P < 0,05$) nos espermatozóides processados nos meios GGL20 (58,4 %) e GGL15 (56,9 %) do que naqueles criopreservados no GGL10 (52,1 %) e GGL5 (50,2 %) (Tabela 2). Trajetórias circulares são caracterizadas por uma baixa LIN, o caminho curvilíneo é muito maior do que o espaço ganho. Alta LIN na trajetória indica que o espermatozóide tem o seu movimento mais próximo de uma reta (19). No presente estudo, os espermatozóides congelados nos diluidores GGL10 e GGL5 foram menos lineares em seu percurso comparado com os criopreservados em GGL20 e GGL15, porém sem comprometimento do percentual das células com MP.

A retilinearidade (STR) não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. A STR é deduzida matematicamente pela comparação percentual da linha reta com a média das trajetórias realizada pelo espermatozóide e fornece uma indicação da relação entre o espaço ganho e a trajetória geral percorrida (23). Deduz-se, portanto que a despeito da maior MP representada pelos espermatozóides criopreservados em meio com menor proporção de GO, a eficiência da progressividade avaliada pelo STR foi idêntica em todos os meios diluidores.

Parâmetros observados pela CASA têm sido associados com eventos ligados à fertilidade. Em humanos, um padrão de cinética com alta motilidade progressiva aliado ao movimento lateral de cabeça aumentado, tem sido correlacionado com a habilidade do espermatozóide em penetrar no muco cervical (24). Para Verstegen et al. (25), a VCL e a Rodello L. Implicações da redução na concentração de gema de ovo no meio glicina-gema-leite sobre a cinética, morfologia e integridade de membranas espermáticas em sêmen ovino criopreservado. Vet. e Zootec. 2011 jun.; 18(2): 239-248.

VAP predizem resultados no processo de fertilização, visto que ambos estão aumentados após a capacitação espermática. Os padrões de hiperativação dos espermatozóides têm sido investigados em várias espécies, inclusive na ovina, em busca de se estabelecer comparação do comportamento da cinética espermática *in vivo* e *in vitro* (23). Em muitos casos, os parâmetros mensurados pela CASA, são subutilizados para estabelecer-se uma relação entre os efeitos *in vivo* e *in vitro* na avaliação qualitativa do sêmen.

Com respeito à morfologia espermática, as porcentagens de caudas dobradas nos tratamentos não apresentaram diferença significativa ($P>0,05$). Embora Marco-Jimenez et al. (18) não tenham constatado que a variação na concentração de GO produza efeito sobre a integridade do acrossomo, no presente estudo o GGL5 apresentou maior proporção ($P<0,05$) de espermatozóides com acrossomos íntegros (88,4 %) do que o GGL20 (87,6 %). A integridade de acrossomo representa um dos melhores indicadores da funcionalidade celular sob o ponto de vista da fertilidade (26).

O percentual de espermatozóides com membranas íntegra foi maior ($P<0,05$) no sêmen criopreservado com diluidores GGL10 (41,9 %) e GGL5 (42,5 %) do que com GGL20 (34,6%) (Tabela 2). Oliveira et al. (27), alcançaram maior porcentagem de acrossomos normais com a adição de 0,5 % de OEP (76,4 %), comparado com o OEP+Amilase (72,9 %), Amilase (54,6 %) e controle sem estes componentes (66,7 %). Maia et al. (28), obtiveram efeitos benéficos sobre a integridade de membranas plasmáticas na análise com fluorocromos DIC e IP em sêmen de ovino criopreservado acrescentando 0,5 % (28,8 %) e 1 % (32,4 %) de OEP ao meio TRIS (13,8 %). A forma pela qual esse detergente atua preservando a integridade das membranas plasmáticas de espermatozóides ainda não está completamente esclarecida. Por hipótese, no presente experimento, o melhor desempenho dos diluidores GGL10 e GGL5 quanto à integridade das membranas espermáticas, pode ser atribuído a maior proporção relativa de OEP nos referidos meios. Com isto, confere-se maior solubilidade aos fosfolipídios da GO e melhoria na permeabilidade celular, minimizando as alterações nas proporções colesterol:fosfolipídios e fosfolipídios:proteínas das membranas espermáticas, contribuindo para a prevenção do estresse osmótico (29-31).

CONCLUSÃO

A proporção da gema de ovo na formulação do meio diluidor Glicina-Gema-Leite pode ser reduzida até a concentração de 5 %, sem implicar em prejuízo dos parâmetros qualiquantitativo do sêmen ovino criopreservado.

Projeto de pesquisa aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da FMVZ-UNESP, em 21 de setembro de 2006, protocolo nº 90/2006-CEEA.

REFERÊNCIAS

1. Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. Anim Reprod Sci. 2000;62:77-111.
2. Maia MS, Bicudo SD, Azevedo HC, Sicherle CC, Sousa DB, Rodello L. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. Small Rumin Res. 2009;85:85-90.
3. Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gérard O, Courtens JL, et al. Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl[®], a commercial egg yolk extender. Theriogenology. 2004;61:895-907.

4. Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Aton M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 2002;57:1695-706.
5. Bergeron A, Manjunath P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev*. 2006;73:1338-44.
6. Bousseau S, Brillard JP, Marquant-Le Guienne B, Guérin B, Camus A, Lechat M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*. 1998;50:699-706.
7. Su L, Li X, Quan J, Yang S, Li Y, He X, et al. A comparison of the protective action of added egg yolk from five avian species to the cryopreservation of bull sperm. *Anim Reprod Sci*. 2008;104:212-9.
8. Aboagla EME, Terada T. Effect of the supplementation of trehalose extender contain egg yolk with sodium dodecyl sulfate on freezability of goat spermatozoa. *Theriogenology*. 2004;62:809-18.
9. Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen. Review I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci*. 1995;37:185-249.
10. Kumar S, Millar JD, Watson PF. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology*. 2003;46:246-53.
11. Vishwanath R, Shannon P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod Sci*. 2000;62:23-53.
12. Davis RO, Rothmann SA, Overstreet MD. Accuracy and precision of computer-aided sperm analysis in multicenter studies. *Fertil Steril*. 1992;57:648-53.
13. Barth AD, Oko RJ. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames: Iowa State University Press; 1989.
14. Blom E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord Vet Med*. 1973;25:382-91.
15. Harrison RAP, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1990;88:343-52.
16. Gonzalez CIM. Avaliação “in vitro” e “in vivo” de sêmen ovino (*Ovis aries*) congelado em palhetas e “pellets” com diferentes diluidores [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 1996.
17. Fisher LD, Belle GV. *Biostatistics A Methodology for the health Sciences*. New York: Wiley-Interscience; 1993.

18. Marco-Jiménez F, Puchades S, Mocé E, Viudes-de-Castro MP, Vicente JS, Rodriguez M. Use of powered egg yolk vs fresh egg yolk for the cryopreservation of ovine semen. *Reprod Domest Anim.* 2004;39:438-41.
19. El-Alamy MA, Foote RH. Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. *Anim Reprod Sci.* 2001;65:245-54.
20. Aisen EG, Cisale H, Fernandez H. Criopreservacion de semen ovino. Nueva técnica. *Vet Argent.* 1990;7:176-82.
21. Mortimer ST. A critical review of the physiological importance and analisis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update.* 1997;3:403-39.
22. Mortimer ST, Maxwell WM. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. *Reprod Fertil Dev.* 1999;11:25-30.
23. Mortimer ST, Maxwell WM. Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction.* 2004;127:285-91.
24. Mortimer ST, Pandya IJ, Sawers RS. Relationship between human sperm motility characteristics and sperm penetration into human cervical mucus in vitro. *J Reprod Fertil.* 1986;78:93-102.
25. Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzer in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology.* 2002;57:149-79.
26. D'Alessandro AG, Martemucci AG, Colonna MA, Bellitti A. Post-thaw survival of RAM spermatozoa and fertility after insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender composition. *Theriogenology.* 2001;55:1159-70.
27. Oliveira JFC, Neves JP, Luz SN. Utilização de “orvus es paste” e beta amilase no congelamento de sêmen ovino. *Rev Bras Reprod Anim.* 1988;12:107-13.
28. Maia MS, Bicudo SD, Azevedo HC, Sousa DB, Rodello L, Meira C. Efeito da adição de lauril sulfato de sódio (OEP) ao diluidor na viabilidade do sêmen congelado de ovinos Santa Inês. *Vet Zootec.* 2008;15:521-30.
29. Pursel VG, Skulman LL, Johnson LA. Effect of *Orvus Es Paste* on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. *J Anim Sci.* 1978;47:198-202.
30. Ariola J, Foote RH. Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. *J Dairy Sci.* 1987;70:1664-70.
31. Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology.* 2000;53:47-58.

Recebido em: 04/05/10

Aceito em: 03/02/11