

## EFEITO DA ADIÇÃO DE LAURIL SULFATO DE SÓDIO (OEP) AO DILUIDOR NA VIABILIDADE DO SÊMEN CONGELADO DE OVINOS SANTA INÊS

Marciane da Silva Maia<sup>1,4</sup>  
Sony Dimas Bicudo<sup>2</sup>  
Hymerson Costa Azevedo<sup>3,4</sup>  
Daniel Bartoli de Sousa<sup>4</sup>  
Leandro Rodello<sup>4</sup>  
Cezinande Meira<sup>3</sup>

### RESUMO

Este estudo foi planejado com o objetivo de avaliar o efeito da adição do detergente lauril sulfato de sódio (OEP) ao diluidor utilizado para a criopreservação do sêmen sobre vários parâmetros da viabilidade espermática. Foram obtidos por meio de vagina artificial, dois ejaculados, de 10 carneiros Santa Inês. Os ejaculados foram diluídos com o diluidor TRIS-gema contendo (0,5 ou 1,0% de OEP) ou sem OEP. Após a descongelação, a motilidade espermática foi avaliada usando o sistema computadorizado de análise espermática (CASA), a integridade da membrana plasmática e acrossomal foi avaliada usando os fluorocromos iodeto de propidium (IP) e diacetato de carboxifluoresceína (DIC) e o estágio de capacitação espermática pela técnica da Clortetraciclina (CTC). A motilidade espermática total e progressiva e a porcentagem de espermatozoides viáveis com membrana plasmática e acrossomal intactas foram mais altas ( $P < 0,05$ ) no diluidor TRIS com 0,5 ou 1,0% de OEP, comparado ao controle. Concluiu-se que, a congelabilidade do espermatozoide ovino foi significativamente melhorada quando o sêmen foi congelado no diluidor TRIS-gema contendo uma concentração adequada de OEP.

**Palavras-chave:** detergente, lauril sulfato de sódio, criopreservação, sêmen de carneiro.

### EFFECT OF SODIUM LAURYL SULFATE (OEP) ADDITION TO EXTENDER ON VIABILITY OF CRYOPRESERVED SANTA INÊS RAM SEMEN

### ABSTRACT

This study was designed to evaluate the effect of adding the detergent sodium lauryl sulfate (OEP) to the extender used to dilute semen for cryopreservation on several indicators of sperm viability. Two ejaculates were obtained by artificial vagina from 10 Santa Ines sheep and were diluted with egg yolk-TRIS extender with (0.5 or 1.0% OEP) and without OEP. After thawing, sperm motility was assessed using a computer assisted sperm analysis (CASA) system, plasmatic and acrossomal membrane integrity was verified using the fluorescent stains propidium iodide (PI) and carboxyfluorescein diacetate (CFD) and capacitation status was determined by chlortetracycline (CTC) staining technique. The sperm total motility, progressive motility and the percentage of viable sperm with plasmatic and acrossomal intact membrane were highest ( $P < 0.05$ ) in TRIS extender with 0.5 or 1.0% OEP, when compared to the control extender. In conclusion, ram sperm freezability was significantly improved when semen was frozen in an egg yolk-TRIS extender containing an adequate concentration of OEP.

**Key words:** detergent, sodium lauryl sulfate, cryopreservation, and ram semen.

<sup>1</sup>Pesquisadora EMBRAPA/EMPARN, Av. do Sol 3554, CEP: 59 065-600, Candelária, Natal-RN. [marcianemaia@yahoo.com.br](mailto:marcianemaia@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>DRRAV –FMVZ, UNESP, Botucatu-SP. [sony@fmvz.unesp.br](mailto:sony@fmvz.unesp.br)

<sup>3</sup>Pesquisador EMBRAPA- CPTC, Aracaju –SE. [hymerson@yahoo.com.br](mailto:hymerson@yahoo.com.br)

<sup>4</sup>Pós graduando, DRRAV –FMVZ, UNESP, Botucatu-SP

Parte integrante de Projeto de Pesquisa financiado pela FAPESP

## EFFECTO DE LA ADICIÓN DEL LAURIL SULFATE DE SODIO (OEP) AL DILUYENTE EN LA VIABILIDAD DEL SEMEN CONGELADO DE CARNEROS SANTA INES

### RESUMEN

Este estudio fue diseñado para evaluar el efecto de agregar el detergente lauril sulfato de sodio (OEP) al diluyente que se empleará en la congelación del semen en varios indicadores de la viabilidad del espermatozoide. Dos eyaculados fueron obtenidos por el método de recolección de vagina artificial a partir de 10 carneros Santa Inés. El semen fue diluido con el diluyente TRIS- yema de huevo con (0.5 ó 1.0% OEP) y sin OEP. Después de la descongelación la movilidad fue determinada usando un sistema de análisis espermático en computadora (CASA), la integridad de la membrana plasmática y acrossomal fue verificada usando los colorantes fluorescente iodito de propídio (IP) y diacetato de caboxifluoresceína (DIC) y el estado de capacitación por la técnica del clortetraciclina (CTC). La movilidad total y progresiva del espermatozoide y el porcentaje de espermatozoide viable con la membrana plasmática y acrossomal intacta eran los más altos ( $P < 0,05$ ) cuando fue utilizado el diluidor TRIS- yema con 0,5 ó 1.0% de OEP, comparado al diluyente controle. En conclusión, la resistencia del esperma ovino la congelación fue significativamente mejor cuando el semen fue congelado en el diluyente TRIS- yema que contenía una concentración adecuada de OEP.

**Palabras-clave:** detergente, lauril sulfato de sodio, congelación, semen de carneros.

### INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen tem grande importância na reprodução de animais de exploração pecuária. Contudo, na maioria das espécies de mamíferos, à exceção do touro, a fertilidade do sêmen é reduzida pelo processo de criopreservação. Essa redução da fertilidade do sêmen congelado é atribuída a alterações na estrutura da membrana e na função do espermatozoide que ocorrem durante o resfriamento, congelação e descongelação (PARKS e GRAHAM, 1992; MAXWELL e WATSON, 1996; WATSON, 2000).

A sobrevivência do espermatozoide de carneiro criopreservado é afetada por vários fatores, entre eles: a composição do meio diluidor, a concentração do crioprotetor, a embalagem (palheta, minitubo, pellets), a velocidade de congelação e descongelação, a temperatura inicial de congelação, bem como, a qualidade do sêmen a ser preservado (SALAMON e MAXWELL, 1995; SALAMON e MAXWELL, 2000, BAG et al., 2002a; BAG et al., 2002b).

O diluidor mais freqüentemente empregado para esta finalidade em ovinos é o a base de Tris (hydroximetil aminometano) com gema de ovo em sua composição (SALAMON e MAXWELL, 1995). A gema de ovo é considerada um componente importante dos diluidores para congelação do sêmen de carneiro, devido ao seu efeito crioprotetor (SALAMON e MAXWELL, 2000) prevenindo efeitos danosos do choque térmico durante a congelação e descongelação. Além disso, a sua inclusão permite a redução da concentração de glicerol no meio (HOLT et al., 1992).

Em alguns estudos têm sido proposto a adição de surfactantes ao diluidor a base de gema de ovo, na congelação do sêmen ovino (OLIVEIRA et al., 1988; EL-ALAMY e FOOTE, 2001; AKOURKI et al., 2004), bovinos (ARRIOLA e FOOTE, 1987; FOOTE e ARIOLA, 1987) e caprinos (ABOAGLA e TERADA, 2004), com melhoria da sobrevivência e da motilidade do espermatozoide após a descongelação e da manutenção da integridade das membranas plasmática e acrossomal, refletindo em incremento da fertilidade. Em geral, o surfactante utilizado é uma mistura de lauril sulfato de sódio e trietanolamina.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a congelabilidade do sêmen ovino criopreservado em diluidores a base de TRIS (Tris – hydroximetil aminometano) contendo ou não o detergente lauril sulfato de sódio (OEP - orvus es paste, Procter e Gamble), de acordo com a avaliação da motilidade, da integridade da membrana plasmática e acrossomal e da capacitação espermática.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Diluidores para criopreservação do sêmen

Para a criopreservação do sêmen foram utilizados três diluidores a base de Tris (hidroxymethyl-aminometane) e gema de ovo. O diluidor TRIS (controle): que consiste de 300mM de Tris (hidroxymethyl-aminometane); 94,75mM de ácido cítrico monohidratado e 27,75mM de glicose anidra, 15% de gema de ovo e 10% (v/v) de glicerol adicionado à fração II e dois diluidores a base de Tris contendo o detergente lauril sulfato de sódio (OEP) nas concentrações de 0,5 e 1,0% (TRIS 0,5 e TRIS 1). O TRIS 0,5 é constituído por 250,25mM de Tris (Tris hidroxymethyl-aminometane); 79,71mM de ácido cítrico monohidratado; 9,99mM de glicose anidra, 20% de gema de ovo e 0,5% (v/v) de OEP na fração I e 14% de glicerol na fração II e o TRIS 1, que tem a mesma composição do TRIS 0,5 com exceção da concentração de OEP que é 1% (v/v). Todos os diluidores continham 100.000UI de penicilina potássica e 100mg de estreptomicina.

### Colheita, avaliação e diluição do sêmen.

O experimento foi realizado no Laboratório de estudos em Biotecnologia Aplicada à Reprodução de Ovinos e Caprinos e no Laboratório do Centro de Diagnóstico e Biotecnologia em Reprodução Animal (CERAN), do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ /UNESP Botucatu.

O sêmen foi colhido de dez carneiros da raça Santa Inês, aptos andrologicamente e com idade entre 12 e 32 meses. A colheita foi feita em vagina artificial e de cada carneiro foram processados dois ejaculados. Após a colheita o sêmen foi mantido em banho-maria a 32°C e avaliado quanto ao aspecto, volume, concentração, motilidade espermática e integridade de membranas plasmática e acrossomal.

Após as avaliações as amostras com motilidade superior a 70% eram divididas em três frações e diluídas com os seguintes diluidores: Tris-glicose-gema com 0,5 e 1% de OEP (TRIS 0.5 e TRIS 1) ou sem OEP (TRIS).

A diluição foi feita a 32°C em duas etapas, de forma a obter-se uma concentração de 400 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL. Na primeira diluição, acrescentou-se a fração I de cada diluente e, em seguida, a fração II. Após a diluição, o sêmen foi envasado à temperatura ambiente, em palhetas de 0,25mL lacradas com álcool polivinílico.

### Congelamento e descongelamento

A congelamento foi realizada em sistema automatizado de resfriamento e congelamento, modelo Tetakon® -TK 3000 (TK Tecnologia em congelamento Ltda). A refrigeração de 32°C a 5°C ocorreu a uma taxa de 0,5°C/min e de 5°C a -85°C a -15°C/min, seguida de uma segunda taxa de decréscimo de -85°C a -120°C a -10°C/min. Após atingir os -120°C, as palhetas eram colocadas diretamente no nitrogênio líquido (-196°C) e em seguida armazenadas até a avaliação.

A descongelamento foi realizada em banho-maria à 40°C por 20 segundos. De cada tratamento foram descongeladas e avaliadas duas palhetas de sêmen por carneiro, sendo uma de cada ejaculado. Após a descongelamento o sêmen foi depositado em um microtubo e mantido em banho-maria a 37°C por 5 minutos e em seguida submetido à avaliação da motilidade, integridade de membranas e o estágio de capacitação.

### Avaliação computadorizada da motilidade espermática

Os parâmetros da motilidade espermática foram avaliados por meio da análise computadorizada (CASA) usando o sistema *Hamilton Thorn Motility Analyser – IVOS 10*. Os padrões utilizados para ajuste do aparelho foram: *frame rate: 60Hz; frame acquire: 30; minimum contrast: 56; minimum cell size: 5; medium VAP: 80; low VAP: 30; low VSL: 20; non motile head size: 3; non motile head intensity: 50*. Para a realização da análise do sêmen fresco, uma alíquota de 10µL era diluída em 500µL de tampão Tris (componentes do meio TRIS, sem gema ou glicerol) e no sêmen

descongelado, diluíam-se 32µL de sêmen em 250µL de tampão Tris. Em cada amostra eram avaliados três campos escolhidos aleatoriamente e medidos os seguintes parâmetros da motilidade: motilidade total (MT,%); motilidade progressiva (MP, %); velocidade de trajeto (VAP, µm/s); velocidade curvilínea (VCL, µm/s), velocidade progressiva (VSL, µm/s), linearidade (LIN, %) e amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm).

### **Avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal**

A integridade da membrana plasmática e acrossomal foi avaliada pela coloração fluorescente utilizando-se os fluorocromos: iodeto de propídio (IP) e diacetato de carboxifluoresceína (DIC) segundo a metodologia proposta por Harrison e Vickers (1990). Uma amostra de 10µL de sêmen diluído em tampão Tris, da mesma forma que para a avaliação da motilidade, era adicionada a 40µL do meio de coloração (1mL de citrato de sódio 2,94%; 20µL de formol salina; 20µL de DIC 0,46mg/mL em DMSO e 10µL de IP 0,5mg/mL em solução salina isotônica) e incubada por 15 minutos à temperatura ambiente protegida da luz. Em seguida, procedia-se a avaliação. Para isso, uma gota (10µL) da mistura de sêmen e fluorocromos era depositada entre lâmina e lamínula, levemente pressionada com papel absorvente para remover o excesso de fluido e observada em microscópio de fluorescência no filtro de luz azul (fluoresceína), no aumento 40x. Em cada lâmina foram avaliadas 200 células. Os espermatozoides foram classificados em dois grupos: IM1- espermatozoides apresentando fluorescência verde ao longo da cabeça e flagelo, sem acúmulo de IP (membrana plasmática e acrossomal intacta) e IM2- espermatozoides apresentando fluorescência vermelha (acúmulo de IP) na cabeça ou flagelo (membrana plasmática lesada).

### **Avaliação da capacitação espermática**

A avaliação do estágio de capacitação espermática foi realizada pelo método da Clortetraciclina (CTC), conforme a técnica descrita por Gillan et al. (1997) e Azevedo (2006). Amostras de sêmen contendo  $24 \times 10^6$  espermatozoides foram diluídas em 1,0mL de PBS pré-aquecido à 37°C, submetidas a uma leve centrifugação (900x g por 4 minutos) para remoção do plasma seminal ou do meio diluidor. Após remoção cuidadosa do sobrenadante o *pellet* era ressuscitado com 150 µL de PBS e uma alíquota de 10 µL era misturada a 10µL de solução recém-preparada de CTC (1mM), composta de 20mM de Tris, 130mM de NaCl e 5mM de L-Cisteína. A mistura era homogeneizada vagarosamente por 20 segundos e em seguida era adicionado 10µL de solução com 1% de glutaraldeído, preparada em 2M de Tris e corrigida com HCl para pH 7.8. Uma amostra de 10 µL desta suspensão era colocada sobre lâmina aquecida a 37°C misturando-se sobre a mesma 10 µL de solução com 0,22 M de 1,4-diazabicyclo [2 2 2] octano (DABCO) preparada em meio composto de PBS e Glicerol na proporção de 1:9. A mistura era então coberta com lamínula, comprimida firmemente com papel absorvente para remover o excesso de fluido, selada com esmalte incolor e mantida à 4°C, protegida da luz para ser realizada a leitura até 1 hora depois. A contagem das células foi realizada sob óleo de imersão e aumento de 1000x em microscópio com iluminação epifluorescente (Excitação BP 450-490 e Supressão LP515). Um total de 100 células por cada lâmina foi contado sendo os espermatozoides classificados em 3 categorias:

- F** - espermatozoides não capacitados com acrossomo intacto;
- B** - espermatozoides capacitados com acrossomo intacto;
- AR** - espermatozoides com acrossomo reagido.

### **Análise estatística**

Os dados foram analisados em um delineamento de blocos ao acaso, com 10 blocos (carneiros) e três tratamentos (diluentes). Em cada tratamento foram avaliadas duas palhetas uma de cada ejaculado e a média das duas avaliações foi utilizada para a análise estatística. O efeito dos tratamentos sobre os parâmetros da motilidade espermática, integridade de membranas e a capacitação espermática foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) com a comparação de médias realizada pelo teste de Duncan a  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

Os resultados da avaliação computadorizada da motilidade espermática no sêmen fresco e após a descongelação, são apresentadas na Tabela 1. A criopreservação teve efeito deletério na motilidade espermática, ou seja, houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em todos os parâmetros da motilidade espermática entre o sêmen fresco e o sêmen descongelado. No sêmen descongelado, tanto a motilidade total quanto a motilidade progressiva, foi significativamente mais alta ( $P < 0,05$ ) no sêmen congelado no diluidor TRIS com OEP (0,5 e 1%) do que no TRIS sem detergente. A velocidade de trajeto (VAP) e a velocidade progressiva (VSL) não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos e a velocidade curvilínea (VCL) foi maior ( $P < 0,05$ ) no TRIS 0,5 e TRIS 1 do que no TRIS. A linearidade (LIN) foi maior no TRIS do que nos meios TRIS 0,5 e TRIS 1 e a amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) nos espermatozóides criopreservados nos diluidores TRIS 0,5 e TRIS 1 do que no TRIS (Tabela 1).

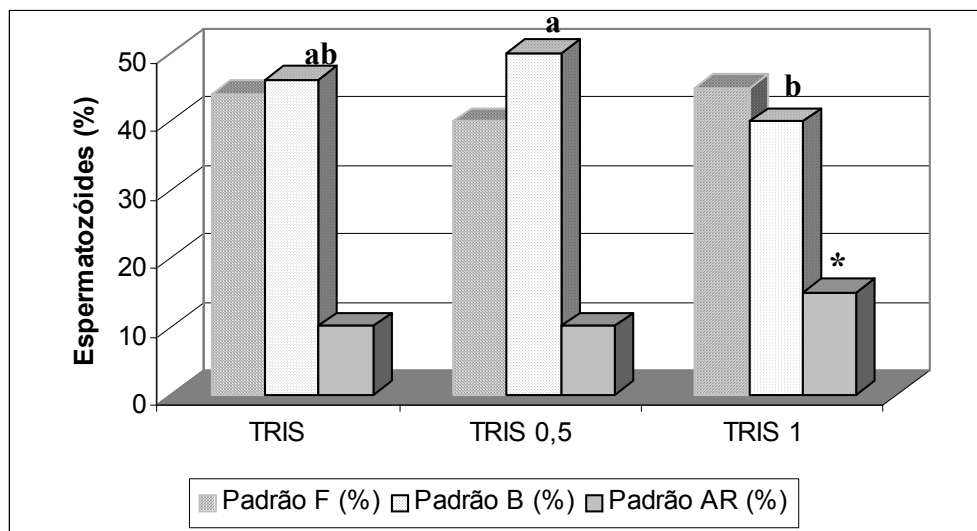
**TABELA 1.** Médias e erro padrão dos parâmetros da motilidade espermática avaliada pelo sistema computadorizado (CASA) e integridade de membrana plasmática e acrossomal (IP+DIC) do espermatozóide ovino no sêmen fresco (SF) e no sêmen congelado nos diluidores: TRIS, TRIS 0,5 e TRIS 1.

Parâmetro	SF	Sêmen Congelado		
		TRIS	TRIS 0,5	TRIS 1
MT (%)	93,7 ± 0,7 <sup>a</sup>	34,3 ± 2,5 <sup>c</sup>	65,0 ± 3,7 <sup>b</sup>	69,9 ± 5,0 <sup>b</sup>
MP (%)	55,4 ± 2,0 <sup>a</sup>	24,4 ± 1,9 <sup>c</sup>	38,9 ± 2,6 <sup>b</sup>	39,1 ± 3,6 <sup>b</sup>
VAP (µm/s)	158,0 ± 5,9 <sup>a</sup>	116,1 ± 3,6 <sup>b</sup>	121,3 ± 3,7 <sup>b</sup>	120,4 ± 3,4 <sup>b</sup>
VSL (µm/s)	115,2 ± 4,4 <sup>a</sup>	102,5 ± 3,4 <sup>b</sup>	96,6 ± 3,1 <sup>b</sup>	92,0 ± 3,3 <sup>b</sup>
VCL (µm)	286,5 ± 12,1 <sup>a</sup>	187,5 ± 5,0 <sup>c</sup>	214,6 ± 7,1 <sup>b</sup>	210,9 ± 6,5 <sup>b</sup>
ALH (Hz)	10,4 ± 0,4 <sup>a</sup>	6,6 ± 0,2 <sup>c</sup>	8,6 ± 0,2 <sup>b</sup>	8,1 ± 0,3 <sup>b</sup>
LIN (%)	41,2 ± 1,1 <sup>c</sup>	56,1 ± 0,7 <sup>a</sup>	46,8 ± 0,8 <sup>b</sup>	45,3 ± 0,5 <sup>b</sup>
IM (%)	70,0 ± 2,3 <sup>a</sup>	13,8 ± 2,3 <sup>c</sup>	28,8 ± 2,3 <sup>b</sup>	32,4 ± 2,3 <sup>b</sup>

Média seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si a  $P < 0,05$ , pelo teste Duncan  
 MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; VAP: velocidade de trajeto; VSL: velocidade progressiva; VCL: velocidade curvilínea; ALH: amplitude de deslocamento lateral da cabeça; LIN: linearidade e IM: membrana plasmática intacta.

O percentual de espermatozóides viáveis com membrana plasmática e acrossomal intactas (IM) diminuiu significativamente ( $P < 0,05$ ) após a criopreservação do sêmen. No sêmen descongelado, a porcentagem de espermatozóide com membrana plasmática e acrossomal intacta foi maior ( $P < 0,05$ ) no sêmen congelado nos diluidores TRIS 0,5 (28,80 ± 2,28 %) e TRIS 1 (32,37 ± 2,28%) do que no TRIS (13,85 ± 2,28%, Tabela 1).

Os resultados do teste de capacitação são apresentados na Figura 1. O percentual de espermatozóides capacitados medidos pela CTC (Padrão B e AR) foi significativamente afetado ( $P < 0,05$ ) pelo diluidor usado. O percentual de espermatozóides capacitados com acrossomo intacto (Padrão B) foi significativamente menor ( $P < 0,05$ ) no meio TRIS 1.0 (40 ± 4,5%) em relação ao TRIS 0.5 (50 ± 4,5%) e semelhante ao obtido no TRIS (46 ± 4,5%), não havendo também, diferença nessa categoria, entre TRIS e TRIS 0,5. A proporção de espermatozóides capacitados com acrossomo reagido (Padrão AR) foi mais alta no TRIS 1.0 (15 ± 1,7%) do que nos outros (TRIS: 10 ± 1,7 e TRIS 0,5: 10 ± 1,7%). Já a população de espermatozóides não capacitados (Padrão F) não diferiu entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ), sendo observado os percentuais de 45 ± 4,6% no TRIS 1.0; 44 ± 4,6% no TRIS e 40 ± 4,6% no TRIS 0,5.



**FIGURA 1.** Percentual (média $\pm$ ep) de espermatozoides ovinos não capacitados (Padrão F), capacitados com acrossomo intacto (Padrão B) e capacitados com acrossomo reagidos (Padrão AR) após a criopreservação nos diluidores: TRIS, TRIS 0,5 e TRIS 1. Diferenças indicadas por letras sobre as colunas para o padrão B, ou \* para o Padrão AR no TRIS 1 em relação aos demais. ( $P < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

O processo de criopreservação causou efeito deletério à integridade da membrana plasmática e acrossomal do espermatozóide ovino, quando comparado com o sêmen fresco. O percentual de células viáveis (membrana plasmática e acrossomal intactas – IM) no sêmen fresco foi superior ao observado por Marti et al. (2006) e semelhante ao observado por Harrison e Vickers (1990) e Sousa (2002) no sêmen fresco diluído em GGL. No entanto, após a criopreservação houve queda significativa, no percentual de espermatozoides nessa categoria, em todos os tratamentos, demonstrando que a membrana plasmática do espermatozóide ovino é susceptível a crioinjúria. A criopreservação também provocou diminuição na motilidade e nas velocidades espermáticas avaliadas pelo sistema computadorizado, o que está de acordo com os achados de Moses et al. (1995).

Os efeitos deletérios da criopreservação na estrutura da membrana plasmática e na função do espermatozóide de mamíferos já foram relatados nas mais diferentes espécies (HOLT et al., 1992; PARKS e GRAHAM, 1992; MAXWELL e WATSON, 1996; BAILEY et al., 2000; WATSON, 2000). Um dos fatores responsáveis pela ocorrência da crioinjúria é a alteração de volume pelo qual a célula passa durante o processo de congelamento e descongelamento. A desidratação excessiva da célula durante a congelamento ou o aumento excessivo de volume na descongelamento danifica as membranas espermáticas e isso depende tanto da curva de refrigeração, congelamento e descongelamento utilizada quanto da permeabilidade da membrana ao crioprotetor (MAZUR, 1984; HAMMERSTEDT et al., 1990; HOLT, 2000). O declínio na motilidade também é uma característica do espermatozóide criopreservado (Watson, 2000) e é decorrente do estresse da criopreservação. Para proteger o espermatozóide do efeito danoso da criopreservação, recorre-se à adição de crioprotetores ao diluente. Os crioprotetores comumente utilizados nos diluidores para congelamento de sêmen ovino são o glicerol e a gema de ovo. A adição de glicerol nas concentrações de 3 a 7% em diluidores contendo de 5 a 20% de gema de ovo proporciona uma boa taxa de recuperação da motilidade (44 a 85%) pós-descongelamento do espermatozóide ovino (MOSES et al., 1995; GIL et al., 2000; EL-ALAMY e FOOTE 2001; ANEL et al., 2003; GIL et al., 2003).

A integridade de membranas e a motilidade foram mais bem preservadas nos espermatozoides congelados nos diluidores TRIS contendo o detergente OEP (TRIS 0,5 e TRIS 1) do que no TRIS sem

OEP. O efeito benéfico da inclusão do detergente ao diluente para criopreservação de sêmen sobre a motilidade e a integridade acrossomal do espermatozóide após a descongelação, é relatada na espécie ovina (OLIVEIRA et al., 1988; EL-ALAMY e FOOTE 2001; AKOURKI et al., 2004), bovina (AHMAD e FOOTE, 1986; ARRIOLA e FOOTE, 1987; FOOTE e ARRIOLA, 1987) e caprina (ABOAGLA e TERADA, 2004). O mecanismo pelo qual o detergente protege a célula espermática da crioinjúria não está bem esclarecido, mas parece que ele atua tanto sobre a gema de ovo, solubilizando os fosfolípidios, quanto sobre a membrana espermática aumentando sua permeabilidade (ARRIOLA e FOOTE, 1987; FOOTE e ARRIOLA, 1987; EL-ALAMY e FOOTE 2001; ABOAGLA e TERADA, 2004).

Sendo assim, esse efeito crioprotetor maior dos diluidores Tris-gema aditivado de OEP pode ser atribuído a uma ação direta do detergente sobre as membranas espermáticas, levando a um aumento na sua permeabilidade e com isso, redução no estresse osmótico decorrente da adição do glicerol. Essa maior permeabilidade de membrana, resultou em aumento na integridade de membranas e na motilidade pós-descongelação, nos espermatozóides criopreservados no TRIS 0,5 e TRIS 1 o que não foi observado no TRIS sem detergente. Ou seja, quando o glicerol foi adicionado ao TRIS sem OEP houve estresse osmótico maior, mais desidratação da célula e, conseqüentemente, maior lesão de membrana e menor motilidade pós-descongelação. Anel et al. (2003) obtiveram maior motilidade (MT 75,8%) pós-descongelação no sêmen ovino criopreservado em diluidor TES+TRIS com 10% de gema e 4% de glicerol e atribuíram o aumento da motilidade à menor extensão do efeito tóxico do glicerol sobre as células espermáticas, já que a glicerolização foi feita a 5°C. Sendo assim, como no presente estudo a glicerolização foi realizada a 32°C o maior tempo de exposição ao glicerol antes da congelação pode ter aumentado o seu efeito citotóxico sobre os espermatozóides no TRIS sem OEP já que o método de glicerolização foi igual para todos.

A criopreservação levou a um aumento na linearidade (LIN) do espermatozóide ovino pós-descongelação. Uma possível explicação para esse aumento na linearidade seria que a criopreservação causou danos à estrutura flagelar, fazendo com que a célula perda seu padrão típico de movimento. Segundo Watson (1995), durante a criopreservação ocorre a ruptura entre os elementos do axonema da cauda do espermatozóide e isso pode não só reduzir o número de espermatozóides móveis, mas também afetar o tipo de motilidade. No entanto, esta explicação não justifica o resultado semelhante relatado por Sousa (2002) para o sêmen fresco de carneiros, o qual observou aumento na linearidade logo após a diluição do sêmen com o diluidor glicina gema leite (GGL) e que ele atribuiu à presença da glicina no diluidor. No entanto, esse comportamento foi observado no espermatozóide criopreservado em todos os diluidores avaliados nesse estudo. Assim, pode-se dizer que outros fatores alheios ao meio diluidor interferiram nessa variável.

Os valores obtidos para as velocidades espermáticas (VAP, VCL e VSL) em todos os tratamentos foram superiores aos obtidos por Moses et al. (1995), Bag et al. (2002a, b) e Anel et al. (2003) e inferiores aos obtidos por Gil et al., (2003), todos para sêmen ovino congelado. Possivelmente, essa diferença entre os resultados se deva a variação observada nos parâmetros utilizados para o ajuste do aparelho, ou à influência dos meios diluidores utilizados.

Após a congelação e descongelação do sêmen, o espermatozóide ovino exibe os padrões de coloração produzidos pela clortetraciclina (CTC), típicos do espermatozóide capacitado. De acordo com esses padrões (CTC) ocorre diminuição na porcentagem de espermatozóides não capacitados (F) e aumento na porcentagem de espermatozóides capacitados (B e AR) com o acrossomo reagido ou não (Pérez et al., 1996; Gillan et al., 1997; Maxwell et al., 1999; Gil et al., 2003). No presente estudo, o estágio de capacitação do espermatozóide também foi avaliado pelo método da clortetraciclina (CTC). Usando esse método, Marti et al. (2006) observaram que no sêmen fresco de ovinos apenas metade dos espermatozóides (55,5%) não estava capacitada, enquanto 26% estavam capacitados e 18,5% com acrossomo reagido. Tomando esses dados como base, pode-se dizer que a criopreservação induziu a capacitação prematura nos espermatozóides criopreservados em todos os diluidores avaliados, uma vez que o percentual de espermatozóides capacitados foi mais alto (40 a 50%) do que os observados por Marti et al. (2006) no sêmen fresco.

O percentual de espermatozóides não capacitados (Padrão F) obtidos no sêmen criopreservado em todos os diluidores foi superior, aos observados por Gillan et al. (1997).

Observou-se, também, que no diluidor TRIS 1 o percentual de espermatozóides capacitados foi menor do que no sêmen criopreservado nos outros diluidores, enquanto que o percentual de AR

foi superior aos outros diluidores, demonstrando que embora esse diluidor tenha proporcionado maior proteção à membrana plasmática do espermatozóide durante a criopreservação, essa concentração de detergente acelerou a reação acrossomal.

## CONCLUSÕES

A criopreservação teve um efeito deletério sobre o espermatozóide ovino, uma vez que, provocou uma redução no percentual de espermatozóides móveis e viáveis em relação ao sêmen fresco; e induziu alterações nas membranas espermáticas semelhantes à capacitação, avaliadas pelo método da Clortetraciclina;

A adição do detergente lauril sulfato de sódio (OEP) nas concentrações de 0,5 ou 1%, ao diluente TRIS-gema, contendo 20% de gema de ovo, melhora a congelabilidade do espermatozóide ovino. Confere maior proteção ao espermatozóide contra a crioinjúria, avaliada de acordo com o efeito benéfico exercido na preservação da motilidade, da integridade de membrana plasmática e acrossomal e na redução da capacitação espermática durante o processo de congelamento e descongelamento;

O meio TRIS-gema aditivado de OEP (0,5 ou 1%), avaliado nesse estudo, poderá ser utilizado para o congelamento do sêmen de carneiros e, provavelmente, trará benefícios à inseminação artificial.

## REFERÊNCIAS

ABOAGLA, E. M-E; TERADA, T. Effect of the supplementation of trehalose extender contain egg yolk with sodium dodecyl sulfate on freezability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v.62, p.809-818, 2004.

AHMAD, K.; FOOTE, R.H. Post thaw survival and fertility of frozen bull spermatozoa treated with antibiotics and detergent. **Journal of Dairy Science**, v.69, n.2, p.535-541, 1986.

AKOURKI, A., GIL, L., ECHEGARAY, A.; ESPINOSA, E.; JOSA, A.; DE BASS, I.; GONZALEZ, N.; GALLEGOS DE LA HOYA, M.; MEQUE, L.C. Effect of the extender supplement Equex-STM on cryopreserved semen in the Assaf sheep. **Cryo Letters**, v.25, n.2, p.147-154. 2004.

ANEL, L.; PAZ, P.; ÁLVAREZ, M.; CHAMORRO, C.A; BOIXO, J.C.; MANSO, A.; GONZÁLEZ, M.; KAABI, M.; ANEL, E. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram sêmen. **Theriogenology**, v.60, p.1293-1308, 2003.

ARIOLA, J.; FOOTE, R.H. Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. **Journal of Dairy Science**, v.70, n.8, p.1664-1670. 1987.

AZEVEDO, H. C. **Integridade e funcionalidade dos espermatozóides ovinos submetidos á criopreservação após a incorporação de colesterol, desmosterol, ácido oléico-linoleico e  $\alpha$ -lactoalbumina**. Botucatu, 2006. 218p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu.

BAG, S.; JOSHI, A.; NAQVI, S.M.K.; RAWAT, P.S.; MITTAL, J.P. Effect of freezing temperature, at which straws were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.72, p.175-183. 2002a.

BAG, S.; JOSHI, A.; RAWAT, P.S.; MITTAL, J.P. Effect of initial freezing temperature on semen characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa in a semi-arid tropical environment. **Small Ruminant Research**, v.43, p.23-29. 2002b.

BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 1-7. 2000.



- EL-ALAMY, M.A.; FOOTE, R.H. Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 65, p.245-254. 2001.
- FOOTE, R.H.; ARRIOLA, J. Motility and fertility of bull sperm frozen-thawed differently egg yolk and milk extenders containing detergent. **Journal of Dairy Science**, v.70, n.12, p.2642-2647. 1987.
- GIL, J.; SÖDERQUIST, L.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H. Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. **Theriogenology**, v.54, p.93-108. 2000.
- GIL, J.; LUNDEHEIM, N.; SÖDERQUIST, L.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H. Influence of extender, temperature and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. **Theriogenology**, v.59, p.1241-1255. 2003.
- GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, M.C. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v.9, p.481-487. 1997. 1997
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.343-52, 1990.
- HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v.11, n.1, p.73-86, 1990.
- HOLT, W.V.; HEAD, M.F.; NORTH, R.D. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing - observation with experimental cryomicroscopy. **Biology of Reproduction**, v.46, p.1086-1094. 1992.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **Am. J. Physiol.** v.247, n.3, pt.1, p.C125-C142, 1984.
- MARTÍ, E.; PÉREZ-PÉ, R.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Comparative Study of Four Different Sperm Washing Methods Using Apoptotic Markers in Ram Spermatozoa. **Journal of Andrology**, 2006 (*in press*).
- MAXWELL, W.M.C; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p.55-65. 1996.
- MOSES, D.F.; DE LAS HERAS, M.A; VALCÁRCE, A.; PÉREZ, L.; BALDASSARRE, H. Use of computerized motility analyzer for the evaluation of frozen-thawed ram spermatozoa. **Andrologia**, v.27, p.25-29, 1995.
- OLIVEIRA, J.F.C., NEVES, J.P., LUZ. Utilização de orvus es paste e beta-amilase no congelamento de sêmen ovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.12, n.2, p.107-113, 1988.
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of criopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222. 1992.
- PÉREZ, L.J.; VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A.; MOSES, D.; BALDASSARRE, H. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. **Theriogenology**, v.46, p.131-140. 1996.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen I. processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v.37, p.185-249. 1995.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p.77-111. 2000.

SOUSA, D.B. **Viabilidade do sistema Equitainer® na refrigeração do sêmen ovino avaliado pela análise computadorizada, de microscopia epifluorescente e inseminação artificial**. 2002. 103p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p.481-492. 2000.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p. 871-891, 1995.

**Recebido em: 12/12/2006**

**Aceito em: 30/06/2008**