

Viabilidade *in vitro* de células espermáticas ovinas submetidas a diferentes diluentes e a refrigeração

[In vitro viability of ovine sperm cells submitted to different diluents and refrigeration]

B.P.A. Sousa¹, J.C.O. Andrade², A. Wischral³, M.M.P. Guerra³

¹Aluna de pós-graduação - UFRPE – Recife, PE

²Medico veterinário – Recife, PE

³Universidade Federal Rural de Pernambuco – Recife, PE

RESUMO

Avaliou-se a viabilidade *in vitro* de células espermáticas após a adição de três diluentes comerciais, que foram comparados com o diluente tradicional Tris-gema, utilizados no processo de refrigeração do sêmen ovino, em até 48h de armazenamento. Foram utilizados nove ejaculados diários, obtidos de três reprodutores Dorper, com vagina artificial, em três repetições com intervalo de três dias. O sêmen foi mantido a 30°C, e foram avaliadas suas características macro e microscópicas. Após formação do *pool*, repetiram-se as avaliações acrescidas da concentração espermática e da integridade do DNA e do acrossoma. Dividiu-se o *pool* em cinco tratamentos, cada um constituído de uma parte de sêmen para três partes dos respectivos diluentes: Equimix (DI), Laiciphos Green Ovine (DII), FR 4 (DIII), Equimix-Gema- Equimix com gema de ovo (DIV) e Tris-Gema (DV). O material obtido em cada tratamento foi subdividido em quadruplicata, refrigerado e mantido a 4°C até as avaliações da motilidade individual progressiva (MIP), do vigor e da integridade do DNA e do acrossoma, correspondendo a zero, 12, 24, 36 e 48h. Nas avaliações do sêmen, com o DI ocorreu a maior queda de MIP às 12h em relação aos demais grupos ($P<0,05$). Às 24h, os tratamentos DII, DIV e DV apresentaram a melhor MIP ($P<0,05$), que não divergiram ($P>0,05$) entre si; às 48h, o DII e o DV foram melhores ($P<0,05$) que os demais. Com relação ao vigor, os tratamentos DII e DV apresentaram valores mais elevados ($P<0,05$) em relação ao DI e DIII, a partir das 12h, e ao DIV, a partir das 24h ($P<0,05$). Concluiu-se que o diluente Laiciphos Green Ovine, da mesma forma que o Tris-gema, pode ser utilizado na conservação do sêmen a 4°C por 48h, enquanto o Equimix, acrescido de 20% de gema de ovo, pode ser seja utilizado no armazenamento do sêmen (4°C) por até 24h.

Palavras-chave: ovino, sêmen, diluidor, resfriamento

ABSTRACT

The *in vitro* viability of sperm cells following the addition of three commercial diluents was evaluated and compared with the traditional Tris-yolk diluent for the refrigeration of ovine sperm up to 48h of storage. Nine daily ejaculates were obtained from three Dorper breeders using an artificial vagina; three repetitions were performed in a three-day interval. The semen was kept at 30°C and macro and microscopic characteristics were evaluated. The samples were pooled and the evaluations were repeated, along with assessments of sperm concentration, DNA integrity, and acrosome integrity. The pool was distributed into five treatments, each with one part of semen to three parts of the following diluents: Equimix (DI), Laiciphos Green Ovine (DII), FR 4 (DIII), Equimix-Yolk-Equimix with egg yolk (DIV), and Tris-Yolk (DV). The material of each treatment was aliquoted in quadruplicate, refrigerated, and maintained at 4°C until the evaluations of the individual progressive motility (IPM), vigor, DNA integrity, and acrosome integrity, corresponding to 0, 12, 24, 36, and 48h. The highest decrease of IPM occurred with DI (at 12h) in comparison to the other diluent groups ($P<0.05$). At 24h, DII, DIV and DV had the best IPM ($P<0.05$) and did not diverge from one another ($P>0.05$). At 48h, DII and DV had the highest values ($P<0.05$). Regarding vigor, DII and DV had higher values ($P<0.05$) than DI and DIII at 12h and higher values than DIV at 24h ($P<0.05$). From the results, like Tris-Yolk, and Laiciphos Green Ovine can be used for the conservation of semen at 4°C for 48h, whereas Equimix plus 20% egg yolk may be used for the storage of semen at 4°C for up to 24h.

Keywords: ovine, semen, extender, refrigeration

Recebido em 10 de dezembro de 2009

Aceito em 10 de junho de 2010

E-mail: bpastoras@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Na busca ao melhoramento genético de um rebanho, a inseminação artificial (IA) apresenta-se como a primeira biotécnica a ser implantada, em virtude do seu menor investimento e da simplicidade, quando comparada às demais biotecnologias. Todavia, sua eficiência envolve vários fatores, sendo a preservação da viabilidade das células espermáticas crucial para o sucesso de sua aplicação.

O simples fracionamento de um ejaculado amplia o aproveitamento do germoplasma masculino (Mies Filho, 1982), e a adição de meios diluentes propicia sua otimização. As possibilidades de uso do sêmen ovino aumentam consideravelmente com a técnica e a solução preservadora empregada durante a sua manipulação. Diversas formulações são propostas para a composição do diluente, com a finalidade de conservação, por longos períodos, da capacidade fecundante de células espermáticas armazenadas *in vitro* (Salamon e Maxwell, 1995).

O frio, na faixa dos 5 a 0°C, é um importante agente conservador, por promover a redução do metabolismo celular para próximo ao estágio de quiescência, propiciando a estocagem prolongada e favorecendo o transporte do sêmen (Palhão et al., 2006). Todavia, esse mesmo agente também é promotor de lesões nas membranas espermáticas, tornando imprescindível o controle da diminuição de temperatura (Evans e Maxwell, 1990) e o uso de substância lipoproteica que ofereça proteção contra o choque térmico (Salamon e Maxwell, 2000). Na refrigeração do sêmen, utiliza-se a gema de ovo e o leite como fonte lipoproteica, elementos necessários à sobrevivência dos espermatozoides (Evans e Maxwell, 1990; Vishwanath e Shannon, 2000), existindo várias indicações de proporções na composição do meio diluente (Maxwell e Salamon, 1993).

As propriedades básicas de um bom diluente são: pH e osmolaridade próximos ao fisiológico, capacidade de prevenir a capacitação espermática precoce e de proteger de eventuais crioinjúrias (Salamon e Maxwell, 1995). A biossegurança também é fundamental durante o processamento do sêmen, refletindo diretamente na eficiência da aplicação dessa biotecnologia, o que demanda a formulação de meios diluentes estéreis e de boa qualidade (Machado e Vieira, 2001).

Os diluentes comerciais, além de contribuírem para a maior praticidade do emprego da IA, apresentam

o controle dos componentes durante o processo de fabricação, constituindo uma garantia quanto ao período de conservação das características e da segurança do produto. Desse modo, os objetivos deste estudo foram avaliar a viabilidade *in vitro* de células espermáticas após a adição de três diluentes comerciais e compará-los com o diluente tradicional Tris-gema, utilizados no processo de refrigeração do sêmen ovino em até 48h de armazenamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Como doadores de sêmen, foram utilizados três carneiros da raça Dorper, com idades entre um e três anos, comprovadamente férteis, mantidos em regime de manejo intensivo com arraçamento de feno Tyfton, suplementados com 500g de concentrado/animal/dia, além de sal mineral e água *ad libitum*. Cada animal foi submetido a colheitas diárias de sêmen com vagina artificial, utilizando como manequim fêmea em estro, a intervalo de três dias, em três blocos de repetições, totalizando 27 ejaculados. Os ejaculados que apresentaram o volume, a cor e o aspecto dentro dos padrões fisiológicos para a espécie (Fonseca et al., 1992) foram imediatamente colocados em banho-maria a 30°C. Uma alíquota de sêmen foi submetida à avaliação entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37°C, em microscópio com platina aquecedora na mesma temperatura. Foram aprovadas as amostras que apresentaram o valor mínimo: de 3 (0-5) para turbilhonamento, 70,0% para motilidade individual progressiva (MIP) e 3 (0-5) para vigor espermático (Fonseca et al., 1992).

Formou-se um *pool* com três ejaculados de cada animal, e foram repetidas as avaliações macro e microscópica como anteriormente descritas. Também foram obtidas, desse *pool*, alíquotas para estimar o pH (Merck – PAP Indic pH 0-14 - Merck-Alemanha) do sêmen e avaliar a concentração espermática e a integridade do DNA (Evenson et al., 1999) e do acrossoma (Roth et al., 1998). Em seguida, dividiu-se o *pool* em cinco amostras iguais, que foram diluídas na proporção 1:3 (sêmen:diluente) para constituir os seguintes tratamentos: Equimix[®] (Nutricell – Nutrientes Celulares Ltda.) (DI), Laiciphos Green Ovine[®] (IMV – IPV Brasil Ltda.) (DII), FR-4[®] (Nutricell – Nutrientes Celulares Ltda.)³ (DIII), Equimix-Gema (Equimix adicionado de 20% de gema de ovo) (DIV) e Tris-Gema (Evans e Maxwell, 1990) – controle - DV). Foram utilizadas para os grupos DII, DIV e DV partes iguais de um homogeneizado de gema de ovo fresca, de no máximo três dias. A

aferição do pH dos cinco meios foi feita com pHmetro digital (Ph100 da Phtek[®]), antes de se proceder às diluições.

Após diluição, as amostras de sêmen foram subdivididas e refrigeradas em quadruplicata. Os tubos contendo sêmen diluído foram colocados em recipiente de porcelana contendo água à temperatura de 30°C, e o conjunto levado ao refrigerador (4°C), momento em que foi adicionado gelo. A diminuição da temperatura da água até 4°C, monitorada com auxílio de termômetro digital (Incoterm[®], -50 a 70°C), ocorreu gradativamente em 180min, e as alíquotas de sêmen foram mantidas nesta temperatura até o momento de sua avaliação, correspondendo a zero, 12, 24, 36 e 48h de refrigeração. Previamente à avaliação, as amostras foram aquecidas e estabilizadas em banho-maria a 30°C, sendo então submetidas às análises das características MIP e vigor, e processadas para a avaliação da integridade do DNA e do acrossoma. Para o teste de integridade do DNA, as alíquotas (10µL) foram colhidas imediatamente após a diluição (zeroh) e a intervalos de 12h (12, 24, 36 e 48h) de refrigeração, sendo diluídas com 990µL de TNE (0,15M NaCl, 0,01M tris-HCl, 0,001M EDTA dissódico, pH 7,4), submetidas ao congelamento no vapor de nitrogênio líquido (N₂) e armazenadas a -20°C. Para a avaliação, as amostras foram descongeladas a 37°C, e 100µL de amostra de cada tratamento foram transferidos para microtubos vazios resfriados em gelo. Em seguida, foram adicionados 200µL de solução ácido detergente (0,08M 1N HCl, 0,15M NaCl, 0,1% Triton X-100, pH 1,2) e, passados 30 segundos, foram acrescidos 600µL da solução de laranja de acridina (Polysciences Inc) (AO) (60µL 1mg/mL AO/10mL 0,037M ácido cítrico, 0,126M Na₂HPO₄, 0,0011M EDTA dissódico, 0,15M NaCl; pH 6,0). Após três minutos da adição da sonda fluorescente, utilizou-se uma gota (10µL) dessas amostras para preparações úmidas, entre lâmina e lamínula. A leitura foi realizada imediatamente em microscópio de fluorescência (microscópio Olympus BX 41[®] – Japão). Foram contadas 200 células e classificadas segundo Evenson et al. (1999), sendo que as células que emitiram fluorescência verde foram consideradas normais, ou seja, com cromatina íntegra, enquanto as células que emitiram fluorescência laranja ou vermelha no

interior da cabeça foram consideradas anormais, o que significa desnaturação parcial ou total da cromatina.

Para o teste de integridade do acrossoma, foram retiradas alíquotas (5µL) de cada grupo, nos momentos zero, 12, 24, 36 e 48h, para o preparo dos estirados secados à temperatura ambiente, em seguida, conservados a 4°C. No momento da leitura, depositaram-se sobre cada lâmina 30µL de FITC-PNA (PNA – Aglutinina de *Arachis hypogea* – conjugada com isotiocionato de fluoresceína – Sigma, EUA) (20µL de FITC-PNA-1mg/mL em 480µL de PBS) e, imediatamente, as lâminas foram colocadas em câmara úmida a 4°C por 20 minutos em ambiente escuro. As lâminas foram lavadas por imersão em 50mL de PBS (sem adição de antibiótico) uma única vez e, logo depois, deixadas a secar em ambiente protegido da luz. Posteriormente, 5µL de UCD (5mg Na azide, 0,5mL PBS, 5mg p-phenylenediamine – Sigma Chemical Company), 4,5mL glicerol) foram colocados sobre a lâmina, cobertos com lamínula e examinados em microscópio de fluorescência (Olympus BX 41 – Japão). Para cada lâmina, foram contadas 200 células e classificadas de acordo com critérios sugeridos por Roth et al. (1998) em: a) acrossoma intacto (AI), quando se apresentava corado em verde; b) acrossoma reagido ou danificado (AR), se nenhuma coloração estivesse presente ou fosse observada apenas uma faixa verde fluorescente na região equatorial da célula.

Utilizou-se o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) na versão 13, em que foram obtidas a média e o desvio-padrão, e realizaram-se a análise de variância (ANOVA) para dois fatores e interação, ANOVA para um fator e ANOVA com um fator para medidas repetidas e teste de Kruskal-Wallis. No caso de diferença significativa entre os tratamentos, utilizou-se o teste Tukey para comparação entre pares de tratamentos; no de diferença significativa entre os tempos de avaliação, foram utilizadas, entre os pares de tempos, os testes Bonferroni ou da diferença mínima significativa, no caso de incoerência entre os resultados do teste e das comparações pareadas. O nível de significância utilizado nas decisões dos testes estatísticos foi de 5,0%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração espermática média do *pool* foi de $2,9 \times 10^9$ espermatozoides por mL de sêmen e, após a diluição, foi obtida a concentração final de $74,0 \times 10^7$ /mL. A diluição usada é comum na rotina (Bettencourt et al., 1997; Milczewski et al., 2000), sendo considerada adequada à conservação das células espermáticas. A adição de meios diluentes tem como finalidade principal aumentar o volume e favorecer a proteção aos espermatozoides. Logo, a diluição que mantém a alta concentração pode conduzir a um maior número de metabólitos, devido ao rápido consumo dos substratos.

O pH do *pool* do sêmen fresco apresentou média de 6,5, estando dentro da variação de 5,9 a 7,3 esperada para a espécie ovina (Kolb, 1984). Nos meios diluentes, foram observados os seguintes valores: Equimix- pH 7,0; Laiciphos Green

Ovine - pH 6,7; FR 4 - pH 7,0; Equimix-Gema - pH 7,0 e Tris-Gema - pH 6,9. Pelo fato de as células espermáticas suportarem oscilações amplas de pH (Mies Filho, 1982), as diferenças encontradas entre os tratamentos, provavelmente, não propiciaram alterações que comprometessem a viabilidade dos espermatozoides.

Na Tab. 1, estão apresentados os valores da MIP para os cinco tratamentos. Observou-se em DI, DIII e DIV redução da motilidade progressiva no decorrer do armazenamento. Salamon e Maxwell (1995) descreveram que ocorre redução da motilidade com a diminuição e o posterior aumento da temperatura, bem como com a própria manipulação do sêmen no transcorrer do processo de conservação.

Tabela 1. Média e desvio-padrão da motilidade individual progressiva (MIP) de acordo com o diluente e o tempo de armazenamento do sêmen ovino

Variável	Tempo (h)	DI	DII	DIII	DIV	DV	Valor de P ¹
• MIP	0	76,67±10,41a	80,00±8,66	80,00±0,00a	80,00±5,00a	81,67±2,89	=0,915
	12	35,00±8,66Bab	78,33±7,64A	66,67±5,77Aab	75,00±5,00Aa	80,00±5,00A	<0,001*
	24	30,00±5,00Bab	78,33±2,89A	58,33±2,89Cbc	65,00±13,23ACac	78,33±2,89A	<0,001*
	36	16,67±2,89Bab	68,33±2,89A	53,33±5,77ACbc	36,67±15,28BCbc	73,33±2,89A	<0,001*
	48	3,67±2,31Bb	61,67±2,89A	36,67±7,64Cc	10,33±12,86Bbc	68,33±2,89A	<0,001*
Valor de P ²		= 0,004*	=0,051	=0,009*	=0,018*	=0,057	

DI: Equimix; DII: Laiciphos Green Ovine; DIII: FR 4; DIV: Equimix-Gema; DV: Tris-Gema.

¹Teste F para a comparação entre os tempos de avaliação e as comparações pareadas do teste Tukey.

²Teste F para medidas repetidas com a comparação entre os tempos de avaliação, segundo o diluente fornecido do teste Bonferroni.

Letras maiúsculas diferentes na linha representam diferença significativa entre os diluentes, por meio dos testes de comparações pareadas do teste Tukey.

Letras minúsculas diferentes na coluna representam diferença significativa entre os tempos de avaliação para cada diluente, por meio dos testes de comparações pareadas do teste Bonferroni.

Todavia, no DI ocorreram os menores valores de MIP, com acentuada queda já nas 12 primeiras horas de refrigeração ($P < 0,001$), sugerindo que o meio diluente composto apenas por leite não foi favorável à preservação das células espermáticas à temperatura de 4°C por longo período. Comparando DI ao DIV, verificou-se proteção aos espermatozoides até 24h ($P < 0,001$), ao se adicionar gema de ovo, uma vez que se trata do mesmo meio comercial, corroborando a afirmativa de Salamon e Maxwell (1995) de que os meios diluentes contendo gema de ovo favorecem a conservação em temperaturas mais baixas em virtude da proteção ao choque térmico e da diminuição das alterações degenerativas.

Quando avaliados nas 36 e 48h seguintes, os tratamentos DI e DIV não diferiram entre si ($P > 0,05$). Sousa e Bicudo (2002), ao avaliarem o desempenho de dois diluentes para o sêmen ovino a 5°C por períodos de 48h, observaram melhores resultados com o uso do meio glicina-gema-leite em relação ao glicose-leite.

O meio Equimix (DI e DIV) é constituído de leite e glicose, mas contém também bicarbonato de sódio. Esse composto pode ter agido de forma negativa e afetado a motilidade das células espermáticas. Todavia, foi descrito por Gonzáles et al. (1984) que no sêmen ovino mantido a 37°C

por 90 minutos pós-ejaculação, não ocorrem trocas iônicas significativas de sódio.

As temperaturas de 30 e 4°C, utilizadas no presente trabalho, propiciaram baixo e reduzido metabolismo, respectivamente, sinalizando não ter havido grande variação no equilíbrio eletrolítico do sêmen. Milczewski et al. (2000), ao trabalharem com o Cornell University Extender, que apresenta em sua fórmula bicarbonato de sódio (Mies Filho, 1982), concluíram que este foi o segundo melhor diluente na preservação do sêmen ovino refrigerado por 8h a 5°C.

Dentre os diluentes comerciais, durante as 48h do processo de refrigeração, os valores de MIP do DII foram equivalentes aos do DV (controle) e mais altos que os dos demais tratamentos ($P < 0,001$). Isto pode ser atribuído ao fato de o Laiciphos Green Ovino ser indicado para a espécie em estudo ou, ainda, pela presença do colesterol e da lecitina em sua fórmula (Mies Filho, 1982).

Não foram observadas, nos intervalos de 12 e 24h, diferenças entre DIV, DII e DV ($P > 0,05$), provavelmente devido à adição da gema, mas houve acentuado declínio a partir das 36h de armazenamento ($P < 0,001$). O DIII apresentou resultados semelhantes ao DIV, exceto no tempo de 48h, embora tenha apresentado resultado mais baixo ($P < 0,05$) que DII e DV, nos tempos de 24 e 48h.

Os diluentes FR 4 (DIII) e o Equimix-Gema (DIV) apresentaram uma superfície oleosa que dificultou a visualização dos espermatozoides no momento das avaliações, podendo esse fato estar relacionado à presença da lactose no DIII e à quantidade de gema de ovo adicionada ao DIV. Nesses dois tratamentos, observou-se alta viscosidade do diluente, podendo ter implicado na menor mobilidade dos espermatozoides.

Outro ponto a ser considerado é a osmolaridade, pois a ação negativa das soluções hipertônicas sobre a progressão dos espermatozoides pode chegar a paralisá-los (Mies Filho, 1982). Porém, a lactose, presente no DII, atua extracelularmente mantendo a pressão osmótica durante a estocagem do sêmen (Salamon e Maxwell, 2000), e considera-se que as fórmulas comerciais apresentam valor próximo dos 300 miliosmóis, pressão equivalente à do sêmen (Hafez, 1995). Neste estudo, não se realizou essa mensuração e, portanto, não foi possível esclarecer se este foi um fator determinante.

Os valores referentes à característica do vigor nos cinco tratamentos estudados (Tab. 2), com o transcorrer do tempo, diminuíram progressivamente nos tratamentos DI, DIII e DIV, tornando-se mais evidentes ao final das 48h ($P < 0,05$). As amostras dos tratamentos DII e DV foram as que mantiveram o vigor ao longo do tempo, com valores aceitáveis e acima dos demais tratamentos ($P < 0,05$).

Tabela 2. Média e desvio-padrão do vigor espermático de acordo com o diluente e o tempo de armazenamento do sêmen ovino

Variável	Tempo (h)	DI	DII	DIII	DIV	DV	Valor de P ¹
• Vigor	0	4,00±0,00a	4,33±0,58	4,00±0,00	4,00±0,00a	4,00±0,00	= 0,406
	12	3,00±0,00B,ab	4,00±0,00A	3,33±0,58B	4,00±0,00A,a	4,00±0,00B	= 0,024*
	24	2,67±0,58B,ab	4,00±0,00A	3,00±0,00B	3,33±0,58B,ab	4,00±0,00B	= 0,023*
	36	2,00±0,00B,ab	3,33±0,58AC	2,67±0,58BC	2,33±0,58B,b	3,67±0,58B	= 0,046*
	48	1,67±0,58B,b	3,00±0,00A	2,00±0,00B	1,33±0,58B,b	3,33±0,58B	= 0,016*
Valor de P ²		= 0,038*	=0,099	=0,063	=0,029*	=0,225	

DI: Equimix; DII: Laiciphos Green Ovino; DIII: FR 4; DIV: Equimix-Gema; DV: Tris-Gema.

¹Teste F para medidas repetidas com a comparação entre os tempos de avaliação, por meio do teste Bonferroni.

²Teste de Kruskal-Wallis para a comparação entre os diluentes, segundo os tempos de avaliação e as comparações pareadas do teste de Kruskal-Wallis.

Letras maiúsculas diferentes na linha representam diferença significativa entre os diluentes por meio dos testes de comparações pareadas do teste Kruskal-Wallis.

Letras minúsculas diferentes na coluna representam diferença significativa entre os tempos de avaliação para cada diluente por meio dos testes de comparações pareadas do teste Bonferroni.

Viabilidade *in vitro* de células...

Milczewski et al. (2000), ao avaliarem sêmen ovino diluído no Tris-gema e refrigerado a 5°C por 8h, diluído em Tris-Gema, observaram valores de 42,2% para motilidade e 2,46 para o vigor, sendo estes aquém do encontrado no intervalo de 12h para o DV. Também obtiveram para o meio constituído de leite desnatado UHT-gema 67,8% e 2,8 de MIP e vigor, respectivamente, valores semelhantes aos verificados no DIII e mais baixos que o resultado do DIV, no momento de 12h, que apresentam os mesmos componentes básicos, gema e leite.

Possivelmente essa diferença esteja associada à velocidade mais lenta de refrigeração e à água com gelo empregada no presente trabalho. Segundo Evans e Maxwell (1990), a refrigeração do sêmen deverá ocorrer de 2 a 3h, de forma gradual, evitando descida rápida de temperatura, principalmente dos 18 aos 5°C, intervalo este em que os espermatozoides são mais sensíveis ao choque térmico, e em que o uso do gelo é menos seguro que o uso de água gelada.

As lesões por ação do frio causam desestabilização das membranas plasmáticas dos espermatozoides, podendo resultar em uma reação acrossomal precoce e, por consequência, em uma falha na fertilização (Evans e Maxwell, 1990). Espera-se que o meio diluente promova a preservação do maior número de células espermáticas durante todo o processo de refrigeração do sêmen (Watson, 1981) e que nenhum de seus compostos interaja negativamente com as camadas da membrana plasmática (Watson, 1995).

Nos cinco tratamentos (Tab. 3), observou-se elevada porcentagem de células espermáticas com acrossoma íntegro em todos os intervalos avaliados (90,7 a 98,7%), e não se verificou diferença significativa entre os intervalos, tampouco entre o tempo e o diluente ($P>0,05$). Estes resultados diferem dos relatados por Celeghini et al. (2008), que encontraram 17,2 e 30,8% de espermatozoides bovinos com acrossomas íntegros após congelação/descongelação, ao utilizarem dois diferentes meios, e dos valores observados por Esteves et al. (2000), que encontraram variação de células espermáticas com acrossoma íntegro no sêmen de homens de 89,3 a 88,2% antes do congelamento e de 66,5 a 72,1% após descongelamento.

A redução da temperatura durante o processo de refrigeração e congelação do sêmen afeta as bombas adenosina trifosfato dependentes, dentre elas, a de Na^+/K^+ , provocando despolarizações parciais das membranas, tornando-as permeáveis ao cálcio. Isto induz a uma vesiculação prematura da membrana acrossomal (Bicudo et al., 2007). Todavia, Azevedo (2006), ao avaliar o sêmen ovino em todas as fases do processamento, concluiu que a congelação/descongelação causa mais danos do que a refrigeração e constatou haver diferenças entre indivíduos relacionadas à criorresistência e criocapacitação espermática. Segundo esse autor, a refrigeração induz à capacitação, mas não contribui para o aumento da reação acrossomal.

Tabela 3. Porcentagem de células espermáticas com acrossoma íntegro no sêmen ovino diluído em cinco diferentes diluentes, sob refrigeração a 4°C, durante 48h

Tratamento	Acrossoma íntegro (%)				
	0h	12h	24h	36h	48h
DI	95,2	90,7	94,3	95,2	95,2
DII	94,2	97,7	96,2	94,5	96,2
DIII	98,0	96,7	95,8	96,8	96,5
DIV	96,5	96,3	97,7	97,7	97,2
DV	98,7	95,8	97,2	95,8	98,2

DI: Equimix; DII: Laiciphos Green Ovino; DIII: FR 4; DIV: Equimix-Gema; DV: Tris-Gema.

Quanto à integridade do DNA, em todos os tratamentos, foram verificados 100,0 % de células com a cromatina normal, corroborando com os resultados de Gonçalves (2006), ao descrever que a cromatina dos espermatozoides bovinos criopreservados mostrou-se íntegra

quase na sua totalidade, não sendo observada a ação do tempo, do estresse promovido pelos procedimentos de fertilização *in vitro* (FIV) e nem do possível efeito das espécies reativas ao oxigênio (ROS). Segundo Watson (1995), o núcleo espermático é uma estrutura estável,

pouco afetada durante o processo de criopreservação.

Embora tenha sido demonstrado que as ROS induzem à disfunção mitocondrial, a danos ao DNA, RNA e proteínas (Comporti, 1989), no presente trabalho não foram evidenciadas tais ações sobre o DNA durante a refrigeração do sêmen ovino a 4°C até às 48h de acondicionamento. Segundo Dutty et al. (2002), a integridade da cromatina do sêmen humano não é afetada nem mesmo na congelação rápida sem crioprotetor. Esses autores indicaram a criopreservação como forma de conservar uma amostra de sêmen para submetê-la à análise do DNA pelo ensaio cometa.

De acordo com Rocha et al. (2002), no sêmen humano, a coloração com laranja de acridina é menos sensível na detecção de baixa compactação da cromatina, ou seja, em lesões mais leves, e o plasma seminal influencia na atuação do corante. No presente trabalho, não houve a separação do plasma antes da adição dos diluentes, assim existe a possibilidade de ter havido interação plasma x corante, bem como de alguns dos componentes dos meios diluentes.

CONCLUSÕES

Os diluentes Laiciphos Green Ovine e Tris-gema podem ser usados para conservação do sêmen a 4°C por até 48h, enquanto o Equimix, acrescido de 20,0 % de gema de ovo, deve ser usado por apenas 24h.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, H.C. *Integridade e funcionalidade dos espermatozoides ovinos submetidos à criopreservação após a incorporação de colesterol, desmosterol, ácido oleico-linoleico e alfalactoalbumina*. 2006. 218f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- BETTENCOURT, E.M.V.; BETTENCOURT, C.M.V.; SIMÕES, J.P.C. et al. Utilização da inseminação artificial em raças ovinas autóctones do sul de Portugal. In: CONGRESSO IBÉRICO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1., 1997, Estoril. *Proceedings...* Estoril: Federação Ibérica de Reprodução Animal, v.2, p.431-436, 1997.
- BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C.; MAIA S.M. et al. Avanços na criopreservação do sêmen ovino visando sua aplicação em programas de inseminação artificial e em biotecnologias com embriões. *Acta Sci. Vet.*, v.35, supl., p.787-798, 2007.
- CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C. et al. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Anim. Reprod. Sci.*, v.104, p.119-131, 2008.
- COMPORTI, M. Three models of free radical induced cell injury. *Chem. Biol. Int.*, v.72, p.1-56, 1989.
- DUTTY, S.M.; SINGH, N.P.; RYAN, L. et al. Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm. *Hum. Reprod.*, v.17, p.1274-1280, 2002.
- ESTEVES, S.C.; SHARMA, R.K.; THOMAS Jr., A.J. et al. Improvement in motion characteristics and acrosome status in cryopreserved human spermatozoa by swim-up processing before freezing. *Hum. Reprod.*, v.15, p.2173-2179, 2000.
- EVANS, G.; MAXWEEL, W.M.C. *Salamon's inseminación artificial de ovejas y cabras*. Zaragoza: Acribia, 1990. 192p.
- EVENSON, D.P.; JOST, L.K.; MARSHALL, D. et al. Utility of the sperm chromatin structure as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum. Reprod.*, v.14, p.1039-1049, 1999.
- FONSECA, V.O.; VALE FILHO, V.R.; MIES FILHO, A. et al. *Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. Belo Horizonte: CBRA, 1992. 79p.
- GONÇALVES, F.S. *Efeitos de antioxidantes adicionados ao meio de fecundação in vitro sobre a capacitação espermática e desenvolvimento embrionário em bovinos*. 2006. 140f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- GONZALES, C.I.M.; NEVES, J.P.; SILVA, C.A.M. Determinação do sódio, potássio, cálcio e magnésio no plasma seminal ovino em diferentes tempos de incubação do sêmen a + 37°C. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.8, p.174-178, 1984.
- HAFEZ, E.S.E. *Reprodução animal*. 6.ed. São Paulo: Manole, 1995. 582p.
- KOLB, E. *Fisiologia veterinária – A fisiologia da reprodução*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1984. cap.16, p.374-412.
- MACHADO, M.M.; VIEIRA, F.V. Biossegurança e qualidade sanitária em centro de coleta e processamento de sêmen bovino e bubalino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.25, p.384-386, 2001.
- MAXWEEL, W.M.C.; SALAMON, S. Liquid storage of ram semen: a review. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.5, p.613-638, 1993.

Viabilidade in vitro de células...

- MIES FILHO, A. *Reprodução dos animais e inseminação artificial*. 5.ed. Porto Alegre: Sulina, 1982. 783p.
- MILCZEWSKI, V.; KOZICKI, L.E.; NEVES, J.P. Viabilidade do sêmen ovino refrigerado em diferentes diluentes. *Arch. Vet. Sci.*, v.5, p.29-33, 2000.
- PALHÃO, M.P.; BISPO, C.A.S.; ROVAY, H. et al. Uso do sêmen resfriado em programas de inseminação artificial em caprinos. *Embrião*, n. 26, p.6-7, 2006.
- ROCHA, H.L.O.G.; BELETTI, M.E.; MARCOLINI, T.T. et al. Uso de laranja de acridina e azul de toluidina na avaliação da fertilidade masculina. *Biosci. J.*, v.18, p.65-77, 2002.
- ROTH, T.L.; WEISS, R.B.; BUFF, L.M. et al. Heterologous *in vitro* fertilisation and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). *Biol. Reprod.*, v.58, p.475-482, 1998.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, v.37, p.185-249, 1995.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.62, p.77-111, 2000.
- SOUSA, D.B.; BICUDO, S.D. Desempenho do Equitainer na refrigeração do sêmen ovino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.26, p.166-168, 2002.
- VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim. Reprod. Sci.*, v.62, p.23-53, 2000.
- WATSON, P.F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. *J. Reprod. Fertil.*, v.62, p.483-492, 1981.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.7, p.871-891, 1995.