

ELENICE ANDRADE MORAES E AMORIM

**ALTERAÇÃO DA MEMBRANA ESPERMÁTICA DE SUÍNOS, BOVINOS E
EQÜINOS NA QUALIDADE DO SÊMEN**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, para obtenção do título de
Doctor Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A524a
2008

Amorim, Elenice Andrade Moraes e, 1973-
Alteração da membrana espermática de suínos, bovinos e
equinos na qualidade do sêmen / Elenice Andrade Moraes e
Amorim. – Viçosa, MG, 2008.
xviii, 174f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Reprodução animal. 2. Suíno - Reprodução. 3. Bovino - Reprodução.
4. Equino - Reprodução. 5. Suíno - Sêmen - Criopreservação. 6. Bovino -
7. Equino - Sêmen - Criopreservação. 8. Sêmen - Congelamento - Efeito
dos esteróides. 9. Suíno - Alimentação e rações. 10. Lipídios na nutrição
animal. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.0824

ELENICE ANDRADE MORAES E AMORIM

**ALTERAÇÃO DA MEMBRANA ESPERMÁTICA DE SUÍNOS, BOVINOS E
EQÜINOS NA QUALIDADE DO SÊMEN**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, para obtenção do título de
Doctor Scientiae.

APROVADA: 4 de abril de 2008.

Prof. Giovanni Ribeiro de Carvalho
(Co-Orientador)

Prof. José Domingos Guimarães
(Co-Orientador)

Prof. Eduardo Paulino da Costa

Prof. Luis David Solis Murgas

Prof. Ciro Alexandre Alves Torres
(Orientador)

A Deus, por ter me concedido o dom da vida.

Ao meu amado esposo Lincoln, pela colaboração, incentivo e amor.

Aos meus pais Elias e Iracema, pelo incentivo e apoio durante minha busca
pelo conhecimento.

Às minhas irmãs Eliane, Andreia, Adriana e Juliana, pela força e amizade.

Ao meu cunhado João Batista, pelo apoio aos meus estudos desde o início.

Aos meus sobrinhos João Pedro e Bernardo, pela simples existência de
vocês em minha vida.

À minha avó Iracema (*in memoriam*), pelas orações e carinho. Saudades.

Dedico.

“If I have been able to see farther than others, it was because I stood on the shoulders of giants”.

Sir Isaac Newton.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, por minha formação, e em especial ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao professor Ciro Alexandre Alves Torres, pelos ensinamentos e apoio nesta fase, pela amizade, confiança e orientação.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Professor Sebastião e a Celeste, pelo monitoramento acadêmico.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo e da bolsa de doutorado sanduíche nos Estados Unidos da América.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro para realização deste estudo e publicações em revistas científicas.

À Perdigão Agroindustrial S/A (Videira/SC), em especial ao Sr. Luiz Stabile Benício, por disponibilizar as instalações, animais e equipamentos da empresa para realização deste estudo.

À Minitub do Brasil, em especial ao Sr. Alexandre Marchetti, pela doação dos materiais necessários para realização e execução deste estudo.

À Empresa Lagoa da Serra, em especial ao Sr. João Guzman, por disponibilizar o botijão de nitrogênio líquido durante toda a realização deste estudo.

A Colorado State University (CSU), pela recepção, apoio e suporte durante a realização do estágio de doutorado sanduíche.

Ao professor James Graham, pela amizade, receptividade, orientação e ensinamentos durante o período que realizei o doutorado sanduíche em seu laboratório.

Aos meus conselheiros Giovanni Ribeiro de Carvalho e José Domingos Guimarães, pelas sugestões, amizade e ensinamentos.

Aos professores Eduardo Paulino da Costa (DVT/UFV) e Luis David Solis Murgas (DVT/UFLA), pelas sugestões, ensinamentos, prestatividade e por terem aceitado compor a banca examinadora.

À Equipe Técnica da Perdigão Agroindustrial S/A, em especial ao Drs. Ideraldo Lima, Uislei Antônio Dias Orlando, Ada Otir, Marcelo Piassi, Guilherme Brandt, à Méd. Veterinária Simone Fátima Müller, Sr. Carlos Alberto C. da Cunha e àqueles que indiretamente participaram da realização deste estudo.

Aos funcionários do Centro de Difusão Genética da Perdigão, Elisângela, Maria, Tatiana, Clair, Coca e Rafael, pelo apoio, amizade e convivência, sem os quais não seria possível a execução do estudo.

Ao Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em especial a Professora Eloísa Saliba e Kelly Nascimento, pela gentileza e disponibilidade na realização das análises laboratoriais de cromatografia.

Às amigas de Videira/SC, Vanessa, Luciana, Kelen, pela amizade, companheirismo e momentos de alegria. Valeu “cabeças”!

As minhas irmãs e amigas acolhedoras Beth Spizziri, Mindy Meyers e Melissa Hudson, pela generosidade, acolhida, amizade e momentos maravilhosos que tivemos durante nossos dias de trabalho e diversão.

Aos amigos na CSU, Moises, Scott, Josh, Fernando, Milena, Guilherme, Sarah e Jennifer, pela amizade e apoio.

Aos amigos brasileiros de Fort Collins/CO, Sergio, Regina e Renata, Luiz e Luciana, Adriano, Helen e Alyssa, João e Terezinha, Amanda e Brett, Fabíola, Patrícia, Cristiane e Aaron, Juliana, Roberta e Carla, pelas risadas.

Aos meus eternos amigos Amélia Cristina; Ciane Aparecida; Cibele Minafra; Dalton e Valéria Pereira; Flávia Drumond; Kleibe e Lívia Moraes; Kátia Gobbi e Américo; Ligia V. Lage e família; Lydice, Fernando e Arthur; Anita Caiado; Cristiane Schmidt, Marieta Teles, Alexandra Oliveira, Márcia M^a Cândido; Nadja G. Alves; Roberta, Emerson, Julia e Pedro; Marcelo (Linho); Vitor Maffili; Sandra Pinheiro...

A TODOS os meus amigos e colegas de aula do Departamento de Zootecnia, pelo companheirismo nas aulas e amizade acima de tudo.

À minha madrinha Dirce de Oliveira Barros, por acreditar em mim.

À minha segunda família, Hamilton, Maria Aparecida, Hamilton Filho e Vó Maria José, pela amizade, incentivo, apoio e orações.

Aos amigos do LABREPDZO, Rogério, Vitor, Charles, Vinício, pela amizade.

À TODOS os funcionários do DZO, pela amizade e auxílio.

Aos professores do DZO, pela colaboração.

À Viçosa, meu segundo lar.

À Fort Collins, um lugar para viver.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente ajudaram na minha formação e que contribuíram para que este trabalho fosse possível.

Muito obrigada!!!

BIOGRAFIA

ELENICE ANDRADE MORAES E AMORIM, filha de Elias Amorim Moraes e Iracema Andrade Moraes, nasceu em 8 de fevereiro de 1973, em Governador Valadares, Minas Gerais.

Em maio de 2002, concluiu o curso de graduação em Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa.

Em março de 2004, obteve o título de Mestre em Zootecnia, na área de concentração em Nutrição e Reprodução Animal, no curso de Pós-graduação *Stricto Sensu*, do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, sob orientação do Dr. Ciro Alexandre Alves Torres.

Em setembro de 2006 a agosto de 2007, realizou o Estágio de Doutorado Sanduíche, no Departamento de Ciências Biomédicas da Colorado State University, sob a orientação do Dr. James K. Graham, concentrando seus estudos na área de criopreservação espermática.

Em abril de 2008, obteve o título de Doutora em Zootecnia, na área de concentração em Nutrição e Reprodução Animal, no curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xv
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	3
REVISÃO DE LITERATURA.....	5
<i>CÉLULA ESPERMÁTICA</i>	5
Estrutura do espermatozóide.....	5
Membrana plasmática.....	6
<i>ÁCIDOS GRAXOS</i>	7
Estrutura síntese e função.....	7
Fonte de ácidos graxos ômega 3.....	9
Conversão dos ácidos graxos ômega 3.....	10
Ácidos graxos essenciais na composição das membranas.....	12
Ácidos graxos essenciais no desempenho reprodutivo animal.....	12
Antioxidantes.....	14
Radicais livres.....	16
Relação entre peroxidação lipídios e características físicas seminais...	18
Relação entre lipídios e criopreservação do sêmen.....	19
<i>CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA</i>	20
Aspectos básicos da criopreservação.....	20
Diluentes crioprotetores.....	22
Efeito da criopreservação nas membranas celulares.....	24
Osmolaridade da célula espermática.....	27
Colesterol.....	28
Ciclodextrinas.....	29
Ciclodextrinas e colesterol vs criopreservação espermática.....	31
<i>AValiação DO SÊMEN</i>	32
<i>Motilidade espermática e fertilidade</i>	32
<i>Morfologia espermática</i>	32

<i>Testes de integridade e funcionalidade de membrana</i>	32
<i>Coloração supra-vital</i>	32
Teste hiposmótico.....	33
Citometria de fluxo.....	34
Ensaio de Ligação.....	36
Zona pelúcida e membrana perivitelina da gema de ovo.....	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
Artigo Científico 1 – Fonte de óleo e níveis de suplementação de vitamina E na ração sobre a composição de ácidos graxos de espermatozóides suínos.....	56
RESUMO.....	56
INTRODUÇÃO.....	57
MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
Artigo Científico 2 – Fonte de óleo e níveis de suplementação de vitamina E na ração sobre as características físicas e morfológicas do sêmen <i>in natura</i> de suínos reprodutores.....	75
RESUMO.....	75
INTRODUÇÃO.....	76
MATERIAIS E MÉTODOS.....	77
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
CONCLUSÃO.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
Artigo Científico 3 – Fonte de óleo e níveis de suplementação de vitamina E na ração sobre a qualidade do sêmen suínos acondicionados a 17 e 5 °C.....	93
RESUMO.....	93
INTRODUÇÃO.....	94
MATERIAIS E MÉTODOS.....	96
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	99

CONCLUSÃO.....	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106
Artigo Científico 4 – Fonte de óleo e níveis de suplementação de vitamina E na ração sobre a criopreservação de sêmen suíno.....	110
RESUMO.....	110
INTRODUÇÃO.....	111
MATERIAIS E MÉTODOS.....	113
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	118
CONCLUSÃO.....	125
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126
Artigo Científico 5 – Adding different cholesterol conjugates loaded cyclodextrin on bull sperm cryosurvival.....	131
ABSTRACT.....	131
INTRODUCTION.....	132
MATERIAL AND METHODS.....	133
RESULTS.....	175
DISCUSSION.....	182
CONCLUSION.....	185
REFERENCES.....	185
Artigo Científico 6 – Delivering cholesterol or cholestanol to stallion sperm membranes improves cryosurvival.....	191
ABSTRACT.....	191
INTRODUCTION.....	192
MATERIAL AND METHODS.....	193
RESULTS.....	197
DISCUSSION.....	198
CONCLUSION.....	199
REFERENCES.....	200
ANEXO.....	203

RESUMO

AMORIM, Elenice Andrade Moraes e, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2008. **Alteração da membrana espermática de suínos, bovinos e eqüinos na qualidade do sêmen.** Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres. Co-Orientadores: Giovanni Ribeiro de Carvalho e José Domingos Guimarães.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar os efeitos da alteração da membrana plasmática de espermatozóides suínos, bovinos e eqüinos sobre a qualidade espermática. Três estudos, com diferentes espécies, foram desenvolvidos. O primeiro estudo foi dividido em 4 experimentos (**E**), no **E1** objetivou-se avaliar a adição de fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E na ração sobre a composição de ácidos graxos em espermatozóides de suínos. Foram utilizados 24 suínos machos reprodutores Dalboard 85, com idades entre 12 e 18 meses, distribuídos num delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 X 3, com duas fontes de óleo (soja e salmão) e três níveis de antioxidantes (150, 300 e 450 mg de vitamina E/kg). A ração com óleo de salmão reduziu ($P < 0,05$) o teor de ácidos graxos ω_6 , especificamente do ácido docosapentanóico (C22:5 ω_6 ; DPA) e aumentou ($P < 0,05$) o teor do ácido docosahexanóico (C22:6 ω_3 ; DHA). Com exceção destes ácidos graxos que apresentaram diferença significativa, nenhuma alteração foi observada nos demais ácidos graxos analisados ($P > 0,05$). O aumento do teor do ácido DHA ($P < 0,05$) nos espermatozóides dos animais tratados com óleo de salmão foi de 34,67 para 45,5%, ao contrário do ácido DPA, que diminuiu de 23,3 para 11,4%, considerando da 1^a para a 10^a semana. O teor de vitamina E nos espermatozóides de suínos não foi alterado ($P > 0,05$) em relação a fonte de óleo e os níveis de vitamina E nas rações. No **E2**, objetivou-se avaliar a adição de fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E na ração sobre as características seminais de sêmen *in natura* de suínos reprodutores. O volume, motilidade espermática total, teste hiposmótico (HOST), porcentagem de espermatozóides vivos e morfologia espermática não diferiram ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Houve efeito do óleo de salmão ($P < 0,05$) sobre o vigor espermático. O nível de vitamina E adicionado na

ração influenciou ($P < 0,05$) a concentração espermática, no entanto, não foi observada diferença entre as fontes de óleo ($P > 0,05$). Os animais tratados com óleo de salmão apresentaram menor ($P < 0,05$) concentração de antioxidantes totais no sêmen que os animais tratados com óleo de soja. Efeito linear ($P < 0,05$) da vitamina E sobre a concentração de antioxidantes totais foi observado. No **E3**, objetivou-se avaliar a adição de fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E na ração sobre as características seminais de sêmen suíno resfriado a 17 e 5 °C. A motilidade e o HOST dos espermatozoides dos animais tratados com óleo de salmão a 17 e 5 °C foi superior ($P < 0,05$) que os tratados com óleo de soja, após 24, 48 e 72 horas. O tratamento com óleo de salmão aumentou ($P < 0,05$) o vigor espermático em ambas as temperaturas avaliadas após 24 e 48 horas. A motilidade, vigor e HOST a 17 e 5 °C diferiram ($P < 0,05$) em relação ao período em que foram acondicionados, onde 24 > 48 > 72 horas. A morfologia anormal total aumentou ($P < 0,05$) no sêmen dos animais tratados com óleo de soja e resfriados a 17 °C, enquanto que o sêmen a 5 °C não apresentou diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos. A morfologia anormal foi maior ($P < 0,05$) no sêmen a 5 °C que a 17 °C, após 24, 48 e 72 horas. O sêmen a 5 °C apresentou parâmetros de viabilidade (motilidade, morfologia e Host) inferior ($P < 0,05$) ao sêmen a 17 °C. No **E4**, objetivou-se avaliar a adição de fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E na ração sobre a criopreservação de sêmen suíno. O congelamento do sêmen reduziu ($P < 0,05$) a qualidade espermática quando compararmos com os resultados do sêmen *in natura*, independente do tratamento. Após o descongelamento, o sêmen dos animais tratados com óleo de soja na ração reduziu ($P < 0,05$) a motilidade espermática total, vigor espermático, porcentagem de espermatozoides vivos e HOST. A motilidade média do sêmen após a diluição, e durante as etapas do congelamento foi de 85 e 84 para os animais tratados com óleo de salmão e soja, respectivamente. Entretanto, após o descongelamento, a motilidade dos animais tratados com óleo de salmão e soja reduziu para 30 e 24%, respectivamente ($P < 0,05$). Para a porcentagem de espermatozoides vivos e a morfologia espermática do sêmen dos animais que foram suplementação com óleo de soja apresentaram maiores valores ($P < 0,05$) que os tratados com óleo de salmão

na ração. No segundo estudo, objetivou-se comparar o efeito da adição de outros tipos de conjugados de colesterol, onde a incorporação aumente a fluidez da membrana a baixas temperaturas conseqüentemente aumentando a sobrevivência após criopreservação. Neste estudo, ejaculados de quarto touros foram divididos em três experimentos (**E**). Os ejaculados de cada touro foram diluídos para a concentração de 120 milhões em diluente Tris. No **E1** e **E2**, o sêmen diluído foi subdividido em quatro tratamentos (**T**): **T1**: controle; **T2**: 1,5 mg colesterol/120 milhões células (controle positivo); e **T3/T4**: 1,5 mg/120 milhões células de ciclodextrina carregada com colestanol ou desmosterol. No **E3**, o sêmen diluído foi subdividido em 10 tratamentos: **T1**: controle; **T2**: 0,75 mg e **T3**: 1,5 mg (Heptanato); **T4**: 0,75 mg e **T5**: 1,5 mg (Palmitato); **T6**: 0,75 mg e **T7**: 1,5 mg (Pelargonato); **T8**: 0,75 mg e **T9**: 1,5 mg (esterato), e **T10**: 1,5 mg CLC/mL (controle positivo). Em todos os experimentos, os espermatozoides ficaram incubados por 15 minutos a 22 °C para permitir a incorporação dos conjugados de colesterol. Após este período, amostras do **E1** de cada tratamento foram usadas para determinar a motilidade e tolerância osmótica, e a habilidade do sêmen fresco se ligar a zona pelúcida (ZP), utilizando o sistema de análise computadorizado Hamilton Thorne Motility Analyser (CASA) e, da membrana perivitelina da gema de ovo (CEPM) utilizando microscópio de epifluorescência. Nos **E2** e **E3**, os espermatozoides foram diluídos na proporção de 1:1 (v:v) em Tris com 20% gema de ovo (EY) e resfriado para 5 °C. Após resfriamento, outra diluição 1:1 (v:v) com Tris contendo 10% EY and 16% glicerol para concentração final de 30 milhões de espermatozoides e seguido de um período de equilíbrio de 15 minutos antes de envasar em palhetas de 0,5 mL, congelar em vapor de nitrogênio líquido por 20 minutos e imergir dentro do nitrogênio líquido para armazenar. Amostras de sêmen foram descongeladas para determinar a motilidade (**E2** e **E3**), habilidade dos espermatozoides se ligarem a ZP (**E3**) e a CEPM (**E2**), e a viabilidade (**E3**) utilizando citômetro de fluxo Epics V. Diferenças entre os tratamentos para todos os parâmetros foram determinadas usando ANOVA. Para **E1**, sêmen fresco tratado com CLC resultou num maior número de ligação a ZP se comparado com todos os outros tratamentos ($P < 0,05$). Nenhuma diferença foi observada entre ZP e CEPM ($P > 0,05$). A motilidade espermática foi maior

para amostras de sêmen fresco tratadas com colesterol, colestanol ou desmosterol carregado pela ciclodextrina que as do controle ($P < 0,05$) quando os espermatozóides foram expostos a diferentes soluções osmóticas, e então retornadas para isosmolalidade. Para o E2, após a criopreservação, a motilidade espermática e o número de espermatozóides ligados a CEPM não diferiu para os espermatozóides tratados com CLC e colestanol comparados aos tratados com desmosterol ($P > 0,05$). Todos os tratamentos apresentaram alta motilidade e eficiência de ligação que os espermatozóides do grupo controle ($P < 0,05$). E para o E3, altas porcentagens da motilidade espermática e da viabilidade celular foram mantidas após descongelamento dos espermatozóides tratados com CLC e pelargonate comparados aos outros tratamentos ($P < 0,05$). A motilidade espermática e o número de espermatozóides ligados a CEPM foram superiores para as células tratadas com CLC ($P < 0,05$). No terceiro estudo, objetivou-se comparar o efeito da adição de colesterol e colestanol carregados pela ciclodextrina em espermatozóides de garanhões antes da criopreservação para melhorar a sobrevivência espermática. Os ejaculados de oito garanhões foram diluídos para 120 milhões de espermatozóides em diluente STALP. Os espermatozóides diluídos foram subdivididos em três tratamentos (**T**): **T1**: controle; **T2**: 1,5 mg colesterol/120 milhões células (controle positivo); e **T3**: 1,5 mg/120 milhões células de ciclodextrina carregada com colestanol. Em todos os experimentos, os espermatozóides ficaram incubados por 15 minutos a 22 °C para permitir a incorporação dos conjugados de colesterol. Após este período, o semen foi diluído 1:5 (v/v) com diluente Lactose-Gema de ovo e resfriado para 5 °C durante 2 horas. Em seguida, o sêmen foi envasado em Palhetas de 0,25 ml, congelada em vapor de nitrogênio líquido por 10 minutos, e então imergidos dentro do nitrogênio líquido até o descongelamento. Diferenças entre os tratamentos foram determinadas usando ANOVA. A motilidade espermática continuou alta após o descongelamento das amostras quando 1,5 mg de CLC foi adicionada para os espermatozóides de garanhões cujos espermatozóides não resistem muito bem ao congelamento, quando comparado aos espermatozóides tratados com colestanol destes mesmo garanhões ($P < 0,05$).

ABSTRACT

AMORIM, Elenice Andrade Moraes e, D.Sc., Universidade Federal Viçosa, April of 2008. **Membrane alteration of boar, bulls and stallions in the quality of semen.** Adviser: Ciro Alexandre Alves Torres. Co-Advisers: Giovanni Ribeiro de Carvalho and José Domingos Guimarães.

This study was realized with the objective to study the effects of the plasmatic membrane alteration of boar, bull and stallion spermatozoa on the sperm quality. Three studies, with different species, were developed. First study, twenty-four mature Dalboard 85 boars, of proven fertility and in routine semen production for artificial insemination, randomly divided, in factorial arrangement 2 X 3, with two oil sources (soy and salmon) and three levels of antioxidants (150, 300 and 450 vitamin E mg/kg). This study was divided in four experiments (**E**), in **E1** the objective was to evaluate the adding oil sources and dietary supplementation of the vitamin E on the fatty acid composition of boar sperm. The dietary supplementation with salmon oil reduced ($P < 0.05$) the proportion of fatty acid ω_6 , specifically of docosapentaenoic acid (22:5 ω_6 ; DPA) and it increased ($P < 0.05$) the proportion of docosahexanoic acid (22:6 ω_3 ; DHA). Except for these fatty acids, no other difference was observed ($P > 0.05$). The increase of the proportion of the DHA ($P < 0.05$) in the sperm of salmon oil treated was from 34.67 to 45.5%, and DPA decreased from 23.3 to 11.4%, from first to 10 week. The proportion of vitamin E in the boar sperm no changed ($P > 0.05$) for all treatments. In **E2**, the objective was to evaluate the adding oil sources and dietary supplementation of the vitamin E on the fatty acid composition of raw boar sperm. The volume, total motile sperm, HOST, percentage of live cells and morphology not differ ($P < 0.05$) between all treatments. There was effect of the salmon oil ($P < 0.05$) on the sperm vigor. The level vitamin E added in the diet changed ($P < 0.05$) the sperm concentration, however, no difference was observed between the oil sources ($P > 0.05$). Salmon oil treatment showed the smallest ($P < 0.05$) concentration of total antioxidants in the semen. Vitamin E and concentration of total antioxidant presented linear effect ($P < 0.05$). In **E3**, the objective was to evaluate the adding oil sources and dietary supplementation of the vitamin E on seminal characteristics of

boar sperm cooled at 17 and 5 °C. The motility and HOST of the animals sperm treated with salmon oil at 17 and 5°C was superior ($P<0.05$) that animals treated with soy oil, after 24, 48 and 72 hours. The treatment with salmon oil increased ($P<0.05$) the sperm vigor in both temperatures evaluated after 24 and 48 hours. The motility, vigor and HOST of sperm at 17 and 5 °C differed ($P<0.05$) during all period that were preserved, where 24>48>72 hours. The total abnormal morphology increased ($P<0.05$) in the semen of the animals treated with soy oil and cooled at 17 °C while the semen at 5 °C no difference was presented ($P>0.05$) among the all treatments. The abnormal morphology was bigger ($P<0.05$) in the semen at 5 °C that at 17 °C, after 24, 48 and 72 hours. The semen at 5 °C presented viability parameters (motility, morphology and Host) inferior ($P<0.05$) for the semen at 17 °C. And **E4**, the objective was to evaluate the adding oil sources and dietary supplementation of the vitamin E on the fatty acid composition of boar sperm. The frozen process of semen reduced ($P<0.05$) the sperm quality when compared this results with fresh sperm, independent of treatment. After thawing, the semen of the animals treated with soy oil in the diet reduced ($P<0.05$) the total motile sperm, sperm vigor, percentage of live sperm and HOST. The motility of the semen after dilution and during cryopreservation process was 85 and 84% for all animals treated with salmon and soy oil, respectively. Therefore thawing, the motility of the animals treated with salmon and soy oil was 30 and 24%, respectively ($P<0.05$). For the percentage of sperm died and morphology, the sperm of the animals treated with soy oil presented higher values ($P<0.05$) that animals treated with salmon oil in the diet. In second study, the objective was realized to compare the effect of adding other cholesterol conjugates, which should incorporate into and increase membrane fluidity at low temperatures thereby increasing cryosurvival. In this study ejaculates from four bulls were divided in three experiments (**E**). Ejaculates from each of four bulls were diluted to 120 million cells in a Tris diluent. In **E1** and **E2**, the sperm diluted were subdivided into four treatments: No additive (control); 1.5 mg CLC/120 million sperm (positive control); and 1.5 mg/120 million sperm of cyclodextrin pre-loaded with cholestanol or desmosterol. In **E3**, the sperm diluted were subdivided into 10 treatments: **T1**: no additive (control); **T2**: 0.75 mg and **T3**: 1.5

mg (Heptanoate); **T4**: 0.75 mg and **T5**: 1.5 mg (Palmitate); **T6**: 0.75 mg and **T7**: 1.5 mg (Pelargonate); **T8**: 0.75 mg and **T9**: 1.5 mg (stearate), and T10: 1.5 mg CLC/mL (positive control). For all experiments, the sperm treated were incubated for 15 min at 22 °C to allow for incorporation of cholesteryl conjugates. After this period, in E1 samples from each treatment were used to determine the motility and osmotic tolerance and, ability of fresh sperm to bind to the zona pellucida (ZP) using a Hamilton Thorne Motility Analyser (CASA), and chicken egg perivitelline membrane (CEPM) using a epifluorescence microscopy. And in **E2** and **E3**, the sperm were diluted 1:1 (v:v) in Tris with 20% Egg Yolk EY) and cooled to 5 °C. After dilution 1:1 (v:v) with Tris containing 10% EY and 16% glycerol for final concentration 30 million sperm and allowed to equilibrate for 15 minutes before packaging into 0.5 mL French straws, freezing in static liquid nitrogen vapor for 20 minutes and plunging into liquid nitrogen for storage. Samples were thawed to determine the motility (**E2** and **E3**), ability of sperm to bind to the ZP (**E3**) and the CEPM (**E2**), and viability (**E3**) using Epics V Flow Cytometer. Treatment differences for all parameters were determined using analysis of variance. For E1, treating fresh sperm with CLC resulted in more binding to the ZP and compared to all other treatments ($P<0.05$). No differences were observed between ZP and CEPM binding ($P>0.05$). The percentages of motile sperm were higher for fresh samples treated with cholesterol, cholestanol or desmosterol loaded cyclodextrin than control cells ($P<0.05$) when sperm were exposed to anisotonic conditions, and then returned to isosmolality. For **E2**, after cryopreservation the percentages of motile sperm and number of sperm binding to each CEPM were similar for sperm treated with CLC and cholestanol compared to sperm treated with desmosterol ($P>0.05$). All treatments provided higher motility and binding efficiency than control sperm ($P<0.05$). And for **E3**, higher percentages of motile sperm and viable cells were maintained after thawing sperm treated with CLC and cholesteryl-pelargonate compared to all other treatments ($P<0.05$). The percentage of motile sperm and number sperm binding to CEPM was higher for CLC-treated cells ($P<0.05$). Therefore, adding cholesterol or cholesteryl-pelargonate or cholestanol to bull sperm membranes improved cell cryosurvival. Third study, the objective was to compare the effect of adding

cholesterol and cholestanol loaded cyclodextrins in stallion sperm prior to cryopreservation to optimize sperm cryosurvival. Ejaculates from each of 8 stallions were diluted to 120 million cells in a STALP diluent. The sperm diluted were sub-divided into three treatments: No additive (control); 1.5 mg CLC/120 million sperm (positive control); and 1.5 mg/120 million sperm of cyclodextrin pre-loaded with cholestanol. For all experiments, the sperm treated were incubated for 15 min at 22 °C to allow for incorporation of cholesteryl conjugates. After this period, the semen was diluted 1:5 (v/v) with Lactose-Egg Yolk diluent and cooled to 5 °C over a 2 hours period. Loaded into 0.25 mL polyvinylchloride straws, frozen in liquid nitrogen vapor for 10 min, and then plunged into liquid nitrogen until further use. Treatment differences for all parameters were determined using analysis of variance. Higher percentages of motile sperm were maintained after thawing when 1.5 mg CLC was added to sperm from stallions whose sperm do not survive freezing well, compared to cholestanol and control sperm from those same stallions ($P<0.05$). Addition of CLC also resulted in more sperm binding to the zona pellucida of bovine oocytes after cryopreservation than cholestanol and control sperm ($P<0.05$). In conclusion, CLC improved the percentage of post-thaw motility in equine sperm as well as increased the number of sperm that bind to zona pellucida. Addition of CLC to stallion sperm prior to cryopreservation is a simple procedure that increases the cryosurvival of cells.

INTRODUÇÃO GERAL

A membrana plasmática exerce um papel fundamental na sobrevivência do espermatozóide no trato reprodutivo feminino e na manutenção da sua capacidade fertilizante, visto que, garante a homeostase celular, sendo essencial para manter a sua viabilidade (Celeghini, 2005). A membrana plasmática é mais frágil que a membrana acrossomal externa e a membrana mitocondrial, sendo assim, sua preservação é o ponto crítico para o sucesso do resfriamento e criopreservação (Harrison e Vickers, 1990; Valcárcel et al., 1997).

Os lipídios que compõem a membrana plasmática dos espermatozóides mamíferos são preferencialmente os insaturados que conferem a ela uma consistência fluida. Seu rearranjo pode ser induzido pelas mudanças de temperatura e pode ser causado pela afinidade dos lipídios a certas glicoproteínas transmembranas (Wolfe et al., 1998).

A desestabilização da membrana plasmática do espermatozóide pode ocorrer quando as membranas celulares lipídicas sofrem a transição da fase líquida cristalina para a fase gel devido à diminuição da temperatura (Barrera-Compean et al., 2005). Sendo assim, parte dos danos espermáticos induzido pelo choque térmico é atribuída à transição de fase lipídica (Moce e Graham, 2006). Se a temperatura na qual ocorre a transição de fase pudesse ser diminuída ou eliminada completamente, as membranas poderiam permanecer fluídas a baixas temperaturas e o dano que ocorre nessa transição poderia ser reduzido (Purdy e Graham, 2004).

A fluidez da membrana é modulada pelo nível de colesterol, grau de insaturação da cadeia acil dos fosfolipídios, composição dos fosfolipídios e pelas proteínas de membrana (Darin-Bennett e White, 1977). Portanto, a adaptabilidade da membrana aos efeitos danosos do congelamento e descongelamento é superior nos espermatozóides com elevada fluidez de membrana (Giraud et al., 2000). Buscando isso, algumas substâncias têm sido incorporadas ao sêmen, seja por uma via direta (adição no ejaculado) ou indireta (adição na ração dos animais), com o objetivo de diminuir os danos provocados pela criopreservação dos espermatozóides em várias espécies. Lipídios como o colesterol (Zahn, 2002; Purdy e Graham, 2004;

Moore et al., 2005), colestanol (Amorim et al., 2007) e desmosterol (Nimmo e Cross, 2003; Moce e Graham, 2006; Amorim et al., 2008), e ácidos graxos poliinsaturados (Paulenz et al., 1999; Cerolini et al., 2001; Mitre et al., 2004) foram testadas apresentando benefícios na manutenção da viabilidade, função e *status* de acrossoma dos espermatozóides criopreservados.

Embora as técnicas utilizadas para estocar o sêmen de bovino, eqüino e suíno foram melhoradas durante os anos, a preservação a baixa temperatura ainda traz com isto efeitos desfavoráveis na sobrevivência e capacidade fertilizante dos espermatozóides. Objetivou-se alterar a membrana espermática do sêmen de suínos, bovinos e eqüinos buscando avaliar adicional melhoria nos métodos de preservação dos espermatozóides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, E.A.M.; GRAHAM, J.D.; SPIZZIRI, B.; MEYERS, M.; AMORIM, L.S.; TORRES, C.A.A. The Effect of Adding Cholesteryl-Heptanoate, -Palmitate, -Pelargonate, or -Stearate Loaded Cyclodextrin on Bull Sperm Cryosurvival. 40th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (SSR), Proceeding 40th Annual Meeting of the SSR, July, San Antonio – TX – EUA, 2007.
- AMORIM, E.A.M.; GRAHAM, J.D.; MEYERS, M.; SPIZZIRI, B. Delivering Cholesterol or Desmosterol to Bull Sperm Membranes Improves Cryosurvival. 34th Annual Conference of the International Embryos Transfer Society (IETS), Proceedings The journal Reproduction, Fertility & Development, January 5-9, Denver – CO – EUA, 2008.
- BARRERA-COMPEAN, M.H.; PURDY, P.H.; DZAKUMA, J.M.; NEWTON, G.R.; NUTI, L.C. Cholesterol-loaded cyclodextrins improves post-thaw goat sperm motility. *Journal of Animal Science* 83(Suppl.1):153, 2005.
- CELEGHINI, E.C.C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2005. 186p.
- CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T.M. Changes in sperm quality e lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction*. 121(3):395-401, 2001.
- DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*. 14(4):466-70, 1977.
- GIRAUD, M.N.; MOTTA, C.; BOUCHER, D.; GRIZARD, G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *International Journal of Andrology* 24:327-334, 2001.
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 88(1):343-352, 1990.

- MITRE, R.; CHEMINADE, C.; ALLAUME, P.; LEGRAND, P.; LEGRAND, A.B. Oral intake of shark liver oil modifies lipid composition and improves motility and velocity of boar sperm. *Theriogenology* 62:1557-1566, 2004.
- MOCÉ, E., GRAHAM, J.K. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival *J. Anim. Sci.*, v.84, p.826–833, 2006.
- MOORE, A.I., SQUIRES, E.L., GRAHAM, J.K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, v.51, p.241–249, 2005.
- NIMMO, M.R.; CROSS, N. Structural features of sterols required to inhibit human sperm capacitation. *Biology of Reproduction* 68:1308-1317, 2003.
- PAULENZ, H.; TAYGBOL, O.; KOMMISRUUD, E.; GREVLE, I.S. Effect of dietary supplementation with cod liver oil on cold shock and freezability of boar semen. *Reprod. Dom. Anim.* 34:431-435, 1999.
- PURDY, P.H.; GRAHAM, J.K. Effect of cholesterol loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*, 48:36-45, 2004.
- VALCÁRCEL, A.; de las HERAS, M.A.; PÉREZ, L.; MOSES, D.F.; BALDASSARRE, H. Assessment of acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. *Animal Reproduction Science* 45:299-309, 1997.
- WOLFE, C.A.; JAMES, P.S.; MACKIE, A.R.; LADHA, S.; JONES, R. Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. *Biology of Reproduction* 59:1506-1514, 1998.
- ZAHN, F.S. Efeito da incorporação de colesterol na membrana plasmática de espermatozóides sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade do sêmen congelado na espécie eqüina. 2002. 110p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

REVISÃO DE LITERATURA

A CÉLULA ESPERMÁTICA

Estrutura do espermatozóide

Espermatozóides são células haplóides especializadas que tem uma habilidade limitada para biossíntese e regeneração celular (Amann e Graham, 1993). Os espermatozóides completamente desenvolvidos são células alongadas, consistindo de uma achatada cabeça contendo o núcleo e de uma cauda contendo o aparelho necessário para a motilidade celular. O espermatozóide é recoberto pela plasmalema, ou membrana plasmática. A célula espermática possui cinco regiões estruturais: cabeça, colo, peça intermediária, peça principal e peça terminal (Fawcett, 1975), tendo cada região importância funcional na fertilização dos oócitos.

A cabeça de espermatozóide de suíno possui o núcleo, acrossoma, região pós acrossoma, e a membrana plasmática. A forma da cabeça é determinada pela forma de núcleo. O núcleo do espermatozóide possui um DNA altamente condensado que é rodeado por um envelope nuclear (Amann e Graham, 1993). O acrossoma é uma organela altamente especializada que se assemelha a um lisossoma celular e cobre a porção anterior da cabeça (Amann e Graham, 1993; Abou-Haila e Tulsiani, 2000). O acrossoma é rodeado pela membrana acrossomal interna e externa, e contém grânulos secretórios derivados do complexo de Golgi que secretam enzimas hidrolíticas incluindo pró-acrosina, hialuronidase, esterases, e hidrolases ácidas. Estas enzimas hidrolíticas são responsáveis pela penetração dos oócitos (Fawcett, 1975; Amann e Graham, 1993; Abou-Haila e Tulsiani, 2000).

A cauda do espermatozóide é composta de colo, peça intermediária, principal e terminal. O colo conecta a cabeça à peça intermediária, e forma uma placa basal que se ajusta dentro de uma depressão na superfície posterior do núcleo. O colo também contém o centríolo proximal que é responsável pela contratilidade necessária para o movimento da cauda do espermatozóide (Amann e Graham, 1993). A placa basal do colo é contínua com nove fibras que posteriormente se projetam, na maior parte da cauda.

Mitocôndria, fibras densas exteriores, axonema, e *annulus* são os componentes estruturais da peça intermediária. Mitocôndria fornece a energia responsável pela motilidade dos espermatozóides com a produção de ATP. As nove fibras densas exteriores, originadas na peça intermediária e estendendo à porção caudal da peça principal, provêm rigidez à cauda (Amann e Graham, 1993). O axonema é composto de nove pares de microtúbulos envolvendo 2 filamentos centrais. O axonema estende da região de colo à peça terminal com as fibras que ficam progressivamente mais finas e são responsáveis pela motilidade de espermatozóides. O *annulus* provê uma clara distinção da porção caudal da peça intermediária e o começo da peça principal (Fawcett, 1975).

A peça principal é composta centralmente do axonema e sua associação de fibras grosseiras. As fibras provêm a rigidez precisa para movimento da cauda (Amann e Graham, 1993). A peça terminal possui apenas o axonema recoberto pela membrana plasmática (Fawcett, 1975).

Membrana plasmática

A membrana plasmática ao redor dos espermatozóides é formada basicamente por uma bicamada lipídica com proteínas integrais e periféricas, glicoproteínas de superfície e glicolipídios organizados em um mosaico fluído (Singer e Nicholson, 1972). As proteínas integrais e periféricas são aproximadamente 50% do peso da membrana, e estão entremeadas ao longo da bicamada lipídica. Proteínas integrais são canais através da membrana e estão situadas na bicamada lipídica. Já as proteínas periféricas podem ser removidas facilmente da membrana (Amann e Graham, 1993).

Os fosfolipídios estão em um arranjo lamelar que organiza a cadeia de ácido graxo em uma barreira hidrofóbica, prevenindo a entrada de água ou outras moléculas. À temperatura corporal, a membrana plasmática está no estado fluído e o arranjo lamelar permite aos fosfolipídios se moverem livremente ao longo da bicamada (Amann e Pickett, 1987; Amann e Graham, 1993). Como a temperatura das células diminui, durante um processo de resfriamento, a membrana passa por uma fase de transição do estado líquido para o estado cristalino. As proteínas se agregam ao longo da

membrana, ficando instável. Os danos desta fase de transição são frequentemente irreversíveis (Holt e North, 1984; Amann e Pickett, 1987; Amann e Graham, 1993).

A relação de colesterol para fosfolipídios é responsável pela fluidez da membrana (Darin-Bennet et al., 1977). Regiões da membrana com alto teor de colesterol são menos fluídas que porções com maior proporção de fosfolipídios (Amann e Pickett, 1987). Darin-Bennett et al. (1977) verificaram que espécies com maior concentração de colesterol apresentam menor danos causados à membrana durante o processo de resfriamento.

A presença de colesterol e de proteínas integrais fornece um arranjo lamelar de fosfolipídios que é responsável por manter a bicamada. Quando a relação de colesterol para fosfolipídios é alterada, para uma relação menor que 1:2, o processo de resfriamento causa um rearranjo devido à fase de transição do estado líquido para o cristalino (Amann e Pickett, 1987).

ÁCIDOS GRAXOS

Estrutura, síntese e função

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos alifáticos obtidos, geralmente, da hidrólise das gorduras e óleos naturais. A estrutura química de um ácido graxo é dado por 3 números: (1) número de átomos de carbono na cadeia, (2) número de duplas ligações e (3) número ômega (ω), que indica a posição da primeira dupla ligação a partir do grupo metila, por exemplo no caso da série ω_3 a primeira dupla ligação ocorre entre o terceiro e quarto carbono e no caso da família ω_6 a primeira dupla ligação ocorre entre o sexto e sétimo carbono. Os ácidos graxos que possuem o mesmo número ômega pertencem à mesma família. Os ácidos graxos linoléico e α -linolênico (famílias ω_6 e ω_3 , respectivamente) são considerados essenciais por não serem sintetizados no organismo animal, somente por vegetais, e, portanto, devem ser fornecidos junto a dieta (McDowell, 1989). Os hepatócitos de mamíferos podem introduzir rapidamente duplas ligações na posição Δ^9 dos ácidos graxos, mas não podem introduzir duplas ligações adicionais na cadeia do ácido graxo entre C-10 e a extremidade metila terminal. As dessaturases vegetais responsáveis pelas ligações duplas nas

posições Δ^{12} e Δ^{15} estão localizadas no retículo endoplasmático (Lehninger et al., 1995).

O palmitato (C16:0) é o precursor de outros ácidos graxos de cadeia longa. Pode ser aumentado para formar tanto o estearato (C18:0) quanto ácidos graxos ainda maiores, por adições de grupos acetila, pela ação dos sistemas de alongamento dos ácidos graxos presentes no retículo endoplasmático liso e na mitocôndria. O palmitato e o estearato servem como precursores dos dois ácidos graxos monoinsaturados mais comuns nos tecidos animais: o palmitoleato (C16:1) e o oleato (C18:1) (Lehninger et al., 1995).

Nos mamíferos, os ácidos graxos de uma mesma família podem ser metabolicamente convertidos em outros ácidos graxos que possuem número maior de carbonos por meio de processos de alongação e dessaturação de suas cadeias. As séries $\omega 9$ e $\omega 7$ podem ser derivadas da síntese endógena a partir do ácido oléico (18:1 $\omega 9$) e do ácido palmitoléico (16:1 $\omega 7$), respectivamente. Assim, o ácido oléico (C18:1 $\omega 9$) pode dar origem ao ácido eicosatrienóico (C20:3 $\omega 9$). Na série $\omega 6$, o ácido araquidônico (C20:4 $\omega 6$) é derivado do ácido linoléico (18:2 $\omega 6$) e na série $\omega 3$, o ácido eicosapentanóico (C20:5 $\omega 3$; EPA), o ácido docosahexanóico (C22:6 $\omega 3$; DHA) e o ácido docosapentanóico (C22:5 $\omega 3$; DPA) são derivados do ácido alfa-linolênico (18:3 $\omega 3$) (McDowell, 1989).

Assim, cada um destes ácidos graxos origina uma série de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), cada vez mais insaturados, mas não entre famílias, visto que, o metabolismo animal não é capaz de dessaturar (adicionar duplas ligações) em direção à extremidade do radical metila do ácido graxo (McDowell, 1989). Dentro de cada família, o processo de alongação e dessaturação ocorre sem alteração do grupo metila final (Neuringer et al., 1988) e sim, a dessaturação vai em direção do grupo carboxílico (Conn e Stumpf, 1980). O sistema enzimático que promove a alongação da cadeia (elongase), dessaturação (Δ -6 dessaturase, Δ -5-dessaturase, Δ -4 dessaturase) e inserção de ácidos graxos dentro de várias moléculas lipídicas, é o mesmo, havendo por isso uma competição pelas mesmas enzimas para formação de PUFAs (C20-22), principalmente ácido

araquidônico (20:4 ω -6) e DHA (Neuringer et al., 1988; McDowell, 1989; Briz, 1997). A família ω 3 suprime efetivamente o metabolismo da família ω 6, assim também, a família ω 6 é capaz de suprimir o metabolismo da família ω 3, mas, menos efetivamente (McDowell, 1989). Portanto, um excesso de ω 6 na dieta, por exemplo, limita a formação dos ω 3. As dessaturases animais (Δ -6 dessaturase e Δ -5- dessaturase) têm maior afinidade pela série ω 3, seguida da ω 6 e, por último, pela ω 9 (Nunes, 1995).

Segundo Marshal et al. (1994) o papel dos PUFAs no organismo humano é muito importante. O ácido linoléico e o araquidônico ajudam a promover a integridade da hipófise e o transporte de vitaminas lipossolúveis. Esta série ω 6 é encontrada nos triglicerídios de reserva. A série ω 3 predomina nos fosfolipídios das membranas celulares e regulam sua permeabilidade e flexibilidade (Sirri et al. 1995). O DHA é encontrado particularmente no cérebro, na retina, nos espermatozoides.

Fontes de ácidos graxos ômega-3

As fontes de ácidos graxos ω 3 (α -linolênico, EPA, DPA e DHA) são óleos de origem animal e vegetal. O ácido α -linolênico pode ser encontrado nas folhas de diversas plantas e nas sementes de linho e canola. Os ácidos EPA e DHA são encontrados em óleos de origem animal e também podem ser sintetizados pelo homem e pelos animais via dessaturação e alongamento da cadeia do ácido α -linolênico da dieta. Assim, a concentração dos diversos ω 3 é muito variável, em função das fontes e de seu nível na dieta (Briz, 1997).

Os teores em ω 3 em óleo de peixe variam de acordo com a espécie de origem, seu estado fisiológico e época de pesca (Briz, 1997). As espécies de maior interesse são as de águas frias, pois se alimentam de fito e zooplâncton ricos em ω 3, particularmente o atum, bonito, menhaden, cavala, anchova e sardinha. Os métodos de processamento e refinamento desses óleos afetam seu conteúdo de ω 3, que pode variar entre 30 e 50%, deste modo, técnicas modernas mais seguras, estão baseadas no emprego de lípases, visto que, os tratamentos térmicos aumentam a oxidação dos PUFAs (Briz, 1997). Já na farinha de peixes há pouco teor de ácido graxo linoléico e

α -linolênico. A proporção de ω 3 oscila entre 20-35%, predomina o EPA (15-18%) nas farinhas de sardinha e menhaden. O conteúdo de DHA é elevado (13-15%) nas farinhas de sardinha, anchoveta e arenque, mas é preciso incorporar níveis elevados para alcançar concentrações de ω 3, comparáveis às dos óleos de peixe (Briz, 1997).

Nas fontes vegetais de ω 3, a mais conhecida é a linhaça (semente de linho) e, a espécie de linho mais rica em ω 3 é *Linum usitatissimum*. Os óleos vegetais, como o de canola resultam em uma menor riqueza de ω 3 e α -linolênico, mas seu teor em DHA é bastante similar com óleo de linhaça (Farrel, 1994 citados por Briz, 1997). A relação ω 6: ω 3 obtida com o óleo de linhaça é de 1-1,2 (Cherian et al., 1996) e de 2,6 na mistura com canola (Farrel, 1994 citados por Briz, 1997), ambos os óleos são boas fontes de ácido linoléico e a mistura resulta em um menor enriquecimento em ácido α -linolênico e DHA (Farrel, 1994 citados por Briz, 1997). Os óleos vegetais têm vantagens, pois custam menos e possuem maior estabilidade oxidativa (Briz, 1997), portanto, sua inclusão na dieta, em substituição a uma fonte animal, como por exemplo, óleo de peixe, tem a vantagem de evitar o aparecimento de sabores atípicos nas carnes.

Conversão dos ácidos graxos ω 3

A conversão de um ácido graxo ω 3 de cadeia curta para um outro da série ω 3 de cadeia longa é possível (Figura 1), entretanto, em humanos esta transformação é muito lenta, tendo como passo limitante a enzima delta-6-dessaturase. Conseqüentemente, o ácido α -linolênico não é considerado uma fonte para síntese dos ácidos EPA e DHA, embora seja o seu precursor. Dieta enriquecida com ácido α -linolênico não produz os mesmos efeitos clínicos quando comparado aos EPA e DHA (Barlow et al. 1990 citados por Barlow e Pike, 1991).

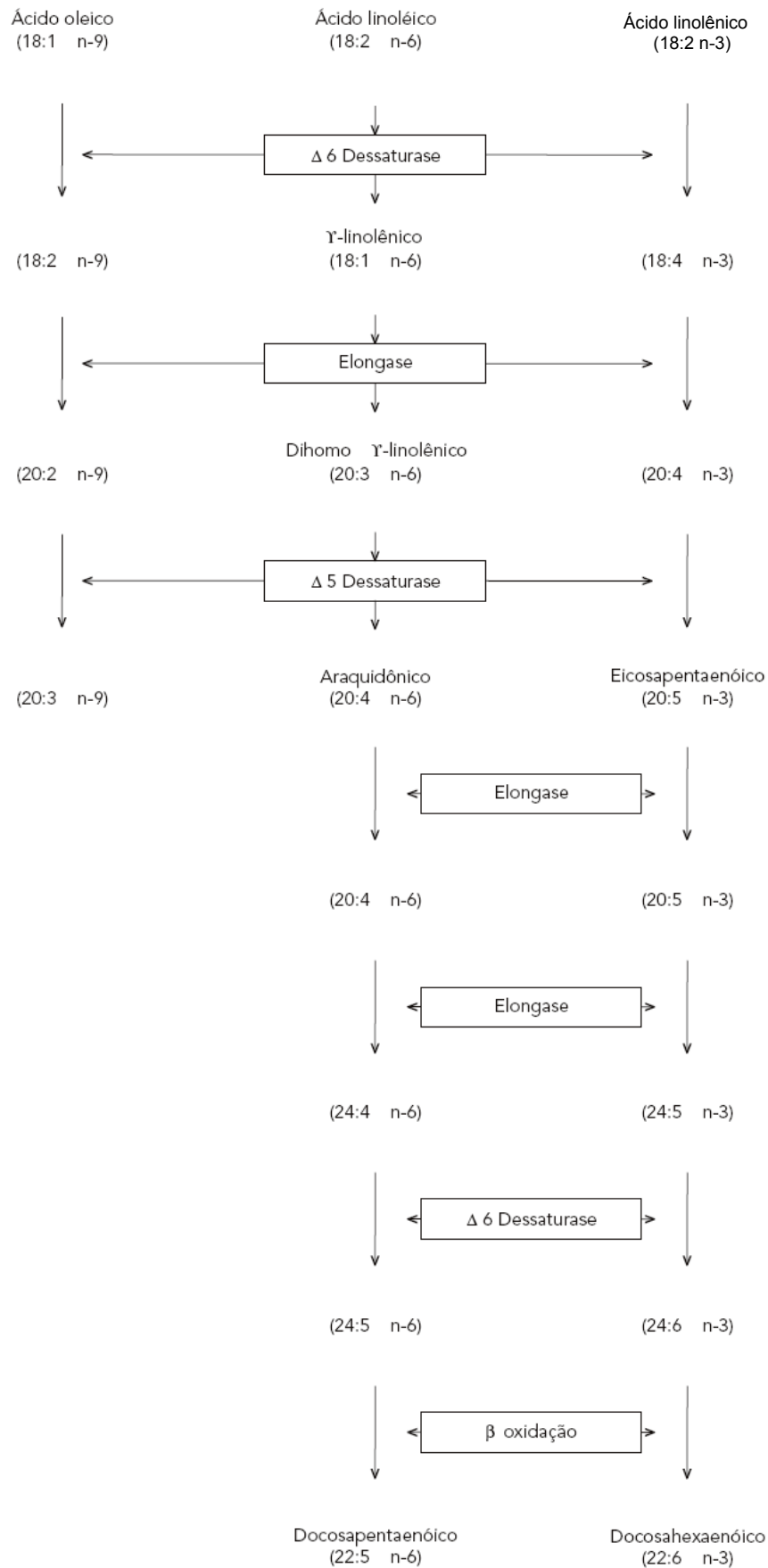


Figura 1 – Biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados.

Ácidos graxos essenciais na composição das membranas

Os ácidos graxos essenciais de cadeia longa no testículo são de grande importância, visto que, há evidências de seu papel importante na integridade das membranas testiculares (Stubbs e Smith, 1984).

Acredita-se que mudanças na composição lipídica das membranas plasmáticas levam a alteração de suas funções, visto que, receptores envolvidos nos sinais celulares, transportadores e enzimas estão na bicamada lipídica, e qualquer mudança na composição de ácidos graxos das membranas pode afetar sua função (Sudheera et al., 1997). A atividade da enzima $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}\text{ATPase}$ do retículo sarcoplasmático, adenilciclase é marcadamente influenciada pelos níveis de ácidos graxos poliinsaturados $\omega 6$ e $\omega 3$ nos lipídios da membrana.

Ácidos graxos essenciais no desempenho reprodutivo animal

A quantidade e o tipo de ácidos graxos presentes na dieta têm efeito marcante no metabolismo lipídico dos suínos. A concentração espermática é maior quando se usa óleo de soja como fonte de ácidos graxos (Mascarenhas, 2001).

Miescher (1897) citado por Mann (1964) observou a presença de quantidades significativas de lipídios no espermatozóide; demonstrando sua concentração na cauda e na porção mediana do espermatozóide. Análises histoquímica mostraram que os lipídios da porção mediana estão associados principalmente com a bainha mitocondrial, que circunda o filamento axial e, da cauda do espermatozóide ocorrem como constituintes de lipoproteínas.

De modo geral, o conteúdo de lipídios em espermatozóides maduros é de aproximadamente 6 a 7% do peso seco da célula; os fosfolipídios representam aproximadamente 60% do total de lipídios (Howarth et al., 1977, Howarth, 1981b citado por Lake (1984). O colesterol é o segundo principal componente da membrana plasmática e ocorre principalmente nas formas não-esterificadas (Scott, 1973). Os fosfolipídios são as principais fontes de substrato energético, a partir da oxidação de lipídios intracelulares, para respiração do espermatozóide (Mann, 1964, Scott, 1973). Assim, a capacidade do espermatozóide de sintetizar estes lipídios a partir de

substratos externos deve aumentar sua habilidade de sobrevivência no trato reprodutivo do macho e da fêmea (Scott, 1973).

No final da espermatogênese e espermiogênese, o espermatozóide torna-se uma célula com capacidade metabólica simples. A entrada de nutrientes é limitada pela permeabilidade da membrana sendo permeáveis as hexoses (glicose e frutose) e ácidos de três e quatro carbonos (lactato, piruvato e/ou β -hidroxibutirato) que irão participar do ciclo glicolítico e tricarboxílico para gerar ATP e produtos finais ácidos e gases. Na presença de oxigênio (O_2) o metabolismo mitocondrial gera a maioria do ATP celular; neste caso as reservas endógenas (provavelmente lipídios) podem ser usadas. Na ausência de O_2 o espermatozóide pode utilizar substratos glicolíticos (mas não ácidos) para produzir ATP e produtos finais ácidos (lactato); as reservas endógenas não podem ser usadas. A motilidade do espermatozóide consome uma grande fração de ATP (Hammerstedt, 1993).

Os fosfolipídios presentes no espermatozóide fazem parte do complexo lipoprotéico da membrana plasmática (Scott, 1973) e são caracterizados por conterem maior proporção de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) quando comparado aos verificados nos triglicerídios dos depósitos de gordura. Portanto, qualquer mudança na proporção de fosfolipídios individuais ou na composição de ácidos graxos deve ter efeito na estrutura e na função da membrana do espermatozóide (Scott, 1973).

Veenheuvel (1971) citado por Scott (1973) observou que o aumento na proporção de ácidos graxos poliinsaturados no espermatozóide, durante a maturação no epidídimo, melhorou as propriedades físicas e químicas da membrana celular.

Por outro lado, os fosfolipídios e ésteres de colesterol com alta proporção de ácidos graxos saturados tendem a serem mais rígidos ou menos fluidos que os componentes de membrana similares com elevadas proporções de PUFAs, com função de fornecer lipídios que sejam fluidos à temperatura corporal (McDowell, 1989).

Nos sistemas biológicos, as membranas possuem uma variedade de funções, entre elas, pode se citar: transporte de íons e de solutos moleculares para o interior e exterior da célula; barreira seletiva em torno da célula; sítios de receptores para a interação com agentes metabólicos de

controle e, como uma base para função opcional das enzimas. Deste modo, as mudanças que ocorrem no perfil de lipídios do espermatozóide durante seu período de maturação no epidídimo devem influenciar alguma, se não todas, as suas funções. O mecanismo de influencia sobre a longevidade e a capacidade de fertilização de espermatozoides maduros por diferenças na composição dos lipídios é desconhecido, mas, inevitavelmente reflete a reorganização da membrana (Scott, 1973).

Scott (1973) observou que os ácidos graxos ligados aos fosfolipídios presentes no espermatozóide de suínos foram os saturados: o palmítico (16:0) e o esteárico (18:0), e os insaturados mais abundantes: o DPA (ω 6) e DHA.

Segundo Kelso et al. (1997) a suplementação de ácido docosahexanóico (óleo de peixe) na composição de ácidos graxos dos fosfolipídios nos espermatozoides de galos reprodutores pesados, induziu um aumento na proporção de ácidos graxos 22:6 ω 3 e também de 18:1 ω 9, 20:5 ω 3 e 22:5 ω 3 e uma redução nas proporções de 18:2 ω 6, 20:4 ω 6 e 22:4 ω 6, que resultaram numa diminuição da relação ω 6: ω 3. Esta diferença no perfil de ácidos graxos presentes nos espermatozoides de aves e dos mamíferos pode representar uma adaptação à temperatura corporal.

Blesbois et al. (1997) verificaram que o sêmen fresco de galos reprodutores alimentados com óleo de salmão apresentou maior taxa de fertilidade (96%) que os tratados com óleo de milho (91,6%). Zanini et al. (2003) observaram que galos alimentados com diferentes fontes de óleos apresentaram o conteúdo de ácidos graxos dos espermatozoides, as características seminais e a taxa de fertilidade foram influenciadas pela fonte de óleo utilizada. Nos suínos, Murgas et al. (1999) observaram um aumento do volume do ejaculado em animais suplementados com 3,5% de óleo de soja como fonte de ácidos graxos essenciais.

Antioxidantes

A vitamina E compreende a classe de substâncias químicas derivadas do deidrocromanol, sintetizada pelos vegetais e, pela posição dos grupos metil no anel, os tocoferóis são denominados alfa (α), beta (β), gama (γ) e

sigma (δ), observados em altas concentrações nos óleos vegetais e praticamente ausentes na gordura animal. Com o refinamento de óleos vegetais ocorre redução no teor de tocoferóis (31 a 47%). A atividade antioxidante em condições fisiológicas (37°C) segue a ordem: $\alpha > \beta > \gamma > \delta$, similar à atividade biológica. O α -tocoferol é o mais abundante dos tocoferóis, e sua atividade biológica é duas vezes maior que o β e γ e 100 vezes o δ (Araújo, 1999). A bio-atividade dos tocoferóis para a prevenção de miopatias nas aves é: α -tocoferol = 100; β -tocoferol = 12; γ -tocoferol = 5.

O α -tocoferol é um excelente antioxidante natural, que protege caroteno e outros materiais oxidáveis, presentes no alimento e no organismo (Mcdowell, 1989). Entre os materiais oxidáveis no organismo incluem-se ácidos graxos poliinsaturados presentes nos fosfolipídios das membranas celulares e subcelulares (mitocondrial, endoplasmática e reticular) e as proteínas de membrana celular (Hoppe, 1988). No alimento, os principais fatores que influenciam a estabilidade das vitaminas são a umidade, presença de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), peróxidos e elementos traços.

Os ácidos graxos poliinsaturados de configuração $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ possuem o hidrogênio no átomo de carbono central facilmente abstraído, resultando na formação de um radical livre. Os elétrons no radical reajustam-se e são adicionado ao oxigênio, proveniente do metabolismo normal, para formar um peróxido, que rompendo formam dois radicais livres, resultando numa reação em cadeia auto-propagadora. Os antioxidantes, como a vitamina E, atuam fornecendo hidrogênio para o radical livre, estabilizando-o. O antioxidante torna-se um radical livre, mas tem a propriedade de poder reajustar-se em um composto estável e dessa maneira interromper a reação de propagação (Swenson e Reece, 1996).

De acordo com Parker (1992) citado por Surai et al. (1997), a concentração máxima de α -tocoferol observado nas membranas celulares é geralmente muito baixa, havendo, portanto, uma limitação biológica de seu aumento. A suplementação de α -tocoferol na dieta de galos resultou em um aumento nas proporções de ácidos graxos poliinsaturados (C20-22) nos fosfolipídios dos espermatozóides principalmente de 20:4 ω 6 e 22:4 ω 6 devido

a uma redução significativa na suscetibilidade dos espermatozoides a peroxidação de lipídios. Estes autores concluíram que o aumento na ingestão de α -tocoferol melhora o perfil de lipídios do sêmen e sua capacidade antioxidante, podendo melhorar a viabilidade e função espermática e, assim a fertilidade dos machos.

Surai et al (2000) determinaram o conteúdo de vitamina E, a susceptibilidade a peroxidação de lipídios e a composição de ácidos graxos de fosfolipídios presentes nos espermatozoides de patos. Os fosfolipídios foram caracterizados pela alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados representados pelos ácidos araquidônico (C20:4 ω 6), docosatetraínico (C22:4 ω 3), DPA (ω 6) e DHA. A elevada proporção de DHA nas frações de fosfolipídios dos espermatozoides e baixos níveis de vitamina E poderia predispor a peroxidação de lipídios. Foi sugerido então que, o aumento da atividade da superóxido dismutase, da glutathione peroxidase e da atividade antioxidante do plasma seminal pôde compensar os baixos níveis de vitamina E a fim de proteger as membranas dos espermatozoides que exibem alto nível de insaturação.

Radicais livres

Entende-se por radical livre qualquer átomo, molécula ou íon que possui um ou mais elétrons livres na sua órbita externa. Engloba o átomo de hidrogênio, a maior parte de íons metálicos de transição e a molécula de oxigênio na forma, por exemplo, de superóxido (O \cdot), oxigênio singlete (\cdot O–O \cdot), triplete (\cdot O–O \cdot), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) etc. Há formação de radicais livres no processo de respiração celular que ocorre nas mitocôndrias para gerar ATP (Swenson e Reece, 1996).

Os efeitos danosos dos radicais livres começam a aparecer quando há um desequilíbrio entre os sistemas oxidantes e antioxidantes, isto é, quando por excesso de produção de radicais livres ou por deficiência dos sistemas antioxidantes, começa a predominar um excesso de radicais livres. A reatividade dos radicais livres causa extensa lipoperoxidação nas membranas celulares, lisossomas e mitocôndrias e destruição de várias enzimas. Existem dois sistemas naturais de eliminação dos radicais livres

constituindo os “varredores de radicais livres”, que atuam eliminando os oxidantes ou impedindo a sua transformação em produtos mais tóxicos (Siegel et al., 1986). Estes sistemas podem ser divididos em enzimáticos e não enzimáticos. As principais enzimas antioxidantes responsáveis pela inativação dos radicais livres são: as catalases, a glutathione peroxidase e a superóxido dismutase. Os antioxidantes não enzimáticos são de natureza exógena e precisam ser ingeridos na dieta como antioxidante em si ou como precursores. Podendo ser: a) vitaminas lipossolúveis: beta-caroteno ou pró-vitamina A e vitamina E; b) vitaminas hidrossolúveis: vitamina C; c) Oligoelementos: zinco, cobre, selênio e magnésio; d) outros: taurina, glutathione, tióis (Swenson e Reece, 1996).

A peroxidação de lipídios destrói a estrutura da matriz lipídica, resultando em instabilidade da membrana. Mesmo danos mínimos alteram a viscosidade da membrana e estimula a atividade da fosfolipase A_2 (Hammerstedt, 1993). Uma vez que o espermatozóide não pode realizar reparos, qualquer alteração irreversível altera sua função do espermatozóide. As reações de radicais livres são autocatalíticas, e uma vez iniciada, muitas duplas ligações (C=C), susceptíveis, eventualmente serão danificadas. Este processo de peroxidação envolve pelo menos dois moles de O_2 (Hammerstedt, 1993).

Anteriormente, Froman e Thurston (1981) citados por Hammerstedt (1993) compararam o conteúdo de superóxido dismutase presentes nos espermatozoides de galos e perus e concluíram que diferenças nesta enzima podem resultar em maior susceptibilidade a toxicidade do O_2 para os espermatozoides de perus armazenados in vitro, que para os espermatozoides de galos.

Aitken e Clarkson (1988) citados por Hammerstedt (1993) testaram antioxidantes a partir de sua capacidade de minimizar danos a membrana. Tanto o beta-hidroxi-tocoferol (BHT) quanto à vitamina E reduz os danos causados pela peroxidação. O BHT também reduz a motilidade espermática; mas, a vitamina E parece ser potencialmente útil aos espermatozoides.

Sabe-se que a perda da atividade de enzimas ligadas a membrana plasmática é causada pela subsequente perda da estrutura de membrana (Wills, 1971 citados por Nissen e Kreysel, 1983). Resultados de May e

Mccay (1968) citados por Nissen e Kreysel (1983) mostram que 50% da inativação das enzimas resultam da destruição de apenas 8% do conteúdo de DHA.

Relação entre peroxidação de lipídios e características físicas seminais

O espermatozóide humano foi o primeiro tipo celular relacionado com a geração de produtos reativos ao oxigênio (Macleod, 1943 citados por Aitken, 1994). Acredita-se que o mecanismo pelo qual os produtos reativos ao oxigênio interfiram na função do espermatozóide seja por meio da peroxidação dos ácidos graxos insaturados da membrana dos espermatozóides. De acordo com Paulenz et al. (1999) os espermatozóides de suínos apresentam grandes quantidades de PUFA nas membranas celulares.

Nissen e Kreysel (1983) avaliaram em sêmen humano, a relação entre ácidos graxos poliinsaturados e motilidade do espermatozóide. Os resultados indicaram correlação linear entre a quantidade de DHA ($\mu\text{g/ml}$ do ejaculado) e a concentração de espermatozóides ($10^6/\text{mL}$) e entre o conteúdo de DHA ($\mu\text{g/mL}$ do ejaculado) e o número de espermatozóides normais móveis. Foi também observado que os espermatozóides com baixa motilidade mostraram maior taxa de peroxidação de lipídios endógenos, obtidos a partir da produção de malonaldeído ($\text{nmol}/10^8$ espermatozóides). Assim, concluíram que a peroxidação de lipídios é provavelmente uma das causas bioquímicas do baixo conteúdo de DHA nos espermatozóides imóveis.

Wishart (1984) verificou associação entre altas concentrações de malonaldeído e perda parcial ou total da capacidade de fertilização, mensurada a partir da porcentagem de ovos férteis. Relatou também que os espermatozóides de galos que mostrou tendência a apresentar elevadas concentrações de malonaldeído não foram identificados como anormais pela motilidade, morfologia e conteúdo de ATP. Desta forma concluíram que a produção de peróxidos é um importante indicador de fertilidade porque os espermatozóides dos grupos que diferiram na taxa de peroxidação não diferiram em outras análises laboratoriais (conteúdo de ATP, motilidade e

morfologia). Entretanto, de acordo com Hammerstedt (1993) danos peroxidativos alteram a motilidade espermática, a morfologia e a fertilidade.

Relação entre lipídios e criopreservação do sêmen

As membranas plasmáticas do espermatozóide frente à congelação, aquelas em que predominam lipídios de cadeia curta e com maior número de insaturações, são menos resistentes, em razão da menor tendência das caudas hidrocarbonadas interagirem e as duplas ligações dificultarem o seu agrupamento (Alberts et al., 1989).

Em membranas celulares, ácidos graxos são os elementos estruturais e bioativos. O testículo tem mostrado conter um alto conteúdo de átomos de carbono 20 (C20) e 22 (C22) de PUFAs (Mazur, 1985).

Os fosfolipídios de membranas celulares do espermatozóide de mamíferos contêm caracteristicamente altas proporções de PUFAs de cadeia longa (C22), particularmente da série de $\omega 3$. Na maioria dos mamíferos, DHA é o PUFA dominante, embora, o DPA (22:5 $\omega 6$) também seja um componente principal das membranas celulares do espermatozóide (Blesbois et al., 1997; Kelso et al., 1997).

A importância de PUFAs de C22 em relação a fertilidade masculina tem sido ilustrado por estudos em humanos que demonstram que a quantidade de DHA em espermatozóides é correlacionado positivamente com motilidade espermática (Stubbs e Smith, 1984). Um estudo prévio mostrou que a redução na motilidade e no número de espermatozóide ejaculado de touros velhos foi acompanhado por uma diminuição em DHA (Ganong, 1993).

A peculiar sensibilidade do espermatozóide de suínos ao resfriamento, especialmente ao congelamento rápido de 15°C para temperaturas abaixo do ponto de congelamento (“choque térmico”), apresenta ser um intrigante problema científico bem como uma prática difícil para tornar possível a criopreservação do sêmen de suínos (Watson e Plummer, 1985; Weitze, 1991). Choque térmico resulta em injúrias irreversíveis na célula espermática de suínos, particularmente na membrana celular (De Leeuw et al., 1990; Paulenz, 1993).

Membranas celulares mudam de um estado líquido para um estado cristalino rígido quando a temperatura alcança certo ponto transitivo característico (T_C) (Alberts et al., 1994). Um T_C baixo é associado com baixa sensibilidade ao choque frio (Drobnis et al., 1993). O T_C depende principalmente de dois fatores. O primeiro destes é a composição dos ácidos graxos dos fosfolipídios. O T_C é mais baixo se as cadeias de hidrocarboneto forem mais curtas ou tiverem mais duplas ligações cis. Supõe-se que as ligações cis produzem dobras nas cadeias de hidrocarboneto que torna mais difícil de empacotar (Stubbs e Smith, 1984). O segundo fator e provavelmente o mais importante é a quantidade presente de colesterol. Um alto conteúdo de colesterol abaixa o T_C . Sêmen de suíno tem baixo conteúdo de colesterol que poderia ser a razão principal para a alta sensibilidade do sêmen de suíno ao choque frio (Drobnis et al., 1993).

Organismos pecilotérmicos cuja temperatura flutua com o ambiente alteram sua composição de ácido graxo da membrana para manter uma fluidez relativamente constante. Os peixes têm um maior conteúdo de PUFAs ω_3 que os mamíferos. Estas observações, e os fatos acima sugerem que os PUFAs ω_3 que contêm um maior número de dupla ligações cis, podem favorecer na resistência da membrana celular ao frio.

Criopreservação de sêmen de suíno não é comum, pois os danos causados à célula são extensos. A composição de ácidos graxos do espermatozóide suíno é interessante, desde que eles contenham uns 25% DPA e 30% de DHA (Rooke et al., 2001). Isto levanta uma questão de como está composição específica de ácido graxo pode contribuir para o congelamento do gameta. Um dos componentes fundamentais de todos os diluentes usados durante o resfriamento e congelamento são os lipídios.

CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA

Aspectos básicos da criopreservação

Para adquirir uma boa taxa de sobrevivência dos espermatozoides após a congelação é necessário estabelecer velocidades de resfriamento e reaquecimento adequadas (Mazur, 1984). As relações entre o tempo e a temperatura durante o resfriamento implicam em mudanças no volume celular que estão também relacionadas com a estrutura e função das

membranas plasmáticas e com o metabolismo celular (Hammerstedt, et al., 1990; Caiza De La Cueva et al., 1997; Gilmore et al., 1998). O resfriamento dos espermatozóides a temperaturas acima de 0° C causa perdas prematuras e irreversíveis na motilidade, altera as propriedades físicas da membrana, aumento da sua permeabilidade e perda de moléculas e íons intracelulares (Watson, 1981).

A adição do crioprotetor extra-celular ao meio de congelação provoca saída de água das células diminuindo seu volume, devido à exposição a um ambiente hiperosmótico. À medida que o crioprotetor penetra dentro das células ocorre entrada de água e aumento do volume celular. Durante a remoção do crioprotetor do meio, após a descongelação, ocorre o reverso, pois quando este sai do interior das células ocorre concomitante saída de água provocando diminuição do volume celular. As mudanças no volume celular, induzidas pela adição e remoção do crioprotetor no meio, são distintas daquelas ocorridas durante o resfriamento e o reaquecimento, portanto, estas duas etapas do processo de criopreservação podem ser potencialmente prejudiciais as células (Gilmore et al., 1998).

Muitos compostos são utilizados como crioprotetores intracelulares, tais como, glicerol, metanol, etileno-glicol, 1-2, propanodiol e o dimetil sulfóxido (Me₂SO). Entretanto, o glicerol é o mais utilizado na criopreservação da célula espermática de várias espécies (Holt, 2000). Quando o glicerol penetra na célula espermática parece alterar a viscosidade do citoplasma e os processos de difusão da membrana plasmática (Hammerstedt et al., 1978). O glicerol quando penetra na bicamada lipídica da membrana plasmática provoca alterações na estrutura lipídica, na estabilidade e permeabilidade da membrana celular. Outras alterações ocorrem ainda, tais como interferência nas respostas das vias enzimáticas e na capacidade de fusão da membrana do espermatozóide acelerando o processo de capacitação, o que contribui para a redução na viabilidade do espermatozóide (Watson, 1995).

Um dos problemas mais evidentes na congelação do sêmen é a perda da motilidade espermática. Embora o resfriamento do sêmen a temperaturas de 20 a 15 °C causa redução na porcentagem de espermatozóides móveis, uma maior queda desta motilidade pode ser

observada após a descongelação. A criopreservação e a descongelação promovem a cristalização da água e mudanças osmóticas no meio extracelular, resultando em alterações nos componentes da membrana plasmática, aumentando a sua permeabilidade, provocando uma redução na atividade metabólica, danos no acrossoma e em outras estruturas, alterações nas concentrações de eletrólitos intracelulares com conseqüente perda da capacidade fertilizante (Hofmo e Almlid, 1992).

Pursel e Johnson (1970) reportaram o aumento de enzimas no meio extracelular após o resfriamento entre 15 e 0 °C, talvez devido a alterações prematuras na permeabilidade da membrana plasmática, enzimas metabólicas tais como: lactato desidrogenase e glutamato oxaloacetato transaminase. Harrison e White (1972) registraram a liberação de glicose fosfato isomerase de espermatozóides suínos e Johnson e Pursel (1974) observaram mudanças no acrossoma com posterior perda de proteinases destas estruturas.

A cristalização do meio extracelular ocorre dependendo da velocidade de congelamento e dos crioprotetores utilizados. Durante a cristalização as células ficam expostas a soluções hiperosmóticas, resultando na saída de água de seu interior e influxo de íons; já na descongelação acontece o efeito inverso, com influxo de água para o meio intracelular podendo acarretar ruptura da membrana plasmática. No intuito de obter-se uma boa sobrevivência das células espermáticas após a descongelação faz-se necessário o controle osmótico e químico do meio extracelular. A escolha da composição do diluidor, natureza dos crioprotetores e outros nutrientes como açúcares, quelantes, cálcio, antioxidantes e proteínas da gema de ovo ou do leite, vêm demonstrando ter influência na sobrevivência da célula espermática (Holt, 2000).

Diluentes crioprotetores

Os meios diluidores são constituídos de substâncias que permitem a preservação da membrana plasmática do espermatozóide por meio da estabilização do pH do meio, neutralização de produtos tóxicos produzidos pelos espermatozóides, proteção contra o choque térmico, manutenção do equilíbrio eletrolítico e, pressão osmótica compatível com os

espermatozóides e inibição do crescimento bacteriano, além de atuarem como fonte energética (Linde-Fosberg, 1991, Engle, 1993).

Os crioprotetores são substâncias capazes de promover a sobrevivência celular durante o resfriamento, congelamento e descongelamento, apesar do seu mecanismo de ação na criopreservação ainda não estar completamente elucidado. Massip et al. (1986) citam que estas substâncias interagem com a membrana celular proporcionando uma estabilização, evitando a lesão da mesma. Entretanto, os crioprotetores não garantem a sobrevivência de 100% das células por possuírem efeitos tóxicos sobre as mesmas, dependendo da concentração do crioprotetor no meio diluidor (Fahy, 1986).

Os crioprotetores podem ser classificados de acordo com a permeabilidade da membrana celular à sua penetração: não permeantes, que são macromoléculas impermeáveis a membrana plasmática como as proteínas presentes no leite e na gema de ovo, sacarose, glicose, lactose, manose, rafinose, trealose dentre outros e permeantes, que são aqueles que atravessam a membrana do espermatozóide e atuam no meio intra e extracelular e incluem pequenas moléculas como glicerol, etilenoglicol e dimetilsulfóxido (Me_2SO), 1,2 propanodiol, acetamidas e outras amidas (Mckinnon, 1996; Leibo e Bradley, 1999).

Acredita-se que o glicerol liga-se fortemente aos íons de hidrogênio na molécula de água, tornando assim, mais lenta a desidratação celular durante o congelamento (Doebbler, 1966). Este efeito não está totalmente elucidado; porém, há evidência de que este crioprotetor se liga aos fosfolipídios da membrana, diminuindo a sua fluidez e interferindo na sua permeabilidade (Parks e Graham, 1992).

A gema de ovo tem sido utilizada rotineiramente, em protocolos de criopreservação de sêmen de várias espécies, embora a ação difere da ação do glicerol, visto que a gema confere uma proteção extracelular à célula espermática. Os fosfolipídios presentes na gema de ovo são os principais responsáveis pela ação protetora sobre a membrana celular, resultando em maior proteção das membranas do espermatozóide contra o choque térmico pelo frio (Engle, 1993). Acredita-se haver interação dos fosfolipídios presentes na gema de ovo com os constituintes das membranas do

espermatozóide por meio da ocupação de sítios específicos das membranas, tornando-as mais resistentes (Quinn et al., 1980). Dessa forma, as lesões primárias associadas ao choque térmico, principalmente aquelas que alteram a permeabilidade da membrana, podem ser prevenidas (Engle, 1993).

O cálcio (Ca^{+2}) possui importante papel no controle da motilidade espermática (Watson, 1981). Aumento na concentração intracelular de Ca^{+2} resulta em disfunção e morte celulares (Watson, 1981; Amann e Pickett, 1987). A presença dos fosfolipídios da gema de ovo, evita o aumento de Ca^{+2} intracelular durante o resfriamento do sêmen (White, 1993).

Visando minimizar o efeito deletério do Ca^{+2} durante o processo de congelamento, a partir de 1973, alguns autores passaram a empregar o etileno diaminotetraacetatodissódico (EDTA) em meios diluidores para congelamento de sêmen eqüino. Segundo Watson, (1981) a principal função do EDTA é quelar o cálcio no meio extracelular, diminuindo seu influxo para o meio intracelular. Esta ação é extremamente importante durante a faixa de temperatura onde o espermatozóide é mais susceptível ao choque térmico (Watson, 1981; Jasko et al., 1992).

Martin et al. (1979) associaram ao diluente de criopreservação uma substância emulsificante Orvus-es-paste que aumenta a capacidade protetora dos fosfolipídios. O sêmen apresentou uma motilidade espermática superior após o descongelamento (53,4%) em relação ao diluente sem o agente emulsificador (42,3%), atuando como um importante protetor da membrana acrossomal durante o congelamento.

Efeito da criopreservação nas membranas celulares

Durante os processos de criopreservação do sêmen deve-se levar em consideração a complexidade bioquímica da membrana plasmática do espermatozóide, a interação de seus componentes e a influência do resfriamento, da congelação e descongelação nessas interações. Não foi completamente elucidada ainda, a natureza dos danos causados a membrana durante o resfriamento, mas evidências sugerem que elas sejam lesadas devido à reorganização dos lipídios durante o resfriamento e o

reaquecimento, comprometendo as associações lipídio-lipídio e lipídio-proteína (Parks e Graham, 1992).

A membrana plasmática de cada espécie varia na composição dos seus constituintes moleculares, proteínas, lipídios e carboidratos. Cada constituinte por sua vez é característico para cada tipo celular. O modelo de mosaico da membrana é fluido pelo fato das interações entre os lipídios e as proteínas não serem covalentes, permitindo que as moléculas individuais dos lipídios e proteínas movam-se lateralmente no plano da membrana (Nelson e Cox, 2000).

Estas interações complexas são a base para a ordenação em domínios, formando compartimentos na membrana plasmática, que são diferenciados pela distribuição dos lipídios e das proteínas. A membrana plasmática do espermatozóide é tipicamente polarizada em domínios na cabeça, peça intermediária e na cauda. Estas regiões especializadas diferem cada uma na composição de suas moléculas. Por exemplo, o subdomínio apical na cabeça do espermatozóide, é especificamente envolvido na ligação a zona pelúcida do oócito enquanto a reação acrossomal é uma fusão entre as membranas plasmática e acrossomal externa, que depende apenas das regiões sub-apicais e pré-equatoriais da célula espermática (Parks e Graham, 1992; Gadella et al., 1999).

As funções da membrana são determinadas pelas interações de seus componentes (lipídios, proteínas) e qualquer evento que altere as interações entre estes componentes poderá comprometer qualquer uma destas funções. Embora a estrutura da bicamada seja estável, as moléculas de fosfolipídios e esteróis apresentam grande liberdade de movimentação na membrana plasmática. A desestabilização da membrana ou a sua fusão seja ela proporcionada por eventos fisiológicos, tais como a reação acrossomal ou por rupturas causadas por estresse, requer o rearranjo dos seus componentes que induzem a agregações alternativas dos lipídios da membrana (Hammerstedt et al., 1990)

Os lipídios que compõem a membrana plasmática dos espermatozóides mamíferos são preferencialmente os insaturados que conferem a ela uma consistência fluida. Seu rearranjo pode ser induzido pelas mudanças de temperatura e pode ser causado pela afinidade dos

lipídios a certas glicoproteínas transmembranas (Wolfe et al., 1998). Os lipídios de membrana são assimétricos na sua distribuição nas duas faces da bicamada, embora essa assimetria não seja absoluta. Na membrana plasmática alguns lipídios são tipicamente encontrados na face externa da bicamada e outros na face interna, citoplasmática. A formação de uma bicamada estável requer que os fosfolipídios sejam localizados metade na camada interna e a outra metade na camada externa. Entretanto, cada tipo de fosfolipídio tem uma preferência por uma orientação específica dentro da bicamada. Alguns destes lipídios são agregados preferencialmente ao redor de proteínas integrais da membrana e influenciam diretamente na função destas proteínas (Hammerstedt et al., 1990; Wolfe et al., 1998; Gadella et al., 1999).

Os lipídios com carga neutra ou positiva, tais como fosfatidilcolina e esfingomielina preferencialmente residem na face externa da bicamada. Fosfolipídios aniônicos tais como, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilinositol têm preferência pela face citoplasmática da bicamada. Diferenças entre o tamanho da cadeia de ácidos graxos, as interações com o colesterol e com proteínas, também afetam as interações entre as duas camadas.

O grau de fluidez da membrana depende da composição lipídica e da temperatura. Em temperaturas mais baixas, ocorre pouca movimentação lipídica e a bicamada assume uma forma quase cristalina. Quanto maior a proporção dos ácidos graxos saturados, maior é a temperatura de transição sólido-fluido da membrana (Nelson e Cox, 2000).

Quando a célula é submetida ao resfriamento, os lipídios que estão associados às proteínas de membrana podem se agregar, desordenado o arranjo molecular e as características físicas destas membranas (Hammerstedt, et al., 1990). O resfriamento causa transições nos lipídios, favorecendo a uma redução da fluidez da membrana e impedindo a funcionalidade de proteínas necessárias para a integridade e metabolismo destas membranas. Estas mudanças podem levar a perda da estabilidade da bicamada lipídica, deformações estruturais das organelas celulares e desnaturação de proteínas, podendo acarretar em morte celular (Oehninger et al., 2000; Holt, 2000).

As membranas dos espermatozóides devem resistir a uma variedade de estresses durante a congelação e a descongelação, incluindo a adição de crioprotetores antes da congelação, às mudanças no volume celular e desidratação devido à alta concentração de solutos e a formação de cristais de gelo.

Os espermatozóides não podem modificar ou recompor seu conteúdo lipídico por possuírem pouca capacidade de biossíntese, não apresentando mecanismos endógenos para reparar os danos causados pelos processos de criopreservação, pois não são adaptados a mudanças bruscas de temperatura (Holt, 2000).

As proteínas de membrana também são alteradas durante o resfriamento, congelação e descongelação. Ollero et al. (1998), relataram queda na motilidade e na viabilidade dos espermatozóides de touro, após a remoção de proteínas da membrana pela ação de detergentes e ainda, que a membrana plasmática do espermatozóide após a descongelação apresenta composição protéica diferente daquela visto no sêmen *in natura*.

Após o resfriamento as proteínas integrais da membrana são agrupadas em consequência da separação dos lipídios, alterando as funções destas proteínas, principalmente daquelas que formam canais iônicos e daquelas que estão relacionadas com a ligação do espermatozóide à zona pelúcida. Estas alterações parecem implicar no aumento da permeabilidade da membrana. A regulação do cálcio é claramente afetada pelo resfriamento podendo impedir completamente a viabilidade celular. A assimilação de cálcio durante o abaixamento da temperatura induz mudanças na membrana, semelhantes aos processos de capacitação dos espermatozóides *in vivo* ou *in vitro* (Watson, 1995; Ollero et al., 1998).

Osmolaridade da célula espermática

Quando uma solução é submetida a temperaturas abaixo do ponto de congelação, cristais de gelo são formados fora da célula, o que aumenta a pressão osmótica extracelular pela concentração de solutos na água não congelada. No caso de temperatura baixa, haverá pouco líquido não congelado e alta pressão osmótica, tornando o ambiente não apropriado para a célula. Como consequência de tudo isso deve ser utilizada uma

rápida taxa de resfriamento entre 15 a 60 °C/minuto, o que tem sido estabelecido empiricamente como responsável por melhores taxas de sobrevivência (Watson, 2000).

Watson (1995) propõe que ótima taxa de resfriamento pode ser determinada segundo a sensibilidade do espermatozóide ao estresse osmótico. Acredita-se que o importante não seja a permeabilidade à água, mas sim a taxa de deslocamento da água requerida pela membrana para se adaptar à mudança de volume e isto pode afetar as ligações com o citoesqueleto.

Fraser et al. (2001) avaliaram a relação entre a motilidade espermática de sêmen de suínos e integridade de membrana seguida à exposição a meios anisomóticos e constataram queda nas concentrações de ATP e conseqüente diminuição da motilidade espermática sob essas condições. Gao et al. (1995) também observaram diminuição da motilidade e perda da integridade da membrana em espermatozoides humanos submetidos a meios anisomóticos. A quantidade de ATP no sêmen de touros a fresco e após a criopreservação tem sido correlacionada positivamente com a porcentagem de motilidade (Januskauskas e Rodriguez-Martinez, 1999).

O limite de tolerância osmótica (OTL) que a célula espermática suporta, ou seja, o quanto a célula pode encolher ou expandir segundo as mudanças de osmolaridade, varia entre as espécies, sendo o espermatozóide do homem o que apresenta maior capacidade de OTL, quando comparado aos espermatozoides de suínos, bovino e camundongo. É possível utilizar o OTL como limiar para determinar a quantidade e o tempo requerido para a adição e a remoção do crioprotetor de modo a manter as células dentro de sua margem de tolerância de volume (Agca e Crister, 2002).

Cholesterol

A relação entre níveis de colesterol da membrana plasmática dos espermatozoides e susceptibilidade ao choque térmico está bem estabelecida. Como previamente discutido, a fluidez da membrana é dependente da relação de colesterol e fosfolipídios. Espécies com

intermediário teor de colesterol, como bovinos e cordeiros, são altamente susceptíveis ao choque térmico. Espermatozoides de coelho e humano são relativamente resistentes ao choque térmico.

O colesterol é único em reduzir a fluidez da membrana acima da temperatura de transição, mas aumenta a fluidez da membrana quando resfria para temperatura abaixo da fase de transição (Rottem et al., 1973; Cullis e Hope, 1985). Sabe-se que o colesterol altera a membrana espermática, protegendo a célula durante o resfriamento. Portanto, a adição de colesterol pode ajudar a minimizar ou eliminar a fase de transição durante o processo de resfriamento (Graham e Foote, 1987).

Perda de colesterol da membrana plasmática de células criopreservadas tem sido observada em suínos (50%) e garanhões (28%) (Cerolini et al., 2001; Moore et al., 2005). Esta perda de colesterol pode causar uma capacitação pré-matura em células criopreservadas. Capacitação pré-matura é uma razão para reduzir a viabilidade de espermatozoides criopreservados na reprodução de fêmeas (Watson, 1995). Moore et al. (2005) demonstraram que a adição de ciclodextrina carregadas com colesterol (CCC) durante o processo de criopreservação permitiu as células de manter um elevado teor de colesterol. A alta concentração de colesterol pode impedir as células de sofrer pré maturação para a capacitação, aumentando a viabilidade (Moore et al., 2005).

Ciclodextrinas

Ciclodextrinas são açúcares circulares, oligossacarídeos cíclicos, que são capazes de incorporar um lipídio (colesterol) no centro do círculo que compõe sua estrutura, desta forma, o colesterol é colocado em um formato que permite prontamente a sua incorporação à membrana plasmática do espermatozóide. As ciclodextrinas são um preciso e conveniente método para alterar o conteúdo de colesterol da célula (Ohvo et al., 1997; Atger et al., 1997). Complexos de drogas e ciclodextrina foram usados durante anos na indústria química que utiliza as ciclodextrinas como uma droga veículo, pois são amorfas, têm boa solubilidade, são atóxica, e capazes de formar inclusão de complexos cristalinos com drogas (Pitha et al., 1988).

Numa incubação com células em cultura, a ciclodextrina transfere o colesterol abaixo de gradiente de concentração, da membrana plasmática da célula para dentro da sua região hidrofóbica. Esta retirada de colesterol causa alterações da estrutura e funcionalidade da membrana (Ohvo et al., 1997; Atger et al., 1997). Quando ciclodextrinas são incubadas com espermatozoides, elas medeiam a remoção de colesterol que induz capacitação espermática (Choi e Toyoda, 1998; Cross, 1999; Visconti et al., 1999). Alternativamente, se as mesmas são carregadas com colesterol, as ciclodextrinas transferem colesterol abaixo de gradiente de concentração para a membrana plasmática do espermatozoide, resultando num aumento dos níveis de colesterol na membrana (Klein et al., 1995; Purdy e Graham, 2004; Moore et al., 2005).

As ciclodextrinas existem em múltiplas formas, todas são oligossacarídeos cíclicos com outras seis (α), sete (β), ou oito (γ) unidades de glicopirranose (Choi e Toyoda, 1998; Hu et al., 2005). β -ciclodextrinas são heptassacarídeos cíclicos com unidades de glicopirranose $\beta(1-4)$. A superfície externa da β -ciclodextrina é hidrofílica, fazendo então solúvel em água, e elas têm uma cavidade interna hidrofóbica. As propriedades hidrofóbicas permitem as ciclodextrinas encapsular compostos insolúveis hidrofóbicos que se tornam solúveis em soluções aquosas. A estrutura delas permite encapsular moléculas naturais e sintéticas como hormônios, vitaminas e compostos lipídicos. β -ciclodextrinas têm mais alta afinidade dos três citados por compostos lipídicos, especialmente o colesterol (Yancey et al., 1996; Ohvo et al., 1997; Christian et al., 1997; Choi e Toyoda, 1998; Cross, 1999).

β -ciclodextrina tem uma maior eficiência de aceitar o colesterol e aumentar a solubilidade da água quando metilada (Yancey et al., 1996). Metil- β -ciclodextrinas removem o colesterol mais eficazmente diminuindo a energia de ativação necessária para saída de colesterol. Ciclodextrinas têm uma diminuição na energia de ativação porque moléculas de colesterol da membrana são incorporadas na ciclodextrina sem formar uma fase intermediária aquosa. O colesterol pode passar diretamente da membrana plasmática para o núcleo hidrofóbico sem entrar na fase aquosa. Esta

propriedade permite as ciclodextrinas serem eficientes doadoras e receptores de colesterol (Christian et al., 1997; Cross, 1999).

Ciclodextrina e colesterol vs criopreservação espermática

Como descrito acima, as ciclodextrinas têm sido utilizada para retirar colesterol de várias membranas celulares e células somáticas (Kilsdonk et al., 1995; Yancey et al., 1996; Christian et al., 1997), incluindo espermatozóides (Visconti et al., 1999; Iborra et al., 2000; Shadan et al., 2004). Combes et al. (2000) reportaram que a adição de CCC em espermatozóides de garanhão resultou numa alta porcentagem de células viáveis e móveis após criopreservação e descongelamento. Estes resultados tem-se repetido em garanhões (Moore et al., 2005), bovinos (Purdy e Graham, 2004; Mocé e Graham, 2006; Amorim et al., 2007 e 2008b,c).

A saída de colesterol da membrana plasmática é o passo inicial para a capacitação, um evento necessário para os espermatozóides adquirirem habilidade para fertilização (Langlais e Roberts, 1985; Ehrenwald et al., 1988). Iborra et al. (2000) observaram que espermatozóides de bodes tratados com β -ciclodextrinas foram capazes de sofrer reação acrossômica. Espermatozóides de ratos e bovinos sofrem fosforilação da proteína tirosina, um indicador da capacitação, quando tratados com várias ciclodextrinas (Visconti et al., 1999). Parinaud et al. (2000) observaram que espermatozóides de humanos incubados com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina tem maior afinidade de ligação com zona pelúcida do que espermatozóides não tratados. Este aumento da afinidade de ligação foi atribuído pelo aumento do número de espermatozóides capacitados devido à saída de colesterol da membrana plasmática (Parinaud et al., 2000).

A ciclodextrina carregada com colesterol tem sido utilizada para aumentar a crio-sobrevivência em bovinos (Purdy e Graham, 2004; Mocé e Graham, 2006) e garanhões (Moore et al., 2005). Purdy e Graham (2004) reportaram que espermatozóide fresco de bovino tratado com ciclodextrina carregada com colesterol retarda a habilidade deles sofrerem capacitação e reação acrossômica.

AVALIAÇÃO DO SÊMEN

Motilidade espermática e fertilidade

Diversos estudos comparam diluentes e métodos de resfriamento e de diluição tendo a motilidade espermática como principal variável para avaliação da preservação dos espermatozoides. A estimativa da motilidade continua sendo um elemento importante na avaliação da função espermática (Pickett, 1993). Considerando que a motilidade é um componente indispensável do mecanismo de fertilização, a perda irreversível de motilidade pode ser considerada uma perda de função celular. Por outro lado, a manutenção da motilidade não implica integridade celular completa (Varner et al., 1988) e não tem correlação absoluta com a fertilidade (Pace e Sullivan, 1975).

Alguns métodos foram descritos para estimar objetivamente a motilidade dos espermatozoides: fotomicrografia (Van Huffel et al., 1985 citados por Keller, 1998), videomicrografia (Varner et al., 1991), espectrofotometria (Jasko et al., 1989 citados por Keller, 1998) e análise computadorizada (Amann e Pickett, 1987). O método subjetivo de exame visual, utilizando microscópio óptico com contraste de fase e platina aquecida, é aceitável quando realizado por pessoa experiente (Varner et al., 1991).

Morfologia espermática

Quanto maior a porcentagem de células espermáticas morfologicamente anormais, menor a fertilidade do sêmen. Em particular, células com defeitos de cabeça e acrossoma estão associadas com infertilidade. As características morfológicas do sêmen suíno são semelhantes às de outras espécies domésticas, com exceção para a gota citoplasmática distal, que não é considerada defeito (CBRA, 1998).

Testes de integridade e funcionalidade de membrana

Coloração supra-vital

O teste supra-vital avalia a integridade física da membrana, consiste da utilização de corantes derivados da fluoresceína em combinação ou não com outros corantes de fundo, permitindo distinguir espermatozoides vivos

de mortos. A ação de corantes, como eosina ou nigrosina, depende da integridade da membrana espermática de forma a impedir ou não a penetração dos mesmos no compartimento nuclear dos espermatozóides (Garner et al., 1986).

Teste Hiposmótico

A análise-padrão do sêmen baseia-se na concentração, número total de espermatozóides, motilidade e morfologia espermática. É possível avaliar a qualidade da espermatogênese por meio desses parâmetros, mas há limitações quanto a prever a capacidade de fertilização dos espermatozóides (Kumi-Diaka, 1993; Correa e Zavos, 1994).

O teste hiposmótico, desenvolvido por Jeyendran et al. (1984) em sêmen humano, visa avaliar a integridade funcional da membrana espermática. Uma das propriedades da membrana plasmática é sua capacidade de permitir o transporte de moléculas seletivamente. Quando a célula espermática é exposta a um meio hipotônico, ocorre a passagem de água pela membrana plasmática para o interior da célula, numa tentativa de restabelecer o equilíbrio osmótico entre o meio intra e extra-celular. O aumento de volume ou “edemaciamento” do espermatozóide é particularmente visível na cauda, pois a membrana plasmática que a envolve parece ser mais frouxamente aderida que a membrana que envolve a cabeça, por isso a região enrola-se com facilidade. Segundo Jeyendran et al. (1984) pode-se relacionar o enrolamento da cauda com uma boa funcionalidade da membrana da cabeça, já que no seu trabalho houve correlação positiva entre caudas enroladas e penetração do espermatozóide em oócitos de hamster.

O meio hiposmótico ideal deve exercer estresse suficiente para causar um aumento de volume observável ao microscópio óptico, sem causar a lise da membrana espermática. A solução à base de frutose e citrato de sódio a 150 mOsmol/kg resultou no número máximo de caudas enroladas em amostras de sêmen humano (Jeyendran et al., 1984). Correa e Zavos (1994) testaram várias soluções à base de frutose e citrato de sódio com osmolaridades variando de 50 a 300 mOsmol/kg em amostras de sêmen bovino e o número máximo de caudas enroladas ocorreu na solução

a 100 mOsmol/kg. Kumi-Diaka (1993) registrou o máximo de caudas enroladas em sêmen canino na solução com frutose a 60 mOsmol/kg. Lagares (1995) testou a resistência osmótica dos espermatozoides de garanhão em soluções hiposmóticas que variavam de 50 a 300 mOsmol/kg, observando que na faixa de 50 a 100 mOsmol/L o espermatozoide eqüino sofreu o maior estresse osmótico.

O teste hiposmótico tem sido usado para avaliar a qualidade espermática em humanos (Jeyendran et al., 1984 ; Fazano et al., 1993; Engel e Petzoldt, 1994), bovinos (Correa et al., 1997), suínos (Vazquez et al., 1997); caninos (Kumi-Diaka e Badtram, 1994); coelhos (Amorim et al., 2008a) e eqüinos (Zavos, 1991; Noiles et al., 1992; Caiza de la Cueva et al., 1997a; Caiza de la Cueva et al., 1997b).

Alguns autores relatam correlação positiva entre a porcentagem de espermatozoides que enrolam a cauda no teste hiposmótico e motilidade espermática em sêmen humano (Jeyendran et al., 1984), canino (Kumi-Diaka, 1993; Kumi-Diaka e Badtram, 1994), coelhos (Amorim et al., 2008a) e bovino (Correa e Zavos, 1994).

Correa e Zavos (1994) verificaram boa correlação ($r=0,81$) entre espermatozoides bovinos não corados pela eosina e caudas enroladas no HOST. Já Kumi-Diaka e Badtram (1994) não obtiveram correlação entre espermatozoides não corados por eosina e caudas enroladas em sêmen canino. Da mesma forma, Vasquez et al. (1997) estudando o sêmen suíno, verificaram diferença significativa entre a porcentagem de espermatozoides com cauda enrolada ($61,8\pm 5,2\%$) no HOST e a porcentagem de espermatozoides não corados pela eosina ($86\pm 2,0\%$) ou fluorescentes pelo diacetato de carboxifluoresceína ($76,6\pm 1,3\%$). Segundo esses autores, a membrana fisicamente intacta pode não ser bioquimicamente funcional.

Citometria de fluxo

A citometria de fluxo permite analisar simultaneamente e com precisão muitas células em pouco tempo. Esta tecnologia imparcial e objetiva permite analisar milhares de espermatozoides (8.000 a $20.000s^{-1}$) mostrando ser sensível esta análise. Este método de análise é, no entanto caro e requer um operador treinado (Graham, 2001; Gillian et al, 2005).

A análise de espermatozóides por citometria de fluxo tem crescido e incluiu parâmetros como a viabilidade das células, integridade do acrossoma, funcionalidade das mitocôndrias e capacitação. Células viáveis são fluorescentemente marcadas e passam através do laser. As células que incorporam o fluorescente são excitadas num comprimento de onda específico pertinente ao fluorescente, e então uma emissão de fluorescência é observada (Gillan et al., 2005).

A viabilidade da célula é determinada na citometria de fluxo avaliando as células que tem uma membrana plasmática intacta versus células que não tem membrana intacta. Dupla coloração é um método comum de avaliar a integridade do acrossoma de espermatozóides. Na dupla coloração, um corante acrossomal e um corante nuclear são combinados por permitir um contraste na região posterior da cabeça e também reduz a quantidade de corante acrossomal levado para cima pelo núcleo (Cross e Meizel, 1989). O método mais comum de mensurar a integridade do acrossoma com uma planta lectina marcada por uma sonda fluorescente (Gillan et al, 2005). As lectinas se ligam a glicoconjugados da matriz acrossomal ou a membrana acrossomal externa para descobrir a integridade do acrossoma (Farlin et al., 1992).

Isotiocianato de fluoresceína (FITC) é uma sonda fluorescente geralmente utilizada que analisa o status acrossomal do espermatozóide para muitas espécies (Cross et al., 1986; Farlin et al., 1992; Sukardi et al., 1997; Pena et al., 1999). FITC é prendido a uma lectina, isolada da semente de plantas que especificamente liga aos resíduos de açúcar (Trowbridge, 1974). Aglutinina de *Pisum sativum* (PSA, aglutinina da ervilha) e aglutinina de *Arachis hypogaea* (PNA, aglutinina do amendoim) são usadas para determinar a integridade do acrossoma (Graham, 2001). A lectina de amendoim é um corante PNA e cora o acrossoma com uma maior intensidade e com uma ligação menos específica que outras lectinas como a PSA (Graham, 1996).

A diferença entre os corantes padrões (FITC-PSA e FITC-PNA) é devido à afinidade a diferentes açúcares (Trowbridge, 1974). PSA se liga aos glicoconjugados da matriz acrossomal, e tem afinidade para as terminações α -D-glicosil e resíduos α -D-manosil de glicoproteínas, se liga

especificamente ao açúcar α -manosidase e α -galactosidase encontrado no conteúdo acrossomal, na matriz acrossomal de espermatozoides danificados, causando fluorescência na parte acima da cabeça e no segmento equatorial (Farlin et al., 1992; Graham, 2001). FITC-PSA marca com sucesso o acrossoma espermático em verde amarelado, facilita a visualização e identifica acrossomas lesados, podendo ser aplicado aos espermatozoides bovinos (Graham et al., 1990) eqüinos (Arruda et al., 2003) e suínos (Mattioli et al., 1996). PNA se tornou mais popular para avaliar a integridade acrossomal por se ligar menos em regiões não específicas do espermatozoide. PNA liga-se a β -galactose da membrana acrossomal externa e as partes danificadas do acrossoma fluorescem quando avaliada pela citometria de fluxo (Graham, 2001).

FITC-PNA é também um corante popular devido aos múltiplos corante padrões que demonstram as várias fases do acrossoma (Graham, 2001). FITC-PSA tem apenas dois corantes padrões, identifica acrossoma intacto ou danificado e é incapaz de classificar se o espermatozoide teve reação acrossômica (Cheng et al., 1996; Kawamoto et al., 1999). FITC-PNA identifica acrossoma intacto e reação acrossômica. Espermatozoide com um brilho fluorescente em cima do capús acrossomal indica acrossoma intacto, ou vesiculação da membrana plasmática ou a membrana acrossomal externa, tendo reação acrossômica. Espermatozoides com fluorescência em cima do segmento equatorial representam que os espermatozoides tiveram reação acrossômica (Cheng et al., 1996).

Existe uma alta correlação ($r=0,68$) para a porcentagem de células vivas detectadas com a citometria de fluxo com a fertilidade de garanhões, indicando que quanto maior a viabilidade celular mais alta é a fertilidade, além de apresentar maior crio-sobrevivência. O aumento da viabilidade dos espermatozoides de garanhões de fertilidade alta aumentará o número de células viáveis no local da fertilização (Wilhelm et al., 1996).

Ensaio de Ligação

Zona Pelúcida e Membrana Perivitelina da Gema de Ovo

A zona pelúcida é uma matriz extracelular transparente que envolve o oócito e embrião jovem. A zona pelúcida (ZP) de muitas espécies de

mamíferos está compreendida de três glicoproteínas: ZP1, ZP2 e ZP3. A zona pelúcida é um receptor espécie-específico de espermatozóides capacitados e induz a reação acrossômica. Remoção da zona pelúcida elimina especificidade de espécies para espermatozóides e as interações da zona pelúcida. Ensaios *in vitro* com oócitos desnudados permitiram observar à ligação de heterólogos (Sinowitz et al., 2003)

Métodos padrões de análises de espermatozóides utilizam a concentração, motilidade e morfologia como um indicativo do potencial de fertilidade do macho (Pantke, 1995). Embora, análises básicas do sêmen sejam incapazes de mensurar a capacidade fecundante dos espermatozóides ou os eventos bioquímicos relacionados da fertilização. Ensaios de ligação da zona pelúcida *in vitro* podem ser utilizados como uma ferramenta para determinar a habilidade do espermatozóide a ter reação acrossômica, ligar a zona pelúcida e penetrar na *oolemma* (Brackett et al., 1982; Pantke et al., 1995; Carrell, 2000). Brackett et al. (1982) sugeriram que se o espermatozóide não pode penetrar no oócito, então ele será incapaz de sofrer capacitação e reação acrossômica *in vivo*.

Penetração da zona pelúcida é um método de avaliar a função do espermatozóide em termos de capacitação e reação acrossômica. Várias espécies têm uma correlação entre ligação da zona pelúcida e potencial fertilizante do macho. Ensaios de ligação da zona pelúcida de homólogos e heterólogos têm sido incorporados em ensaios de laboratório como um método para predizer a fertilidade em várias espécies (Brackett et al., 1982; Fazeli et al., 1993; Pantke, 1995; Sinowitz et al., 2003; Braundmeier et al., 2003). Ensaio *in vitro* em que o número de espermatozóides que se liga a zona pelúcida após incubação por um período de tempo tem sido desenvolvido para espermatozóides de humanos, bovinos, suínos, garanhões e outras espécies. Parte das dificuldades conduzidas nestes ensaios advem de obter suficientes números de zona pelúcida.

Similaridade molecular entre a zona pelúcida e a membrana perivitelina da gema de ovo de galinha permite a ligação dos espermatozóides de outras espécies, incluindo espermatozóides de touro. Ensaio de ligação com membrana perivitelina é simples, além de fácil obtenção (Graham e Mocé, 2005; Amorim et al., 2007). Nestes estudos,

espermatozóides ou criopreservados se ligam a membrana perivitelina da gema de ovo de galinhas, mostrando que esta possui receptores onde o espermatozóide bovino possa ligar.

Ensaio de ligação da zona pelúcida e membrana perivitelina *in vitro* devem ser utilizados para determinar as interações espermatozóide com o oócito ou membrana. Esta tecnologia pode ser utilizada para avaliar simultaneamente os espermatozóides como um indicador da taxa de fertilidade (Graham, 1996; Amorim et al., 2007).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-HAILA, A.; TULSIANI, D.R. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, e function. *Arch Biochem Biophys.* 379(2):173-82, 2000.
- AGCA, Y.; CRITSER, J.K. Cryopreservation of spermatozoa in assisted reproduction. *Seminars in Reproductive Medicine*, 20(1):15-23, 2002.
- ALMLID, T.; JOHSON, A.L. Effects of glycerol concentration, equilibration time e temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *J. Anim. Sci.* 66:2899-2905, 1988.
- AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal Function. In: *Equine Reproduction* (A.O. McKinnon e J.L. Voss Eds.) Lea e Febiger. Philadelphia, London. 1993. pp. 715-745.
- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation e a review of cryopreservation of stallion spermatozoa, *J. Equine Vet. Sci.* 7:145–173, 1987.
- AMORIM, E.A.M.; TORRES, C.A.A.; GRAHAM, J.K.; AMORIM, L.S.; SANTOS, L.V. The hypoosmotic swelling test in fresh rabbit spermatozoa. *Animal Reproduction Science* (in press 2008a).
- AMORIM, E.A.M.; GRAHAM, J.D.; MEYERS, M.; SPIZZIRI, B. Delivering Cholesterol or Desmosterol to Bull Sperm Membranes Improves Cryosurvival. 34th Annual Conference of the International Embryos Transfer Society (IETS), Proceedings The journal *Reproduction, Fertility & Development*, January 5-9, Denver – CO – EUA, 2008b.
- AMORIM, E.A.M.; GRAHAM, J.K.; SPIZZIRI, B.; MEYERS, M.; AMORIM, L.S.; TORRES, C.A.A. The effect of adding cholesterol, vitamin A, cod liver or flax oil loaded-cyclodextrin on bull sperm cryosurvival. 16th International Congress on Animal Reproduction – ICAR, Budapest – Hungary, 2008c (abstract 884 accepted).
- AMORIM, E.A.M.; GRAHAM, J.D.; SPIZZIRI, B.; MEYERS, M.; AMORIM, L.S.; TORRES, C.A.A. The Effect of Adding Cholesteryl-Heptanoate, -Palmitate, -Pelargonate, or -Stearate Loaded Cyclodextrin on Bull Sperm Cryosurvival. 40th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (SSR), Proceeding 40th Annual Meeting of the SSR, July, San Antonio – TX – EUA, 2007.

- ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; LIU, I.K.M. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomo de espermatozóides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.31 (suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p.226-227, 2003.
- ATGER, V.M.; DE LA LLERA MOYA, M.; STOUT, G.W.; RODRIGUEZ, W.V.; PHILLIPS, M.C.; ROTHBLAT GH. Cyclodextrins as catalysts for the removal of cholesterol from macrophage foam cells. *J. Clin. Invest.* 99:773-780, 1997.
- AUSTIN, C.R. Capacitation of spermatozoa. *Int J Fertil.* 12(1):25-31, 1967.
- BAILEY, J.L.; STOREY, B.T. Calcium influx into mouse spermatozoa activated by solubilized mouse zona pellucida, monitored with the calcium fluorescent indicator, fluo-3. Inhibition of the influx by three inhibitors of the zona pellucida induced acrosome reaction: tyrphostin A48, pertussis toxin, e 3-quinuclidinyl benzilate. *Mol Reprod Dev.* 39(3):297-308, 1994.
- BARBATO, G.F.; CRAMER, P.G.; HAMMERSTEDT, R.H. A practical *in vitro* sperm-egg binding assay that detects subfertiles males. *Biology of Reproduction*, Champaign, 58:686-699, 1998.
- BARTH, A.D.; OKO, R.J. Abnormal Morphology of bovine spermatozoa. Iowa: Iowa State University Press/AMES, 1989, 285p.
- BILGILI, S.F.; RENDEN, J.A. Fluorimetric determination of avian sperm viability e concentration. *Poultry Science*; 63(11):2275-77, 1984.
- BLESBOIS, E.; LESSIRE, M.; HERMIER, D. Effect of cryopreservation and diet on lipids of fowl sperm and fertility. *Poult. And Avian Biol. Reviews*, 8(3-4):149-154, 1997.
- BLOM, E. A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. *Fertil Steril.* 1:176-177, 1950.
- BRACKETT, B.G.; COFONE, M.A.; BOICE, M.L.; BOUSQUET, D. Use of zona-free hamster ova to assess sperm fertilizing ability of bull e stallion. *Gamete Res.* 5:217-227, 1982.
- BREITBART, H. Role e regulation of intracellular calcium in acrosomal exocytosis. *J. Reprod. Immunol.* 53(1-2):151-9, 2002.
- BREWIS, I.A.; MOORE, H.D.; FRASER, L.R.; HOLT, W.V.; BALDI, E.; LUCONI, M.; GADELLA, B.M.; FORD, W.C.; HARRISON, R.A. Molecular mechanisms during sperm capacitation. *Hum Fertil.* 8(4):253-61, 2005.

- BREWIS, I.A.; MORTON, I.E.; MOHAMMAD, S.N.; BROWES, C.E.; MOORE, H.D.M. Measurement of intracellular calcium concentration e plasma membrane potential in human spermatozoa using flow cytometry. *J Erol.*, 21:238–249, 2000.
- CARRELL, D.T. Semen analysis at the turn of the century: an evaluation of potential uses of new sperm function assays. *Arch Erol.* 44(1):65-75, 2000.
- CAIZA DE LA CUEVA, F.; RIGAU, T.; PUJOL R.; PIEDRAFITA, J.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. Resistance to hyperosmotic stress in boar spermatozoa: the role of the ionic pumps e the relationship with cryosurvival. *Anim. Reprod. Sci.* 48:301-315, 1997a.
- CAIZA DE LA CUEVA, F.I.; RIGAU, T.; BONET, S. et al. Subjecting horse spermatozoa to hypoosmotic incubation: effects of ouabain. *Theriogenology*, 47:765-784, 1997b.
- CELEGHINI, E.C.C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2005. 186p.
- CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T.M. Changes in sperm quality e lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction.* 121(3):395-401, 2001.
- CHENG, F.P.; FAZELI, A.; VOORHOUT, W.F.; MARKS, A.; BEVERS, M.M.; COLENBREER, B. Use of peanut agglutinin to assess the acrossomal status e the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *J Erol.* 17(6):674-82, 1996.
- CHOI, Y.H.; TOYODA, Y. Cyclodextrin removes cholesterol from mouse sperm e induces capacitation in a protein free medium. *Biol Reprod.* 59:1328-1333, 1998.
- CHRISTIAN, A.E.; HAYNES, M.P.; PHILLIPS, M.C.; ROTHBLAT, G.H. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J Lipid Res.* 38:2264–2272, 1997.
- COCHRAN, J.D.; AMANN, R.P.; FROMAN, D.P et al. Effects of centrifugation, glycerol level cooling to 5°C, freezing rate e thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology*, 2(1):25-8, 1984.

- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. Manual para exame erológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte, MG:1998. 49p.(Manual).
- COMBES, G.B.; VARNER, D.D.; SCHROEDER, F.; BURGHARDT, R.C.; BLANCHARD, T.L. Effect of cholesterol on the motility e plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. J. Reprod. Fertil. Suppl. 56:127–132, 2000.
- CORREA, J.R.; HEERSCHKE, G. Jr.; ZAVOS, P.M. Sperm membrane functional integrity e response of frozen-thawed bovine spermatozoa during the hypoosmotic swelling test incubation at varying temperatures. Theriogenology 47:715-721, 1997.
- CORREA, J.R.; ZAVOS, P.M. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. Theriogenology, 42:351-360, 1994.
- CROSS, N.L. Effect of methyl-beta-cyclodextrin on the acrosomal responsiveness of human sperm. Mol Reprod Dev. 53:92-98, 1999.
- CROSS, N.L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. Biol Reprod. 41(4):635-41, 1989.
- CROSS, N.L.; MORALES, P.; OVERSTREET, J.W.; HANSON, F.W. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. Gamet Research, 15:213-226, 1986.
- CULLIS, P.R.; HOPE, M.J. Physical properties e functional roles of lipids in membranes. In: Biochemistry of lipids e membranes (D.E. Vance e J.E. Vance Eds.) Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA pp.25-72.
- DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. Cryobiology. 14(4):466-70, 1977.
- DE LEEUW, F.E.; COLENBREER, B.; VERKLIEJ, A.J. The role membrane damage plays in cold shock e freezing injury. In: International conference on boar semen preservation, 2, 1990, Beltsville. Proceedings...1990, p.95-104.
- DEVIREDDY, R.V.; SWANLUND, D.J.; OLIN, T.; VINCENTE, W.; TROEDSSON, M.H.; BISCHOF, J.C.; ROBERTS, K.P. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence e absence of

- cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry. *Biol Reprod.* 66(1):222-31, 2002.
- DOEBBLER, G.F. Crioprotective compounds - review e discussion of structure e function of structure e function. *Cryobiol.*, 4:2-11,1966.
- EHRENWALD, E.; FOOTE, R.H.; PARKS, J.E. Cholesterol efflux from bovine sperm. I. Induction of the acrosome reaction with lysophosphatidyl-choline after reducing sperm cholesterol, *Gamete Res.* 20:1-13, 1988.
- ENGEL, S.; PETZOLDT, R. The spermatozoal volume as indicative of the plasma membrane integrity: I. Methods. *Erologia* 26:309-313, 1994.
- ENGLE, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 47:243-255,1993.
- ERIKSSON, B. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of freezing e thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in Flatpacks e Maxi-straws. *Anim. Reprod. Sci.* 63:205-220, 2000.
- FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiol.*, 23:1-13,1986.
- FARLIN, M.E.; JASKO, D.J.; Graham, J.K.; Squires, E.L. Assessment of Pisum sativum agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 32(1):23-7, 1992.
- FAWCETT, D.W. The mammalian spermatozoon. *Dev Biol.* 44(2):394-436, 1975.
- FAZANO, F.; BURMEISTER, M.L.; LUCIO, M.A.; BOTTCHEER, L.F.; NEVES, P.A.; BAHAMONDES, L. Correlation between hypo osmotic swelling test e 'water test' to assess human sperm membrane integrity. *Erologia* 25:351-353, 1993.
- FAZELI, A.; HAGE, W.J.; CHENG, F.P.; VOORHOUT, W.F.; MARKS, A.; BEVERS, M.M.; COLENBREER, B. Acrosome intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucida in vitro. *Biol Reprod.*, 56:430-438, 1997.
- FAZELI, A.R.; STEENWEG, W.; BEVERS, M.M.; DE LOOS, F.A.; VAN DEN BROEK, J.; COLENBREER, B. Development of a sperm zona pellucida binding assay for bull semen. *Vet Rec.* 132(1):14-6, 1993.

- FISER, P.S. Interactions of cooling velocity, warming velocity e glycerol concentration on the survival of frozen-thawed boar sperm. *Rep. Dom. Anim.* 26, suppl. 1. 1991.
- FRASER, L.; GORSCZARUCK, K.; STRZEZEK, J. Relationship between motility e membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolarity. *Reproduction in Domestic Animals*, 36:325-329, 2001.
- FRASER LR. Sperm capacitation e the acrosome reaction. *Hum Reprod.* 13(suppl 1):9-19, 1998.
- GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, J.F.; STOUT, T.A.; COLENBREER, B. Capacitation e the acrosome reaction in equine sperm. *Anim Reprod Sci.* 68(3-4):249-65, 2001.
- GADELLA, B.M.; FLESCHE, F.M.; VAN GOLDE, L.M.G. Dynamics in the membrane organization of the mammalian sperm cell e functionality in fertilization. *Vet. Quart.* 21:142-146, 1999.
- GAO, D.Y.; LIU, J.; MCGANN, L.E.; WATSON, P.F.; KLEINHANS, F.W.; MAZUR, P.; CRITSER, E.S.; CRITSER, J.K. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition e removal of glycerol. *Human Reproduction*, 10(5):1109-1122, 1995.
- GARNER, D.L.; JOHNSON, L.A.; YUE, S.T.; ROTH, B.L.; HAUGLE, R.P. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 e propidium iodide, *J. Erol.* 15:620-629, 1994.
- GARNER, D.L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L.A.; PACE, M.M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining e flow cytometric analyses. *Biol. Reprod.* 34:127-138, 1986.
- GILMORE, J.A.; LIU, J.; PETER, A.T.; CRITSER, J.K. Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa e their relevance to cryopreservation. *Biol. Reprod.* v. 58, p. 28-36, 1998.
- GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, e mitochondrial function using flow cytometry. *Biology of Reproduction*, 43:55-64, 1990.
- GRAHAM, J.K., FOOTE, R.H., HOUGH, S.R. Penetration of zona-free hamster eggs by liposome-treated sperm from the bull, ram, stallion, e boar. *Biol Reprod.* 37(1):181-8, 1987.

- GRAHAM, E.F.; CRABO, B.G. Some factors influencing the freezing of boar spermatozoa. In: Proceedings of the 7th Congress on Animal Reproduction e Artificial Insemination. Munich, Germany, 2:1627-1632, 1972.
- GRAHAM, J.K. Analysis of stallion semen e its relation to fertility. *Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*. 12 (1):119-129, 1996.
- GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim Reprod Sci*. 68(3-4):239-47, 2001.
- GRAVANCE, C.G.; GARNER, D.L.; BAUMBER, J.; BALL, B.A. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology*. 53(9):1691-703, 2000.
- GUAY, P.; RONDEAU, M.; BOUCHER, S.; Effect of glycerol on motility, viability, extracellular aspartate aminotransferase release e fertility of stallion semen before e after freezing. *Equine Vet Journal*. 13:(3):177-182, 1981.
- HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Herpetology*, 11:73-88, 1990.
- HAMMERSTEDT, R.H.; KEITH, A.D.; SNIPES, W.C.; AMANN, R.P.; ARRUDA, D.; GRIEL, L.C. Jr. Use of spin labels to evaluate effects of cold shock e osmolality on sperm. *Biol. Reprod*. 18:686-696, 1978. (abstract).
- HAMMERSTEDT, R.H. Tritium release from [2-3H] D-glucose as a monitor of glucose consumption of bovine sperm. *Biol Reprod*. 12:545-551, 1975.
- HANCOCK, J.L.; HOVELL, G.J.R. Insemination before e after the onset of heat in sows. *Veterinary Record*, 71:664-665, 1959.
- HARRISON, R.A.P.; WHITE, I.G. Glycolytic enzymes in the spermatozoa e cytoplasmic droplets for bull, boar e ram e their leakage after cold shock. *J. Reprod. Fert*. 30:105-115, 1972.
- HARTEL, S.; DIEHL, H.A.; OJEDA, S.F. Methyl-beta-cyclodextrins e liposomes as water-soluble carriers for cholesterol incorporation into membranes e its evaluation by a microenzymatic fluorescence assay e membrane fluidity-sensitive dyes. *Anal Biochem*. 258:277-284, 1998.
- HE, L.; BAILEY, J.L.; BUHR, M.M. Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential, *Biol. Reprod.*, 64:69-79, 2001.

- HOFMO, P.O.; ALMLID, T. Recent developments in freezing of boar semen with special emphasis on cryoprotectants. *Rep. Dom. Anim.* 26(1), 1992.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62:3-22, 2000.
- HOLT, W.V.; NORTH, R.D. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. *J Exp Zool.* 230(3):473-83, 1984.
- HU, J.; ZHEN, T.; LI, S.; LIU, B. The effect of cyclodextrins on polymer preparation. *Journal of Materials Science.* 40(23):6057-6061, 2005.
- IBORRA, A.; COMPANYO, M.; MARTINEZ, P.; MORROS, A. Cholesterol efflux promotes acrosome reaction in goat spermatozoa. *Biol Reprod.* 62:378-83, 2000.
- JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SODERQUIST, L.; HAARD, M.G.M.; HAARD, M.C.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status e fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in sweden. *Theriogenology*, 52:641-658, 1999.
- JASKO, D.J.; LEIN, D.H.; FOOTE, R.H. The repeatability e effect of season on seminal characteristics e computer-aided sperm analysis in the stallion. *Theriogenology.* 35(2):317-27, 1991.
- JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN H.H., PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane e its relationship to other semen characteristics. *Journal Reproduction Fertility*, 70:219-228, 1984.
- JOHNSON, L.A.; PURSEL, V.G. Effect of cold shock e freezing on acrossomal proteinase of porcine spermatozoa. *Cryobiology* 11:558. 1974
- JOHNSON, L.A. Fertility results using frozen boar spermatozoa: 1970-1985. In: Johnson LA, Larrson K, eds. *Deep Freezing of Boar Semen*. Uppsala: Swedish Agricultural University Press; 199-222, 1985.
- KAWAMOTO, A.; OHASHI, K.; KISHIKAWA, H.; ZHU, L.Q.; AZUMA, C.; MURATA Y. Two-color fluorescence staining of lectin e anti-CD46 antibody to assess acrossomal status. *Fertil Steril.* 71(3):497-501, 1999.
- KELLER, A. Efeito de dois métodos de remoção do plasma seminal, de três diluentes e do tempo de armazenamento sobre a motilidade e fertilidade

- espermática. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS. 1998, 98p.
- KELSO, K.A. et al. The effects of dietary supplementation with docosahexaenoic acid on the phospholipid fatty acid composition of avian spermatozoa. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 118(1):65-69, 1997.
- KILSDONK, E.P.C.; YANCEY, P.G.; STOUDET, G.W.; BANGERTER, F.W.; JOHNSON, W.J.; PHILLIPS, M.C.; ROTHBLAT, G.H. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J. Biol. Chem.* 270:17250–56, 1995.
- KING, G.J.; MACPHERSON, J.W. A comparison of two methods for boar semen collection. *Journal of Animal Science, Champaign*, 36(4):563-565, 1973.
- KIRK, E.S; SQUIRES, E.L; GRAHAM, J.K. Comparison of in vitro laboratory analyses with the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 64(6):1422-39, 2005.
- KLEIN, U.; GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry*. 34(42):13784-93, 1995.
- KRAUSE, L. Collision excitation transfer between the 2P_{1/2} and 2P_{3/2} levels in alkali atoms. *Appl. Opt.* 5:1375-82, 1966.
- KUMI-DIAKA, J.; BADTRAM, G. Effects of storage on sperm membrane integrity e other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay for canine semen. *Theriogenology* 41:1355-1366, 1994.
- KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*, 39:1279-1289, 1993.
- LADBROOKE, B.D., WILLIAMS, R.M., CHAPMAN, D. Studies on lecithin–cholesterol–water interactions by differential scanning calorimetry e X-ray diffraction, *Biochim. Biophys. Acta*,150:333–340, 1968.
- LAGARES, M.A, Bestimmung der osmotischen Resistenz von Hengstsamenzellen (Determination of osmotic resistance of stallion spermatozoa). Thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover, 1995.
- LANGLAIS, J.; ROBERTS, K.D. A molecular membrane model of sperm capacitation e the acrosome reaction of mammalian sperm. *Gamete Research*..12:183-224, 1985.

- LEIM-ALVARENGA, F.C.; GRAHAM, J.K.; ALVARENGA, M.A.; SQUIRES, E.L.
Calcium influx into equine e bovine spermatozoa during in vitro capacitation.
Anim Reprod. 1(1):96-105, 2004.
- LEIM-ALVARENGA, F.C.; ALVARENGA, M.A.; SEIDEL, G.E. Jr.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Penetration of zona-free hamster, bovine e equine oocytes by stallion e bull spermatozoa pretreated with equine follicular fluid, dilauroylphosphatidylcholine or calcium ionophore A23187. *Theriogenology.* 56(5):937-53, 2001.
- LARSSON, K.; EINARSSON, S. Influence of boars on the relationship between fertility e post-thawing sperm quality of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Vet. Sce.* 17:74-82, 1976.
- LEIBO, S.P.; BRADLEY, L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: GAGNON, C (Ed). *The male gamete: from basic science to clinical applications.* Viena: Cache River Press, 1999.p.501-516.
- LINDE-FORSBERG, C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extend semen. *Vet Clin. of North America: Small ANIM. Pract.,* 21:467-485,1991.
- LIU, Z., FOOTE, R. H., BROCKET, C.C. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. *Cryobiology,* 37:219-230, 1998.
- MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GUNZEL, Anne-Rose. Centrifugation of stallion semen e its storage in large volume straws. *J. Reprod. Fert., supply.,* 27:47-51, 1979.
- MASSIP, A.; VAN DER ZWALMEN, P.; SCHEFFEN, B.; ECTORS, F. Pregnancies following transfer of cattle-embryos preserved by vitification. *Cry-letters,* 7:270-273,1986.
- MATTIOLI, M., BARBONI, B., LUCIDI, P., SEREN, E. Identification of capacitation in boar spermatozoa by chortetraciline staining. *Theriogenology,* 45:73-381, 1996.
- MAZUR, P., RALL, W.F., LEIBO,T S.P., Kinetics of water loss e likelihood of intracellular freezing in mouse ova: influence of the method of calculating the temperature dependence of water permeability, *Cell Biophys.,* 6:197–214, 1984.
- MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology* 48:209-219, 1997.

- McDONALD. Hormones of the Pituitary Gland. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 6th ed. Edited by NH Booth and LE McDonald. Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa. 1988; 590.
- McGRATH, J.J. Membrane transport properties. In: McGrath JJ, Diller KR, eds. Low Temperature Biotechnology: Emerging Applications and Engineering Contribution. New York, NY: ASME Press, BED-Vol 10, HTD-Vol 98, 273–330, 1988.
- McKINNON, A.O. Artificial insemination of cooled, transported and frozen semen. *Austr. Equi. Vet. J.*, 14(4):156-175, 1996.
- MERKIES, K.; CHENIER, T.; PLANTE, C.; BUHR, M.M. Assessment of stallion spermatozoa viability by flow cytometry and light microscope analysis. *Theriogenology*. 2000; 54(8):1215-24.
- MOCÉ, E., GRAHAM, J.K. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival *J. Anim. Sci.*, v.84, p.826–833, 2006.
- MOORE, A.I., SQUIRES, E.L., GRAHAM, J.K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, v.51, p.241–249, 2005.
- MORRIER, A.M. Theriault, F., Castonguay, J.L. Bailey. Effect of cholesterol loaded methyl- β -cyclodextrin on ram sperm during cryopreservation, cold-shock and artificial insemination. p.239 (abstract 636) in *Proc. Soc. Study of Reproduction Mtg. Vancouver, BC, Canada. Biology of Reproduction*, Madison, WI. 2004.
- NAVRATIL, A.M.; BLISS, S.P., BERGHORN, K.A.; HAUGHIAN, J.M. FARMERIE, T.A. GRAHAM, J.K. CLAY, C.M. ROBERSON, M.S. Constitutive localization of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor to low density membrane microdomains is necessary for GnRH signaling to ERK. *J. Biol. Chem*, 278:31593–31602, 2003.
- NEILD, D.N.; GADELLA, B.M.; AGUERO, A.; STOUT, T.A.; COLENBREER, B. Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. *Anim Reprod Sci.* 89(1-4):47-56, 2005.
- NELSON, D. L., COX, M. M. *Lehninger principles of biochemistry*. 3a ed. 1152 p., 2000.
- NEUFELD, E.B., COONEY, A.M., PITHA, J., DAWIDOWICZ, E.A., DWYER, N.K., PENTCHEV, P.G., BLANCHETTE-MACKIE, E.J. Intracellular trafficking

- of cholesterol monitored with a cyclodextrin. *J Biol Chem.*, 271:21604-21613, 1996.
- NOILES, E.E.; MAZUR, P.; BENKER, F.W.; KLEINHAUS, F.W.; AMANN, R.P.; CRITSER, J.K. Critical osmolarity, water e glycerol permeability coefficient determination for equine spermatozoa. *Biol Reprod.* 46(suppl 1):95, 1992.
- NOLAN, J.P., GRAHAM, J.K., HAMMERSTEDT, R.H. Artificial induction of exocytosis in bull sperm. *Arch Biochem Biophys.* 292:311-322, 1992.
- OEHNINGER, S. DURU, N.K., SRISOMBUT, C. Assessment of sprm cryodamage e strategies to improve outcome. *Molecular e cellular endocrinology*, 169:3-10, 2000.
- OHVO, H., OLSIO, C., SLOTTE, J.P. Effects of sphingomyelin e phosphatidylcholine degradation on cyclodextrin-mediated cholesterol efflux in cultured fibroblasts. *Biochimica Biophysica Acta.* 1349:131-141, 1997.
- OLLERO, M., BESCÓS, O., CEBRIAN-PREZ, J. A, MUÑO-BLANCO, T. Loss of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process. *Theriogenology*, 49:447-455, 1998.
- PACE, M.M.; SULLIVAN, J.J. Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa e extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen. *Journal of Reproduction Fertility*, 23:115-121, 1975.
- PANTKE, P., HYLE, J.K.; GALLOWAY, D.B.; LIU, D.Y.; BAKER, H.W.G. Development of a zona pellucida-sperm binding assay for the assessment of stallion fertility. *Biology of Reproduction Monograph Series* 1:681- 687, 1995.
- PAPAIOANNOU, K.Z.; MURPHY, R.P.; MONKS, R.S.; HYNES, N.; RYAN, M.P.; BOLE, M.P.; ROCHE, J.F. Assessment of viability e mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining e flow cytometry. *Theriogenology*.48:299–312, 1997.
- PAQUIGNON, M.; MERGOUNIS, D.; COUROT, M.; DU MESNIL DU BUISSON, F. Technologie de la congélation de la semence de verrat: étude in vitro. *Journées Rech. Porcine France*, p.71-76, 1974.
- PARINAUD J, VIEITEZ G, VIEU C, COLLET X, PERRET B. Enhancement of zona binding using 2-hydroxypropyl- beta-cyclodextrin. *Hum Reprod.* 15(5):1117-20, 2000.

- PARRISH JJ, SUSKO-PARRISH JL, GRAHAM JK. In vitro capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. *Theriogenology*. 51(2):461-72, 1999.
- PARRISH JJ, SUSKO-PARRISH JL, UGUZ C, FIRST NL. Differences in the role of cyclic adenosine 3'5'-monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. *Biol. Reprod.* 51:1099-1108, 1994.
- PARKINSON, T.J.; WHITEFIELD, C.H. Optimisation of freezing conditions for bovine spermatozoa. *Theriogenology*. 27:781–798, 1987.
- PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38:209-22, 1992.
- PARKS, J.E.; LYNCH, D.V. Lipid composition e thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, e rooster sperm membranes. *Cryobiology*. 29:255-266, 1992.
- PENA, A.I.; BARRIO, M.; BECERRA, J.J.; QUINTELA, L.A.; HERRADON, P.G. Zona pellucida binding ability e responsiveness to ionophore challenge of cryopreserved dog spermatozoa after different periods of capacitation in vitro. *Anim Reprod Sci.* 84(1-2):193-210, 2004.
- PENA, A.; JOHANNISSON, A.; LINDE-FORSBERG, C. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining e flow cytometry. *Theriogenology*. 52(6):965-80, 1999.
- PHELPS, M.J.; LIU, J.; BENSON, J.D.; WILLOUGHBY, C.E.; GILMORE, J.A.; CRITSER, J.K. Effects of percoll separation, cryoprotective agents, e temperature on plasma membrane permeability characteristics of murine spermatozoa e their relevance to cryopreservation. *Biol. Reprod.* 61:1031-1041, 1999.
- PICKETT, B.W. Reproductive evaluation of the stallion. In: MCKINNON, A. O., VOSS, J. L.: *Equine Reproduction*. Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 755-768, 1993.
- PIKE, L.J.; MILLER, J.M. Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol bisphosphate e inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover. *J Biol Chem.* 273:22298–22304, 1998.
- PITHA, J.; IRIE, T.; SKLAR, P.B.; NYE, J.S. Drug solubilizers to aid pharmacologists: amorphous cyclodextrin derivatives. *Life Sci.* 43(6):493-502, 1988.

- PURDY, P.H.; GRAHAM, J.K. Effect of cholesterol loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*, 48:36-45, 2004.
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen e a new thawing procedure. *J Anim Sci.* 40:99-102, 1975.
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; RAMPACEK, G.B. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J. Anim. Sci.* 34:278-283, 1972.
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. Distribution of glutamic oxaloacetic transaminase dehydrogenase activities in boar semen after cold shock e freezing. *Cryobiology*. 7:141-144, 1970.
- QUINN, P.J.; CHOW, P.Y.W.; WHITE, I.G. Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J. Reprod. Fert.* 60:403-407, 1980.
- RICHTER, L.; ROMENY, E.; WEITZE, K.; ZIMMERMANN, F. Deep freezing of boar semen. Part VII: laboratory e field experiments using the Hulsenberg VIII extender. *Dtsch. Tieraerztl Wochenschr*, 82:155-62, 1975.
- RIFFO, M. Role of phospholipase A2 in mammalian sperm-egg fusion: development of hamster oolemma fusibility by lysophosphatidylcholine MS, Parraga M. *J Exp Zool.* 279(1):81-8, 1997.
- RIFFO, M.; Parraga, M. Lysophosphatidylcholine treatment allows interspecies fertilization of hamster oocytes with zona pellucida by human spermatozoa. *J Exp Zool.* 271(2):151-4, 1995.
- ROSER, J.F., KIEFER, B.L., EVANS, J.W., NEELY, D.P., PACHECO, D.A. The development of antibodies to human chorionic gonadotrophin following its repeated injection in the cyclic mare. *J Reprod Fertil Suppl.* 27:173-9. 1979.
- ROTTEM, S., YASHOUV, J., NEWEMAN, A.; RAZIN, A. Composition, ultra-structure e biological properties of membrane from *Mycoplasma mycoides* var. *capri* cells adapted to grow with low cholesterol concentrations, *Biochim. Biophys. Acta*, 323:495-508, 1973.
- SHADAN, S., JAMES, P.S., HOWES, E.A., JONES, R. Cholesterol efflux alters lipid raft stability e distribution during capacitation of boar spermatozoa. *Biol Reprod.* 71(1):253-65, 2004.

- SIEGEL, I. et al. Inhibition of sperm motility and agglutination of sperm cells by free fatty acids in whole semen. *Fertil. Steril.* 45(2):273-279, 1986.
- SLOTT, V.L.; SUAREZ, J.D.; POSS, P.M.; LINDER, R.E.; STRADER, L.F.; PERREAULT, S.D. Optimization of the Hamilton-Thorn Computerized Sperm Motility Analysis System for Use with Rat Spermatozoa in Toxicological Studies. *Toxicological Sciences*, 21:298-307, 1993.
- STEPONKUS, P.L., DOWGERT, M.F., GORDON-KAMM, W.J. Destabilization of the plasma membrane of isolated plant protoplasts during freeze-thaw cycle: the influence of cold acclimation, *Cryobiology*, 20:448-465, 1983.
- STOREY, B.T., HOURANI, C.L., KIM, J.B. A transient rise in intracellular Ca²⁺ is a precursor reaction to the zona pellucida-induced acrosome reaction in mouse sperm e is blocked by the induced acrosome reaction inhibitor 3-quinuclidinyl benzilate. *Mol Reprod Dev.* 32(1):41-50, 1992.
- SUKARDI, S., CURRY, M.R., WATSON, P.F. Simultaneous detection of the acrosomal status e viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. *Anim Reprod Sci.* 46(1-2):89-96, 1997.
- SWENSON, M. J.; REECE, W. O. *Dukes - Fisiologia dos animais domésticos.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 856p.
- THERIEN, I., MANJUNATH, P. Effect of progesterone on bovine sperm capacitation e acrosome reaction. *Biol Reprod.* 69(4):1408-15, 2003.
- THOMAS, C.A., GARNER, D.L., DEJARNETTE, J.M., MARSHALL, C.E. Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function e viability as determined by flow cytometry. *Biol Reprod.* 58(3):786-93, 1998.
- TRAVIS, A.J., KOPF, G.S. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest.* 110(6):731-6, 2002.
- TRIANA, L.R., BABCOCK, D.F., LORTON, S.P., FIRST, N.L., LARDY, H.A. Release of acrosomal hyaluronidase follows increased membrane permeability to calcium in the presumptive capacitation sequence for spermatozoa of the bovine e other mammalian species. *Biol Reprod.* 23(1):47-59, 1980.
- TARIN, J.J., TROUNSON, A.O. Inducers of the acrosome reaction. *Reprod Fertil Dev.* 6(1):33-5, 1994.

- TROWBRIDGE, I.S. Isolation e chemical characterization of a mitogenic lectin from *Pisum sativum*. *J Biol Chem*. 249(18):6004-12, 1974.
- TULSIANI, D.R., YOSHIDA-KOMIYA, H., ARAKI, Y. Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. *Biol Reprod*. 57(3):487-94, 1997.
- UAUY, R.; DANGOUR, A.D. Nutrition in brain development and aging: role of essential fatty acids. *Nutr Rev* 64:S24-33, 2006.
- VAN DER SCHAAF, A. Vitalkleuring van stieren-sperma met een oplossing van anilineblauw en eosine. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 77:815, 1952.
- VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L. et al. Effects of cooling rate e storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*, 29:1043-1055, 1988.
- VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; MARTINEZ, P.; ARTIGA, C.G. ROCA, J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology*, 47:913-922, 1997.
- VIDAMENT, M., DUPERE, A.M., JULIENNE, P., EVAIN, A., NOUE, P., PALMER, E. Equine frozen semen: Freezability e fertility field results. *Theriogenology*. 48(6):907-17, 1997.
- VISCONTI, P.E., GALANTINO-HOMER, H., NING, X., MOORE, G.D., VALENZUELA, J.P., JORGEZ, C.J. Cholesterol effluxmediated signal transduction in mammalian sperm: beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation e capacitation. *J. Biol. Chem*. 274:3235-42, 1999.
- VISHWANATH, R., SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid e frozen state. *Anim. Reprod. Sci.*, v.62, p.23-53, 2000.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* v. 60-61 p. 481-492, 2000.
- WATSON, P.F. Recent developments e concepts in cryopreservation of spermatozoa e the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* p. 871-891 1995.
- WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes, in: MORRIS, G.J., CLARKE, A. (Eds.), *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*, Academic Press, New York, 1981, p.189–218.

- WESTENDORF, P., RITCHER, L., TREU, H. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma. Labor-und Besamungsergebnisse mit dem Hülsenberger Paillettenverfahren. *DtschTiera"rztl Wschr.*82:261–267, 1975.
- WHITE, I.G. Lipids e calcium uptake of sperm in relation to cold shock e preservation: a review. *Reprod. Fertil. Dev.* 5(6):639-658, 1993.
- WILHELM, K.M., GRAHAM, J.K., SQUIRES, E.L. Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, e zona-free hamster oocyte penetration. *Theriogenology.*; 46(4):559-78, 1996.
- WOLFE, C.A, JAMES, P.S., MACKIE, A.R., LADHA, S., JONES, R. Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. *Biol. Reprod.* 59:1506-1514, 1998.
- YANCEY, P.G., RODRIGUEZA, W.V., KILSDONK, E.P., STOUT, G.W., JOHNSON, W.J., PHILLIPS, M.C., ROTHBLAT, G.H. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration Of kinetic pools e mechanism of efflux. *J Biol Chem.* 271(27):16026-34, 1996.
- YANAGIMACHI, R. The movement of golden hamster spermatozoa before e after capacitation. *J Reprod Fertil.* 23(1):193-6, 1970.
- YEAGLE, P.L. Cholesterol e the cell membrane. *Biochim Biophys Acta.*, v.822, p.267–287, 1985.
- ZAVOS, P.M.; CENTOLA, G.M. Selection of sperm from oligozoospermic men for ARTA: Comparisons between swim-up vs SpermPrep™ filtration. *ARTA* 1:338-345, 1991.

FONTE DE ÓLEO E NÍVEIS DE SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA E NA RAÇÃO SOBRE A COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE ESPERMATOZÓIDES DE SUÍNOS REPRODUTORES

(Oil sources and vitamin E in the diet on the fatty acid composition of boar sperm)

Elenice Andrade Moraes e Amorim, Ciro Alexandre Alves Torres

Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG

36570-000, Brasil

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da adição de fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E na ração sobre a composição de ácidos graxos em espermatozóides de suínos. Foram utilizados 24 suínos machos reprodutores Dalboard 85, com idades entre 12 e 18 meses, distribuídos num delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 X 3, com duas fontes de óleo (soja e salmão) e três níveis de antioxidantes (150, 300 e 450 mg de vitamina E/kg). As amostras de sêmen para determinação da composição de ácidos graxos nos espermatozóides foram feitas na semana 0, 1^a, 4^a, 7^a e 10^a semana. A ração com óleo de salmão reduziu ($P < 0,05$) o teor de ácidos graxos ω_6 , especificamente do ácido docosapentanóico (C22:5 ω_6 ; DPA) e aumentou ($P < 0,05$) o teor do ácido docosahexanóico (C22:6 ω_3 ; DHA). Nenhuma alteração foi observada nos espermatozóides dos animais tratados com óleo de soja. Com exceção destes ácidos graxos que apresentaram diferença, nenhuma alteração foi observada nos demais ácidos graxos analisados ($P > 0,05$). O aumento do teor do ácido DHA ($P < 0,05$) nos espermatozóides dos animais tratados com óleo de salmão foi de 34,67 para 45,50%, ao contrário do ácido DPA, que diminuiu de 23,30 para 11,40%, considerando da 1^a para a 10^a semana. O teor de vitamina E nos espermatozóides de suínos não foi alterado ($P > 0,05$) em relação à fonte de óleo e aos níveis de vitamina E nas rações. A suplementação com óleo de salmão altera a composição de ácidos graxos da membrana de espermatozóides de suínos reprodutores.

Palavras-chaves: ácidos graxos, cromatografia, perfil lipídico, sêmen, óleo de salmão e soja, varrões.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the addition of oil sources and dietary vitamin E supplementation on the boar sperm fatty acid composition. Twenty-four mature Dalboard 85 boars, of proven fertility and in routine semen production for artificial insemination, were randomly divided, in factorial arrangement 2 X 3, with two oil sources (soy and salmon) and three levels of antioxidants (150, 300 and 450 vitamin E mg/kg). The sperm samples for fatty acid composition determination in spermatozoa were realized in the weeks 0, 1^a, 4^a, 7^a and 10^a. The dietary supplementation with salmon oil reduced ($P < 0.05$) the proportion of $\omega 6$ fatty acid, specifically of docosapentaenoic acid (22:5 $\omega 6$; DPA) and it increased ($P < 0.05$) the proportion of docosahexanoic acid (22:6 $\omega 3$; DHA). No alteration was observed in the sperm of the animals treated with soy oil ($P < 0.05$). Except for these fatty acids, no other difference was observed ($P > 0.05$). The DHA increased level ($P < 0.05$) in the sperm of salmon oil treated was from 34.67 to 45.5%, and DPA decreased from 23.3 to 11.4%, from first to 10 week. The boar sperm vitamin level did not change ($P > 0.05$) by the treatments. The fatty acid composition of the boar spermatozoa membranes was changed by salmon oil supplementation.

Keywords: fatty acid, chromatography, lipid composition, semen, salmon and soy oil, boars, alpha-tocopherol.

INTRODUÇÃO

Os órgãos reprodutivos dos machos são influenciados pelos níveis de ácidos graxos essenciais da dieta (Leathem, 1970). O significado fisiológico dos ácidos graxos no metabolismo dos espermatozoides está relacionado a dois aspectos: fontes de substratos endógenos para metabolismo oxidativo, podendo elevar a capacidade de sobrevivência nos órgãos reprodutivos masculino e feminino; e fazer parte da constituição dos fosfolípidios, podendo influenciar nas propriedades funcionais das membranas biológicas.

A maioria das células degrada e substitui continuamente os lipídeos de sua membrana (Lehninger et al. 1995) que são oxidados para produção de energia (Mann, 1964).

Os fosfolipídios dos espermatozóides de mamíferos têm uma composição de ácidos graxos característica, sendo uma concentração elevada de ácidos graxos altamente poliinsaturados de cadeia longa. Em muitos mamíferos, o ácido docosahexanóico (DHA) é o ácido graxo poliinsaturado (PUFA) mais dominante, como um importante componente da membrana espermática (Penny et al., 2001).

Os lipídeos também são componentes celulares de membranas biológicas, e os principais componentes lipídicos dos espermatozóides, que contêm grande quantidade de PUFAs (Scott, 1973). Os PUFAs da série ômega 3 (ω 3) e ômega 6 (ω 6) são ácidos graxos essenciais, visto que, não podem ser sintetizados pelos animais e precisam ser fornecidos pela ração. Com relação à constituição da membrana celular, o aumento na proporção de PUFA nos espermatozóides, durante sua maturação no epidídimo, pode ter efeito pronunciado nas propriedades físicas e químicas da membrana. Desse modo, a inclusão de óleos na ração pode modificar o perfil de ácidos graxos dos espermatozóides (Scott, 1973). Mas apesar dos efeitos benéficos dos ácidos graxos ω 3, altas concentrações de PUFAs dentro das frações lipídicas dos espermatozóides torna-os altamente susceptíveis à peroxidação com conseqüente risco de danos à estrutura celular (Niki et al., 1993). Portanto, é necessário um sistema antioxidante para protegê-los contra danos peroxidativos (Aitken, 1994). Objetivou-se avaliar o efeito da adição de diferentes fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E sobre a composição de ácidos graxos em espermatozóides de suínos machos reprodutores.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e período

O experimento foi conduzido de setembro de 2005 a janeiro de 2006, a 27°00'30" de latitude sul e 51°09'06" de longitude oeste, altitude média de 750 m, clima Cfa, segundo a classificação de Köppen-Geiger (verão quente) com temperatura média anual de 17 °C e precipitação pluviométrica média

anual de 1.800 mm, nas dependências do Centro de Difusão Genética da Perdigão Agroindustrial S/A (Videira/SC).

Análises para determinação da composição dos ácidos graxos foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte/MG).

Animais e manejo

Foram utilizados 24 suínos machos reprodutores Dalboard 85, com idades de 12 a 18 meses, alojados em baias individuais com água ad libitum e suplementação concentrada diária, segundo exigências estabelecidas pelo NRC (1998).

Os animais foram distribuídos num delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 X 3, com duas fontes de óleo (soja e salmão) e três níveis de antioxidantes (150, 300 e 450 mg de vitamina E/kg de ração), durante um período experimental de 10 semanas. Foram adicionados 3,5% de óleo, independente da fonte utilizada. A composição centesimal foi baseada nas exigências nutricionais do NRC (1998) que se encontra na Tabela 1.

Coleta e avaliação do sêmen

Antes de cada coleta foi realizada a higienização externa do prepúcio com água e sabão neutro e interna com solução fisiológica, para evitar possíveis contaminações do sêmen.

As amostras de sêmen coletadas para determinação do teor de ácidos graxos nos espermatozoides de suínos foram realizadas na primeira, quarta, sétima e décima semana, sendo uma coleta por macho, pelo método da mão enluvada (King e Macpherson, 1973), em sala apropriada com um manequim. O sêmen foi coletado em copo plástico de 700 mL contido em um copo térmico, com água previamente aquecida a 37 °C. Imediatamente, após a coleta do sêmen, o ejaculado foi analisado quanto a sua motilidade e vigor espermático, conforme normas do CBRA (1998).

Tabela 1 – Composição centesimal da ração experimental disponibilizada para reprodutores suínos

Ingredientes	Quantidade (kg)
Milho	66,05
Farelo de Soja	19,40
Casca de Soja	7,38
Óleo ¹	3,50
Foscálcio	1,63
Calcário	0,87
Sal	0,45
Premix Vitamina e Mineral ²	0,40
Adsorvente Mycofix	0,20
Lisina	0,13
Total	100,00
Composição calculada	
Matéria seca (%)	87,53
Energia metabolizável (kcal/kg)	3.555
Proteína bruta (%)	17,3
Fibra (%)	4,60
Cálcio (%)	0,79
Fósforo disponível (%)	0,45
Gordura (%)	6,59
Metionina (%)	0,237
Metionina + Cistina (%)	0,503
Lisina (%)	0,799

¹Óleos de soja e salmão foram adicionados na mesma proporção.

²Premix vitamínico e mineral suíno reprodução 0,4% (Perdigão S/A).

Determinação de ácidos graxos e vitamina E

Nos óleos e rações

Os ácidos graxos presentes nos óleos e rações foram extraídos pela técnica preconizadas por Folch et al. (1957) e a composição de ácidos graxos identificados nos óleos e rações foi determinada por cromatografia gasosa segundo Firestone (1998). As amostras foram transmetiladas com

base na metodologia de Hartman e Lago (1973), que consiste de saponificação e conversão dos ácidos graxos em ésteres metílicos. Foi utilizado um cromatógrafo gasoso (Pye Unicam PU 4550, Philips), equipado com detector por ionização em chama, injetor split vazão de 100:1; coluna capilar de sílica fundida, 50 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno, com 0,2 mm de polietileno glicol (CP-Sil 88, Chrompack WCOT, Holanda), acoplado a um software (Borwin, JMBS Developments). As condições cromatográficas foram: temperatura da coluna, 180 °C (isotérmica); gás de arraste, hidrogênio numa vazão de 2,0 mL/min e temperatura do detector de 300 °C e do injetor de 270°C. A identificação dos ácidos graxos foi feita por comparação dos tempos de retenção dos padrões de ésteres metílicos com os da amostra, e a quantificação feita por normalização.

A metodologia utilizada para determinação do conteúdo de vitamina E nas diversas fontes de óleo e rações experimentais foi proposta por Brubacher et al. (1985).

Nos espermatozóides

A avaliação do perfil de ácidos graxos e teor de vitamina E nos espermatozóides foram realizados na 1^a, 4^a, 7^a e 10^a semana do período experimental. A determinação dos diversos ácidos graxos foi feita a partir de um total de 96 amostras distribuídas entre os tratamentos.

O protocolo utilizado no preparo do sêmen para extração de ácidos graxos foi descrito por Rooke et al. (2001). Consistiu da retirada de 20 mL da fração rica em espermatozóide do ejaculado. Os espermatozóides foram separados do plasma seminal por centrifugação a 700 g por 20 minutos. Depois foram re-suspendidos em igual volume (1:1) de solução de NaCl 0,9% e novamente centrifugado. Este processo foi repetido duas vezes. O plasma seminal foi descartado. Os espermatozóides foram estocados a temperatura de -20 °C para posterior análise.

Para análise do perfil de ácidos graxos foi utilizado o protocolo recomendado por Blesbois et al. (1997). Consistiu de um rápido descongelamento e posterior extração de lipídeos presentes nas amostras de espermatozóides, com utilização de clorofórmio/metanol (2:1, v/v). A

técnica adotada quanto à extração e à esterificação dos lipídeos foi descrita por Hulan et al. (1989). Após sua obtenção os ésteres de ácidos graxos foram analisados em um cromatógrafo gasoso GC-17A Shimadzu, dotado de detector de ionização em chama de injeção automático, coluna capilar (Carbowax), sendo utilizado H₂ como gás de arraste. Os cálculos foram feitos por integração com um computador ligado ao detector. Os picos dos ácidos graxos foram identificados pela comparação com um padrão.

O teor de vitamina E presente nos espermatozóides foi mensurado segundo a metodologia proposta por Ueda e Igarashi (1990) e expressa em ppm.

Análises estatísticas

As análises dos parâmetros avaliados foram realizadas com utilização do programa SAEG (UFV, 1997). As variáveis foram submetidas aos testes de normalidade e homocedacidade. Posteriormente, foram submetidas à análise de variância dos dados e utilizadas o teste de Student Newman-Keuls (SNK) para comparação de médias entre as fontes de óleo, com nível de significância de 5% e análise de regressão para os níveis de antioxidantes usados. Quando houve interação foi determinado o efeito do nível de antioxidante dentro de cada fonte.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição dos principais ácidos graxos identificados nos óleos e nas rações podem ser observados, respectivamente, nas Tabelas 2 e 3.

Nenhum efeito dos níveis de vitamina E e de sua interação com a fonte de óleo foi observado ($P > 0,05$).

O óleo de salmão apresentou o teor de ácidos graxos poliinsaturados de 49,34%, dos quais 37,14% (Tabela 2) foram representados pelo ácido graxos alfa-linolênico (5,36%, C18:2 ω 3) e derivados, eicosapentanóico (10,0%, EPA; C20:5 ω 3) docosapentanóico (4,99%, DPA; C22:5 ω 3) e docosahexanóico (16,79%, DHA; C22:6 ω 3). O óleo de soja e a respectiva ração não apresentaram ácidos graxos EPA, DPA e DHA da série ômega 3.

Tabela 2 – Composição de ácidos graxos (%) identificados nos óleos adicionados às rações experimentais disponibilizadas para reprodutores suínos

Ácidos Graxos	Óleos	
	Soja (%)	Salmão (%)
C14:0 (Ác. Mirístico)	ND	4,21
C16:0 (Ác. Palmítico)	10,93	15,94
C16:1 (Ác. Palmitoléico)	0,07	5,33
C18:0 (Ác. Estearico)	5,67	4,85
C18:1 ω 9 (Ác. Oléico)	24,44	18,99
C18:2 ω 6 (Ác. Linoléico)	52,65	12,2
C18:3 ω 3 (Ác. Linolênico)	6,90	5,36
C20:0 (Ác. Araquídico)	0,59	0,01
C20:4 ω 9 (Ác. Araquidônico)	ND	ND
C20:5 ω 3 (EPA)	ND	10,0
C22:1 ω 9 (Ác. Erúcico)	0,01	1,97
C22:5 ω 3 (DPA)	ND	4,99
C22:6 ω 3 (DHA)	ND	16,79
Saturados	17,19	25,01
Monoinsaturados	24,52	26,29
Poliinsaturados	59,55	49,34
Ômega 6	52,65	12,20
Ômega 3	6,90	37,14
Ômega 6:Ômega 3	7,63	0,33
Insaturados:Saturados (I:S)	4,89	3,02

ND = não detectado.

Tabela 3 – Composição de ácidos graxos (%) identificados nas rações experimentais disponibilizadas para reprodutores suínos

Ácidos Graxos	Rações com óleos	
	Soja (%)	Salmão (%)
C14:0 (Ác. Mirístico)	ND	2,54
C16:0 (Ác. Palmítico)	13,1	16,54
C16:1 (Ác. Palmitoléico)	0,21	3,06
C18:0 (Ác. Esteárico)	5,22	4,39
C18:1 ω 9 (Ác. Oléico)	28,74	26,81
C18:2 ω 6 (Ác. Linoléico)	46,8	31,03
C18:3 ω 3 (Ác. Linolênico)	5,33	1,89
C20:0 (Ác. Araquídico)	1,89	0,46
C20:4 ω 9 (Ác. Araquidônico)	0,35	0,23
C20:5 ω 3 (EPA)	ND	4,86
C22:1 ω 9 (Ác. Erúcico)	0,37	0,3
C22:5 ω 3 (DPA)	ND	2,28
C22:6 ω 3 (DHA)	ND	7,63
Saturados	20,19	23,93
Monoinsaturados	29,32	30,17
Poliinsaturados	52,48	47,92
Ômega 6	47,15	31,27
Ômega 3	5,33	16,65
Ômega 6:Ômega 3	8,85	1,88
Insaturados:Saturados (I:S)	4,05	3,26

ND = não detectado.

Os valores de vitamina E analisados nos óleos e nas rações experimentais podem ser observados nas Tabelas 4 e 5. Os ácidos graxos poliinsaturados necessitam de uma proteção oxidante para o melhor resultado quanto às suas funções metabólicas específicas.

Tabela 4 – Concentração de vitamina E (%) identificados nos óleos utilizados nas rações experimentais disponibilizadas para reprodutores suínos

	Fontes de óleo	
	Soja	Salmão
Alfa-tocoferol (mg/100g)	14,31	9,98
Beta-tocoferol (mg/100g)	ND < 0,01	1,87
Gama-tocoferol (mg/100g)	56,77	59,78
Delta-tocoferol (mg/100g)	13,11	15,06
Tocoferol total (mg/100g)	84,19	86,69
Vitamina E (UI/100g)	25	19

ND = não detectado.

Tabela 5 – Concentração de vitamina E (mg/kg) identificados nas rações experimentais

Rações experimentais	Níveis de vitamina E (mg/kg)		
	150	300	450
Dieta base + Soja	149,9	300,1	398,6
Dieta base + Salmão	150,1	302,0	397,3

Composição de ácidos graxos identificados nos espermatozóides

A suplementação com óleo de salmão alterou ($P < 0,05$) a composição de ácidos graxos da membrana de espermatozóides de suínos reprodutores (Tabela 6). Similar as pesquisas que descrevem a composição de ácido graxos da membrana de espermatozóides de suínos (Johnson et al., 1969; Nikolopoulou et al., 1985; Poulos et al., 1986). Entretanto, o estudo da fração rica em espermatozóides do sêmen suíno foi avaliado por outros (Johnson et al., 1972; Paulenz et al., 1995 e 1999; Strzezek et al., 2004).

Tabela 6 – Fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E sobre a composição de ácidos graxos (%) de espermatozóides de suínos

Fontes de óleo	Nível de Vitamina E (mg/kg)				CV (%)
	150	300	450	Média	
C18:1 ω 9 – Ácido Oléico					
Soja	17,17	17,15	17,15	17,16	
Salmão	17,2	17,17	17,17	17,18	
Média	17,18	17,16	17,16		37,5
C18:2 ω 6 Ácido Linoléico					
Soja	2,75	3,75	5,82	4,11	
Salmão	2,57	2,77	5,52	3,42	
Média	2,66	3,26	5,67		17,9
C18:3 ω 3 - Ácido Linolênico					
Soja	3,8	3,25	3,25	3,43	
Salmão	3,75	3,25	3,18	3,39	
Média	3,77	3,25	3,21		47,5
C20:4 ω 6 - Ácido Araquidônico					
Soja	10,75	10,55	10,0	10,43	
Salmão	9,50	9,55	9,40	9,48	
Média	10,15	10,05	9,7		44,2
C22:5 ω 6 – Docosapentanóico (DPA)					
Soja	24,85	25,03	24,85	24,91 ^a	
Salmão	17,94	17,56	17,46	17,65 ^b	
Média	21,40	21,30	21,16		19,6
C22:6 ω 3 – Ácido Docosahexanóico (DHA)					
Soja	31,70	33,37	31,32	32,13 ^b	
Salmão	38,25	42,25	41,37	40,62 ^a	
Média	34,97	37,81	36,35		19,7
Ácidos Graxos Saturados					
Soja	61,70	63,37	64,32	63,13	
Salmão	48,55	50,50	47,75	48,93	
Média	55,12	56,93	56,03		27,4
Relação ω 6: ω 3					
Soja	0,87	0,85	0,91	0,87 ^a	
Salmão	0,60	0,55	0,55	0,57 ^b	
Média	0,73	0,70	0,73		15,9

^{a,b}Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha/coluna diferiram pelo teste SNK (P<0,05).

Foram avaliados os seguintes ácidos graxos nos espermatozóides: oléico, linoléico, linolênico, araquidônico, DPA e DHA. Os ácidos graxos poliinsaturados da série ω_3 não foram identificados no óleo de soja, provavelmente em função de sua baixa concentração. De acordo com Penny et al (2000) os principais ácidos graxos presentes nos espermatozóides de suínos são C18:2 ω_6 , C20:4 ω_6 , C22:4 ω_6 , C22:5 ω_6 (DPA) e C22:6 ω_3 (DHA), sendo estes dois últimos em maior porcentagem que os demais.

A composição de ácidos graxos dos espermatozóides de suínos foram similares aos reportados em estudos anteriores em suínos (Paulenz et al., 1995; 1999; Rooke et al. 2001), com aumento na proporção de DHA e redução de DPA (Tabela 6). Nestes estudos, os espermatozóides de suínos incorporaram mais DHA que DPA, e isto pode ser em função de duas razões: primeiramente, o DHA pode ter uma importância especial para as funções dos espermatozóides e o tecido testicular pode portanto ter uma alta afinidade pelo DHA. Em segundo, o tecido testicular pode ter um requerimento mais alto para PUFA's. Desde que a dieta contenha alta quantidade de DHA, a necessidade é coberta pelo ácido graxo, sendo facilmente disponibilizado (Spector e Moore, 1996 citados por Paulenz et al., 1999).

Dentro das semanas avaliadas, constatou-se a redução ($P < 0,05$) do teor de DPA para os animais tratados com óleo de salmão, enquanto que para DHA houve um aumento na composição ($P < 0,05$) quando comparado com o óleo de soja. Com exceção do teor de DPA e DHA que alteraram quando foi utilizado óleo de soja e salmão ($P < 0,05$), o uso destes óleos na ração não alterou ($P > 0,05$) o teor dos outros ácidos graxos observados. O aumento do teor do ácido DHA ($P < 0,05$) nos espermatozóides dos animais tratados com óleo de salmão foi de 34,67 para 45,50%, ao contrário do ácido DPA, que diminuiu de 23,36 para 11,39% (Figura 1), considerando da 1ª para a 10ª semana.

Comportamento semelhantes para ambos ácidos graxos foram reportados em várias pesquisas onde se estudou a composição de ácido graxos em espermatozóides de suínos após a suplementação da dieta com fontes ricas em ácidos graxos ω_3 , tais como, óleo de fígado de bacalhau (Paulenz et al., 1995 e 1999), óleo de atum (Rooke et al., 2001),

PROSPERM[®] (óleo de peixe; Strzezek et al., 2004) e óleo de peixe (Silva et al., 2005).

Variações entre os estudos na quantidade dos ácidos graxos DHA e DPA, tem sido observados em espermatozóides de suínos em função da dieta: 23 e 34% (Johnson et al., 1972), 29 e 11% (Paulenz et al., 1995), 41 e 13% (Rooke et al., 2001). A idade e a dieta dos varrões, quando o sêmen foi utilizado, podem ser importantes fatores que influenciam a composição de fosfolípidios da membrana espermática. Mudanças na composição de lípidios dos espermatozóides relacionado à idade foi observado em galos (Kelso et al., 1997b) e bovinos (Kelso et al., 1997a). Entretanto, no presente estudo, a relação inversa entre as proporções de DHA e DPA nos ácidos graxos dos espermatozóides no início do experimento não foi relacionado com a idade dos varrões ($P > 0,05$). Quanto a deposição do tipo de ácido graxo nos espermatozóides, sabe-se que a manutenção de uma relação balanceada $\omega 6:\omega 3$, na ração, evita a supressão do metabolismo de uma série ω por outra série.

O ácido eicosapentanóico ($20:5\omega 3$; EPA) não foi encontrado na composição de ácidos graxos dos espermatozóides, em nenhum dos tratamentos. Está ausência de EPA, embora o óleo de salmão tenha apresentado conteúdo alto de EPA, corrobora com os resultados reportados por Johnson et al. (1972), Paulenz et al. (1995 e 1999), sendo difícil de interpretar. Pode ser o resultado da existência da barreira hemato-testicular (Ganong, 1993), embora seja quase impossível está barreira impedir a passagem de um único ácido graxo. Outra explicação possível seria que o EPA é completamente metabolizável durante a maturação espermática na rede testicular.

Como não houve efeito na composição de ácidos graxos dos espermatozóides com relação à fonte de óleo de soja e ao nível de suplementação de vitamina E, avaliou-se o teor dos ácidos graxos DPA e DHA para os animais antes (semana 0) e após receberem a dieta com óleo de salmão na 1^a, 4^a, 7^a e 10^a semana (Figura 1).

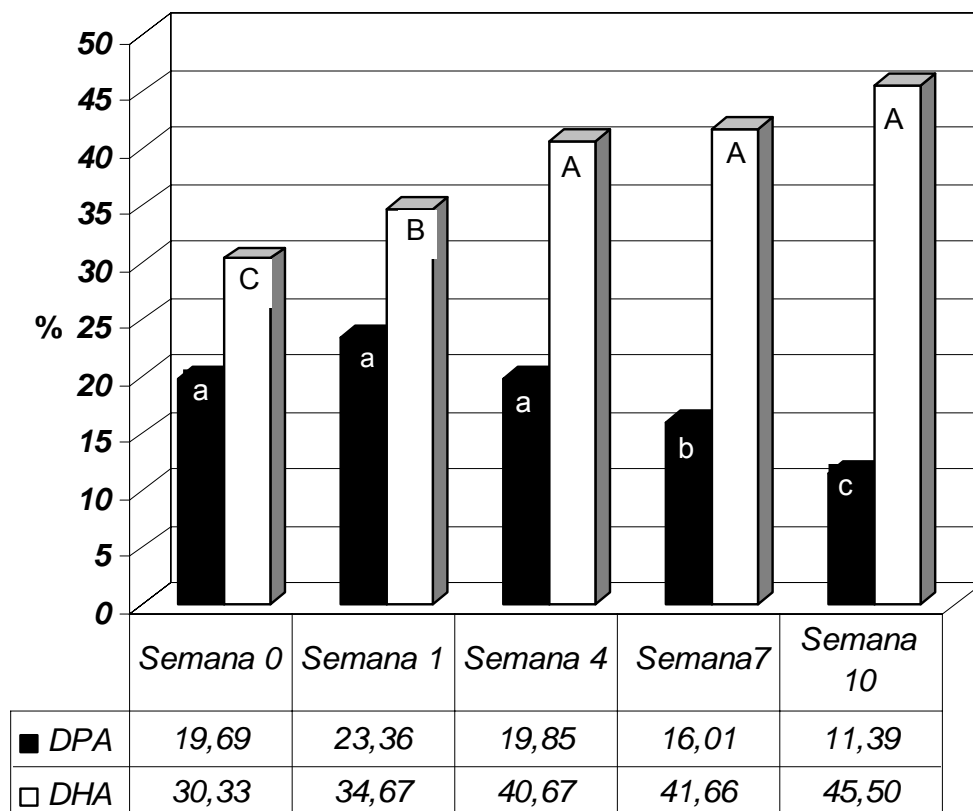


Figura 1 – Teor de ácidos graxos DPA e DHA (%) em espermatozóides de suínos antes (semana 0) e após suplementação com óleo de salmão na ração de suínos machos reprodutores. ^{a,b,c/A,B,C}P<0,05.

Foi avaliada a correlação do conteúdo de DHA e DPA na membrana dos espermatozóides de suínos suplementados com óleo de salmão, e verificou-se uma correlação negativa de $r = -0,83$. O que foi constatado na Figura 1, onde a redução ($P < 0,05$) no teor de DPA nos espermatozóides e aumento ($P < 0,05$) no teor de DHA. O teor de DHA aumentou ($P < 0,05$) nos espermatozóides tratados com óleo de salmão de 30,33 para 45,50%, ao contrário do DPA, que reduziu de 19,69 para 11,39% (Figura 1). Estes resultados corroboram aos reportados por Paulenz et al. (1995 e 1999; óleo de fígado de bacalhau), Cerolini et al. (2001; PROSPERM[®]), Rooke et al. (2001; óleo de atum), e Silva et al. (2005; PUFA e óleo de peixe) após suplementarem as dietas de varrões com fontes ricas de ácido graxo $\omega 3$.

De acordo com Rooke et al. (2001), mudanças na composição de ácidos graxos em resposta a suplementação na dieta com óleo de salmão, envolvendo principalmente a substituição de DPA por DHA na membrana espermática, provavelmente envolve mudanças nos ácidos graxos esterificados da posição 2 de ambos ácidos graxos ligados a éter e ésteres. Esta relação muito próxima entre DPA e DHA é constatada pela alta correlação inversa entre as proporções destes dois ácidos graxos ($P < 0,05$).

Teor de vitamina E nos espermatozóides

Não foi observado efeito ($P > 0,05$) da interação entre a fonte de óleo e níveis de vitamina E sobre o teor de vitamina E nos espermatozóides de suínos (Tabela 7).

Tabela 7 – Concentração de vitamina E nos espermatozóides de suínos suplementados com diferentes fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E

Fonte de óleo	Níveis de Vitamina E (mg/kg)				CV (%)
	150	300	450	Média	
TEOR DE VITAMINA E (ppm)					
Soja	7,50	8,75	10,50	8,92	
Salmão	6,25	8,00	11,50	8,58	
Média	6,87	8,37	11,00		57,50

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha/coluna diferiram pelo teste SNK ($P < 0,05$).

CONCLUSÃO

Apenas a adição de óleo de salmão na ração de suínos reprodutores promoveu alteração da composição de ácidos graxos da membrana espermática.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG e ao CNPq pelo suporte financeiro desta pesquisa. À Perdigão Agroindustrial S/A pelo apoio logístico, sem o qual este trabalho não seria realizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, R.J. A free radical theory of male infertility. *Reprod. Fertil. Dev.* 6:19-24, 1994.
- BLESBOIS, E., LESSIRE, M., GRASSEAU, I. et al. Effect of dietary fat on the fatty acid composition and fertilizing ability of fowl semen. *Biol. Reprod.* 56(5):1216-1220, 1997.
- BRUBACHER, G.; MULLER-MULOT, W.; SOUTHGATE, D.A.T. *Methods for the determination of vitamins in food – recommended by COST 91.* New York: Elsevier, 1985. p.97-106.
- CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI T.M. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction*, 121:395-401, 2001.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.* 2.ed. Belo Horizonte, MG:1998. 49p.(Manual).
- FERREIRA NETO, J.M.; VIANA, E.S.; MAGALHÃES, L.M. *Patologia clínica veterinária.* Belo Horizonte: Rabelo Brasil, 1977. 279p.
- FIRESTONE, D. *Official Methods and Recommended practices of the American Oil Chemists Society.* 5 ed. v. I-II (Método 1-62).Champaign: AOCS, 1998.
- FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. of Biol. Chem.* 226(1):497-509, 1957.
- GANONG, W.F. *Dinâmica do sangue e do fluxo linfático.* In: *Fisiologia Médica.* Rio de Janeiro. Prentice Hall do Brasil. 1993, p.408-420.
- HARTMAN, L.; LAGO, R.C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice, London*, 22:475-476, 1973.
- HULAN, H.W. et al. Omega-3 fatty acid levels and general performance of commercial broilers fed practical levels of redfish meal. *Poult. Sci.* 68(1):153-162, 1989.
- JOHNSON, L.A.; PURSEL, V.G.; GERRITS, R.J.; YOUNG, E.P. Total phospholipid and phospholipid fatty acids of ejaculated and epididymal semen and seminal vesicle fluid of boars. *J Anim Sci.* 35:398-403, 1972.

- JOHNSON, L.A.; GERRITS, R.J.; YOUNG, E.P. The fatty acid composition of porcine spermatozoa phospholipids. *Biol Reprod.* 1:330-334, 1969.
- KELSO, K.A., REDPATH, A., NOBLE, R.C., SPEAKE, B.K. Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bulls *Journal of Reproduction and Fertility* 109:1-6, 1997a.
- KELSO, K.A., CEROLINI S, SPEAKE, B.K., CAVALCHINI, L.G., NOBLE, R.C. Effects of dietary supplementation with α -linolenic acid on the phospholipid fatty acid composition and quality of spermatozoa in cockerel from 24 to 72 weeks of age *Journal of Reproduction and Fertility*, 110:53-59, 1997b.
- KING, G. J., MACPHERSON, J. W. A comparison of two methods for boar semen collection. *Journal of Animal Science, Chamapign*, 36(4):563-565, 1973.
- KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hyposmotic test. *Theriogenology*, 39:1279-1289, 1993.
- LEATHEM, J. H. Influencing factors. In: JOHNSON, A.D.; GOMES, W.R.; VANDEMARK, N.L. *The testis*. New York: Academic Press Inc., p. 183-190, 1970.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica*. 2ed. São Paulo: Editora Sarvier, 1995. 839p.
- MANN, T. Lipids and lipid-soluble substances. In: *The biochemistry of semen and of the male reproductive tract*. Great Britain: Butler & Tanner p.221-236. 1964.
- NATIONAL RESEACH COUNCIL – NRC. *Nutrient requeriments of swine*. 10ed. Washington: National Academy of Science, 1998. 189p.
- NIKOLOPOULOU, M.; SOUCEK, D.A.; VARY, J.C. Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. *Biochem Biophys Acta*, 815:486-498, 1985.
- NIKI, E.; NOGUCHI, N.; GOTOH, N. Dynamics of lipid peroxidation and its inhibition by antioxidants. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 21, p. 313-317, 1993.
- PAULENZ, H. TAUGBOL, O., KOMMISRUD, E., GREVLE, I.S. Effect of dietary supplementation with cod liver oil on cold shock and freezability of boar semen. *Reprod. Dom. Anim.* 34:431-435, 1999.

- PAULENZ, H. TAUGBOL, O., HOFMO, P.O., SAAREM, K. A preliminary study on the effect of dietary supplementation with cod liver oil on the polyunsaturated fatty acid composition of boar semen. *Veterinary Research Communications*, 19:273-284, 1995.
- PENNY, P.C.; NOBLE, R.C.; MALDJIAN, A.; CEROLINI, S. Potential role of lipids for the enhancement of boar fertility and fecundity. *Pig News Inform.* 25:119-126, 2000.
- POULOS, A.; SHARP, P.; JOHNSON, D.; WHITE, I.; FELLEBERG, A. The occurrence of polyenoic fatty acids with a greater than 11 carbon atoms in mammalian spermatozoa. *Biochem J* 240:891-895, 1986.
- POULOS, A.; DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. The phospholipid bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. *Comparative Biochemistry and Physiology* 46B:541-549, 1973.
- ROOKE, J.A., SHAO, C-C., SPEAKE, B.K. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. *Reproduction*, 121:315-322, 2001.
- RUTZ, F. Uso de antioxidantes em rações e subprodutos. In: CONFERÊNCIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1994, São Paulo. Anais ...São Paulo: Apinco, 1994. p. 73-84.
- SCOTT, J.W. Lipid metabolism of spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 18:65-76, 1973 (Suppl).
- SILVA, E.R., OLIVEIRA, S.L., FIALHO, E.T., RABELO, R.E. et al. Avaliação do efeito da alimentação de varrões com diferentes óleos na dieta sobre a capacidade de alteração do perfil de ácidos graxos no sêmen de varrões. II Congresso de pesquisa, ensino e extensão da UFG – II Conpeex. Anais eletrônicos...Goiânia, 3-7 de outubro, 2005.
- SPECTOR, A.A.; MOORE, S.A. Role of docosahexaenoic acid in the brain. In: Bjerke, K. et al. (eds), Seminar of the Scandinavian Forum of Lipid Research and Technology: Interconversion of Poly-unsaturated Fatty Acids, and their Functions in Membranes, Oslo. Lipid Forum, Bergen, Norway. P.S1. 1996.
- SPRECHER, H.; BAYKOUSCHEVA, S.P.; LUTHRIA, D.L.; MOHAMMED, B.S. Reevaluation of the pathway for the biosynthesis of 22:6n-3 and 22:5n-6 from dietary precursors. In: Proc Scientific Conference on

- Omega-3 Fatty Acids in Nutrition, Vascular Biology, and Medicine. American Heart Association, Houston, TX, pp 178-185, 1994.
- STRZEZEK, J.; FRASER, L.; KUKLINSKA, M.; DZIEKONSKA, A.; LECEWICZ, M. Effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on biochemical characteristics of boar sêmen. *Reproductive Biology*, 4(3):271-286, 2004.
- UEDA, T.; IGARASHI, O. Determination of vitamin E biological specimens and foods by HPLC - Pretreatment of samples and extraction of tocopherols. *J. Micronutr. Anal.* 7:79-96, 1990.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. Manual de utilização do programa SAEG (Sistema para Análise Estatística e Genéticas). Viçosa: UFV, 1997. 149p.
- VALENZUELA, A.B. Natural antioxidants: A new perspective for the problem of oxidative rancidity of lipids. In: *BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY*, 12, 1996, Nicholasville. Proceedings... Nicholasville: Alltech Technical Publications, 1996. p. 207-220.

FONTE DE ÓLEO E NÍVEIS DE SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA E NA RAÇÃO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E MORFOLÓGICAS DO SÊMEN *IN NATURA* DE SUÍNOS REPRODUTORES

(Oil sources and vitamin E in the diet on the physics and morphologic characteristics of raw boar semen)

Elenice Andrade Moraes e Amorim, Ciro Alexandre Alves Torres

Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG
36570-000, Brasil

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da adição de diferentes fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E na ração sobre as características do sêmen *in natura* de suínos reprodutores. Foram utilizados 24 suínos machos reprodutores Dalboard 85, com idades entre 12 e 18 meses, distribuídos num delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 X 3, com duas fontes de óleo (soja e salmão) e três níveis de antioxidantes (150, 300 e 450 mg de vitamina E/kg). O volume, motilidade espermática total, HOST, porcentagem de espermatozóides vivos e morfologia espermática não diferiram ($P>0,05$) entre os tratamentos. Houve efeito do óleo de salmão ($P<0,05$) sobre o vigor espermático. O nível de vitamina E adicionado na ração influenciou ($P<0,05$) a concentração espermática, no entanto, não foi observada diferença entre as fontes de óleo ($P>0,05$). Os animais tratados com óleo de salmão apresentaram menor ($P<0,05$) concentração de antioxidantes totais no sêmen que os animais tratados com óleo de soja. Efeito linear da vitamina E na concentração de antioxidantes totais foi observado ($P<0,05$). A fonte de óleo da ração influencia o vigor espermático e a concentração de antioxidantes totais no sêmen. A concentração espermática foi influenciada apenas pelo nível de vitamina E na ração.

Palavras-chaves: ácidos graxos, antioxidantes, sêmen, varrões

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the addition of oil sources and dietary vitamin E supplementation physics and morphologic characteristics of raw boar sperm. Twenty-four mature Dalboard 85 boars, of proven fertility and in routine semen production for artificial insemination, were randomly divided, in factorial arrangement 2 X 3, with two oil sources (soy and salmon) and three antioxidants levels (150, 300 and 450 vitamin E mg/kg). The volume, total motile sperm, HOST, percentage of live cells and morphology did not differ ($P < 0.05$) between the animals from treatments. The sperm vigor was affected by salmon oil ($P < 0.05$). The vitamin E level added to the diet changed ($P < 0.05$) the sperm concentration, however, no difference was observed between the oil sources ($P > 0.05$). Salmon oil treatment showed the smallest ($P < 0.05$) concentration of total antioxidants in the semen. Vitamin E and concentration of total antioxidant showed a linear effect ($P < 0.05$). The semen vigor and concentration of total antioxidants were affected by oil sources, but the sperm concentration was dependent on the levels of vitamin E.

Keywords: fatty acid, total antioxidant, semen, boars

INTRODUÇÃO

Na membrana das células, os ácidos graxos são elementos estruturais e compostos bioativos. Em muitas espécies, os fosfolipídios são os principais componentes lipídicos dos espermatozóides, caracterizados por conterem grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados. Em alguns mamíferos, o ácido docosahexanóico é o ácido graxo poliinsaturado dominante, embora, em outras espécies o ácido docosapentanóico é o principal componente da membrana espermática (Penny et al., 2001). Com relação à constituição da membrana celular, o aumento na proporção de poliinsaturados nos espermatozóides, durante sua fase de maturação no epidídimo, pode ter efeito pronunciado nas propriedades físicas e químicas da membrana. Desse modo, a inclusão de óleos na ração pode modificar o perfil de ácidos graxos dos espermatozóides e, conseqüentemente, melhorar a qualidade espermática (Scott, 1973). Os ácidos graxos poliinsaturados da

série ômega 3 (ω 3) predominam nos fosfolipídios das membranas celulares cuja permeabilidade e a flexibilidade deles dependem (Sirri et al. 1995).

Apesar dos efeitos benéficos dos ácidos graxos ω 3, a presença de altas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados dentro das frações lipídicas dos espermatozóides torna-os altamente susceptíveis à peroxidação com conseqüente risco de danos à estrutura celular (Niki et al., 1993). Portanto, há necessidade de um sistema antioxidante para protegê-los contra danos peroxidativos e uma possível disfunção dos espermatozóides (Cecil e Bakst, 1993; Aitken, 1994). Acredita-se que os danos causados pela peroxidação dos lipídeos dos espermatozóides seja a principal causa de sub-fertilidade dos machos (Hammerstedt, 1993). Assim, objetivou-se avaliar o efeito de diferentes fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E sobre as características do sêmen *in natura* de suínos reprodutores.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e período

O experimento foi conduzido de setembro de 2005 a janeiro de 2006, a 27°00'30" de latitude sul e 51°09'06" de longitude oeste, altitude média de 750 m, clima Cfa, segundo a classificação de Köppen-Geiger (verão quente) com temperatura média anual de 17 °C e precipitação pluviométrica média anual de 1.800 mm, nas dependências do Centro de Difusão Genética (CDG) da Perdigão Agroindustrial S/A (Videira/SC).

As análises do sêmen *in natura* foram realizadas no Laboratório do CDG.

Animais e manejo

Foram utilizados 24 suínos machos reprodutores Dalboard 85 de fertilidade conhecida, com idades entre 12 e 18 meses, alojados em baias individuais com água *ad libitum* e suplementação concentrada diária, segundo as exigências estabelecidas pelo NRC (1998).

Os animais foram distribuídos num delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 X 3, com duas fontes de óleo (soja e salmão) e três níveis de antioxidantes (150, 300 e 450 mg de vitamina E/kg

de ração), durante um período experimental de 10 semanas. Foram adicionados 3,5% de óleo, independente da fonte utilizada. A composição centesimal foi baseada nas exigências nutricionais do NRC (1998) que se encontra na Tabela 1, do capítulo 1.

Determinação de ácidos graxos e vitamina E

Nos óleos, rações e espermatozóides

A extração de lipídios, a identificação da composição de ácidos graxos e a quantificação do teor de vitamina E nos óleos e rações, bem como nos espermatozóides foram baseadas na metodologia descrita no capítulo 1.

Coleta e avaliação do sêmen in natura

Antes de cada coleta foi realizada a higienização externa do prepúcio com água e sabão neutro e a interna com solução fisiológica, para evitar possíveis contaminações do sêmen.

As amostras de sêmen foram coletadas, semanalmente (1 coleta/macho/semana), pelo método da mão enluvada (King e Macpherson, 1973), em sala apropriada com um manequim. O sêmen foi coletado em copo plástico de 700 mL contido em um copo térmico, com água previamente aquecida a 37 °C.

Imediatamente após a coleta do sêmen o ejaculado foi analisado quanto ao seu volume (mL), concentração espermática ($\times 10^6/\text{mL}$), motilidade espermática total, vigor espermático, porcentagem de espermatozóides vivos e mortos, morfologia espermática e teste hiposmótico, conforme normas do CBRA (1998).

Volume

O volume espermático foi determinado por meio da pesagem (1 mL do ejaculado pesa aproximadamente 1g) no copo coletor, sendo acoplado em sua extremidade uma gase (4 dobras) para a filtragem do ejaculado, separando o gel.

Concentração espermática

A concentração espermática foi determinada pelo aparelho espectrofotômetro SpermaCue[®] da MINITUB do Brasil Ltda, que utiliza um filtro de 570 nm para medir o grau de opacidade da amostra e também foi desenvolvido para determinar a densidade espermática dos ejaculados. Para a análise, 20 µL da amostra do sêmen foram retirada e colocada na micro-cuveta que possui a superfície interna revestida com um reagente seco, e a contagem realizada pelo número de células por unidade de volume estimado pela opacidade do ejaculado, a qual foi medido pela porcentagem de transmissão ou absorbância da amostra.

Motilidade espermática total

A avaliação da motilidade total dos espermatozóides foi expressa em porcentagem, e examinada em microscopia de contraste de fase em aumento de 200x, utilizando uma alíquota de 10 µL de sêmen, depositada entre lâmina e lamínula, ambas mantidas a 37 °C.

Vigor espermático

O vigor espermático, que é caracterizado pela intensidade da velocidade do movimento dos espermatozóides, foi avaliado em microscopia óptica de contraste de fase, em aumento de 200x. O vigor foi classificado de acordo com Ferreira Neto et al. (1977), variando de zero (0) a cinco (5), sendo o escore 0 equivalente à total imobilidade espermática e o escore 5, à movimentação intensa, vigorosa, progressiva e com formação de ondas.

Coloração eosina-nigrosina

A coloração foi realizada imediatamente após a coleta. Foram misturadas sete gotas de corante eosina-nigrosina com três gotas de sêmen *in natura* em um tubo pequeno (Murgas et al., 2001). O esfregaço foi feito em lâmina aquecida e examinado em microscópio de 400x para identificar os espermatozóides vivos (aparecendo sem coloração) e os mortos que absorveram o corante e se tornaram vermelhos, segundo metodologia de Barth e Oko (1989). Foram contadas 100 células espermáticas de cada amostra.

Morfologia espermática

Para a avaliação da morfologia espermática utilizou-se a técnica de preparação úmida. Alíquotas de 10 µL de sêmen foi adicionado em 1 mL de formol-salino tamponado e estocado à temperatura ambiente até análises. Foram contadas 100 células no microscópio óptico de contraste de fase no aumento de 1000x para a determinação do percentual de anormalidades espermáticas classificadas segundo CBRA (1998) dividindo as anormalidades em defeitos maiores e menores.

Teste hiposmótico (HOST)

A integridade da membrana plasmática foi avaliada no sêmen *in natura*, conforme a técnica da preparação úmida. Na solução à base de citrato de sódio e frutose (0,9 mL) com osmolaridade de 150 mOsmol/L (Vazquez et al., 1997) foi adicionado 10 µL de sêmen diluído, e incubado por 30 minutos, em banho-maria à 37 °C. Após esse período, alíquotas de 15 µL da mistura foram colocadas entre lâmina e lamínula, para a contagem de 100 células de cada solução em microscopia de contraste de fase com aumento de 400x. As células foram classificadas quanto à presença ou não da cauda enrolada, segundo descrito por Kumi-Diaka (1993).

Determinação da concentração de antioxidantes totais

A avaliação *in vitro* da concentração de antioxidantes totais (AOT) no sêmen foi feita em ejaculados de suínos na 1^a, 4^a, 7^a e 10^a semanas, utilizando kits apropriados (Randox Limited, Crumlin). O princípio da análise foi: ABTS Ò (2,2'-Azino-di-[3-etilbenzotiazolina sulfonato]) é incubado com a peroxidase (metamioglobina) e H₂O₂ para produzir o radical cátion ABTS^{®+}. Este radical representa uma coloração verde-azulada relativamente estável, mensurada em espectrofotômetro num comprimento de onda de 600 nm. A presença de antioxidantes na amostra produz uma supressão desta coloração, que é proporcional à AOT (Zanini, 2001b). Foram avaliadas 100 amostras, distribuídas entre os vários tratamentos.

Análises estatísticas

As análises dos parâmetros avaliados foram realizadas com utilização do programa SAEG (UFV, 1997). As variáveis foram submetidas aos testes de normalidade e homocedacidade. Posteriormente, foram submetidas à análise de variância dos dados e utilizadas o teste de Student Newman-Keuls (SNK) para comparação de médias entre as fontes de óleo, com nível de significância de 5% e análise de regressão para os níveis de antioxidantes usados. Quando houve interação foi determinado o efeito do nível de antioxidante dentro de cada fonte. As variáveis que não atenderam às premissas para a análise de variância, mesmo após as transformações, foram submetidas ao teste não paramétrico de Wilcoxon ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição dos ácidos graxos e vitamina E identificados nos óleos e rações experimentais

Os principais ácidos graxos identificados nos óleos e nas rações podem ser observados, respectivamente, nas Tabelas 2 e 3, e os valores de vitamina E analisados nos óleos e nas rações experimentais podem ser observados nas Tabelas 4 e 5, do capítulo 1.

Características seminais e concentração de antioxidantes totais do sêmen in natura

Os efeitos da suplementação da dieta com fontes de óleo e níveis de vitamina E sobre a qualidade do sêmen de suíno encontram-se nas tabelas 1 a 7, e os resultados relacionados com a concentração de antioxidantes totais (AOT) no sêmen são apresentados na Tabela 8. Os valores médios das características seminais observadas aproximam-se dos padrões de normalidade considerados para a espécie (CBRA, 1998).

Não foi observado efeito da fonte de óleo, dos níveis de vitamina E nem de sua interação sobre o volume do sêmen (Tabela 1), motilidade espermática total (Tabela 2), porcentagem de espermatozóides vivos (Tabela 3), porcentagem de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico (HOST; Tabela 4), e morfologia espermática anormal (Tabela 5) ($P > 0,05$). Zanini et al. (2001a e 2003a) testaram diferentes fontes de óleo na dieta de

galos, cuja membrana espermática é rica em ômega 6, e observou aumento no volume do sêmen dos galos suplementados na dieta com óleo de soja, não diferindo dos tratados com óleo de peixe.

Os resultados de motilidade espermática total, porcentagem de espermatozoides vivos e a morfologia anormal não corroboram com os de Maldjian et al. (2005), que verificaram o efeito da suplementação na ração de suínos com ácido docosahexanóico (DHA) *versus* outra sem DHA.

Tabela 1 – Fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E sobre o volume do sêmen *in natura* de espermatozoide de suínos

Fonte de óleo	Nível de Vitamina E (mg/kg)			Média	CV (%)
	150	300	450		
Volume de sêmen (mL)					
Soja	200,6	249,7	205,9	218,7	
Salmão	223,9	227,5	219,4	223,6	
Média	212,3	238,6	212,7		38,3

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha/coluna diferiram pelo teste SNK ($P < 0,05$).

Tabela 2 – Fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E sobre a motilidade espermática total do sêmen *in natura* de espermatozoide de suínos

Fonte de óleo	Nível de Vitamina E (mg/kg)			Médias	CV (%)
	150	300	450		
Motilidade espermática (%)					
Soja	83,7	85,0	85,1	84,6	
Salmão	85,0	84,4	85,2	84,9	
Média	84,4	84,7	85,2		3,63

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha/coluna diferiram pelo teste SNK ($P < 0,05$).

Foi avaliada a correlação da motilidade espermática da fonte de óleo de soja ($r=0,61$) e salmão ($r=0,53$) com o teor de DHA nos espermatozoides, sendo uma correlação não muito alta. Conquer et al. (2000), Gulaya et al. (1993) e Nissen and Kreysel (1983) reportaram que o teor de DHA nos espermatozoides humanos está correlacionado com a motilidade

espermática. Não se sabe como o DHA pode estar envolvido na regulação da motilidade espermática em humanos, talvez por estar envolvido na regulação de ácidos graxos livres utilizados pelo espermatozóide (Jones e Plymate, 1988; 1993) ou na metabolização de outros compostos lipídicos (Oliw e Sprecher, 1991). Mas está claro que as propriedades biofísicas do DHA contribuem na fluidez e flexibilidade da membrana necessária para a motilidade da cauda (Connor et al., 1998).

Tabela 3 – Fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E sobre a porcentagem de espermatozóides vivos no sêmen *in natura* de espermatozóide de suínos

Fonte de óleo	Nível de Vitamina E (mg/kg)			Média	CV (%)
	150	300	450		
Espermatozóides Vivos (%)					
Soja	85,3	86,1	85,7	85,7	
Salmão	85,8	85,9	85,7	85,8	
Média	85,5	86,0	85,7		2,26

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha/coluna diferiram pelo teste SNK ($P < 0,05$).

O HOST avalia a integridade funcional da membrana plasmática (baseado nas propriedades osmóticas da membrana plasmática), enquanto que o teste de coloração mostra a integridade estrutural da membrana espermática (baseado na impermeabilidade de grandes moléculas de corantes). Espermatozóides vivos podem ter uma membrana não funcional, incapaz de reagir (dobramento da cauda) ainda que suas estruturas estejam intactas. Por isso, o HOST pode ser um teste mais sensível que com o teste de coloração. Em ambas as fontes de óleo adicionadas às rações, os espermatozóides foram altamente reativos ao teste hiposmótico, mostrando que não há perda da funcionalidade na membrana plasmática com o uso destes óleos na ração (Tabela 4).

Os valores registrados para o HOST (Tabela 4) corroboram com os de Vazquez et al. (1997) que adaptaram o HOST para espermatozóides de suínos, e reportaram ser este um teste de alta sensibilidade e repetibilidade para avaliar a integridade funcional da membrana plasmática de suínos.

Segundo Pérez-Llano et al. (2001) valores de HOST abaixo de 60% aumenta a probabilidade de ocorrer baixas taxas de fecundação, pois apresenta moderada, mas correlação positiva com a taxa de gestação.

Tabela 4 – Fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E sobre a porcentagem de espermatozóides reativos ao HOST no sêmen *in natura* de espermatozóide de suínos

Fonte de óleo	Nível de Vitamina E (mg/kg)			Média	CV (%)
	150	300	450		
	HOST (%)				
Soja	82,8	86,0	83,9	84,2	
Salmão	83,5	86,2	88,8	86,2	
Média	83,2	86,1	86,4		14,4

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha/coluna diferiram pelo teste SNK ($P < 0,05$).

Para vitaminas lipossolúveis, a vitamina E pode estar envolvida na proteção direta das células espermáticas de danos morfológicos (Brzezinska-Slebozinska et al., 1995). De fato, a morfologia e a motilidade espermática total dos espermatozóides podem ser preservados por meio da ligação destas vitaminas a endoperóxidos (Marin-Guzman et al., 1997; 2000). A porcentagem máxima de anomalias espermáticas em espermatozóides de reprodutores suínos é de 20% (CBRA, 1998), portanto, a adição de óleo de soja e salmão na ração não afetou a qualidade do sêmen a ponto de promover indiretamente redução nas taxas de fertilidade.

Nenhum efeito foi observado da fonte de óleo e dos níveis de vitamina E sobre a morfologia espermática (defeitos maiores e menores) ($P > 0,05$; Tabela 5).

Tabela 5 – Fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E sobre a morfologia anormal no sêmen *in natura* de espermatozóide de suínos

Fonte de óleo	Nível de Vitamina E (mg/kg)				CV (%)
	150	300	450	Média	
Defeitos maiores (%)					
Soja	2,56	2,50	2,62	2,56	
Salmão	2,62	2,56	2,87	2,68	
Média	2,59	2,53	2,75		15,0
Defeitos menores (%)					
Soja	1,87	1,81	1,06	1,58	
Salmão	1,87	1,12	1,00	1,33	
Média	1,87	1,46	1,03		8,4

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha/coluna diferiram pelo teste SNK ($P < 0,05$).

Foi observado efeito apenas da fonte de óleo ($P < 0,05$) sobre o vigor espermático (Tabela 6). sendo maior ($P < 0,05$) no sêmen dos animais suplementados com óleo de salmão na ração do que nos tratados com óleo de soja.

Tabela 6 – Fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E sobre o vigor espermático no sêmen *in natura* de espermatozóide de suínos

Fonte de óleo	Nível de Vitamina E (mg/kg)				CV (%)
	150	300	450	Média	
Vigor espermático					
Soja	3,92	3,70	4,00	3,87 ^b	
Salmão	4,00	4,00	4,07	4,02 ^a	
Média	3,96	3,85	4,04		8,75

^{a,b}Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha/coluna diferiram pelo teste SNK ($P < 0,05$).

Houve efeito ($P < 0,05$) do nível de vitamina E adicionado na ração sobre a concentração espermática (Tabela 7), no entanto, não foi observada diferença entre as fontes de óleo suplementadas na dieta ($P > 0,05$). As

maiores concentrações observadas foram quando se utilizou-se nos óleos os níveis de 150 e 450 mg de vitamina E/kg de ração (Tabela 7). Em suínos, o efeito de micronutrientes sobre o desempenho reprodutivo não está esclarecido. Entretanto, os resultados registrados neste estudo corrobora com os de Marin-Guzman et al. (1997) que observaram melhora na qualidade espermática após a suplementação da dieta de suínos com selênio e vitamina E. Também Brzezinska-Slebodzinska et al. (1995) observaram aumento da concentração espermática no sêmen de suíno suplementados com vitamina E, este foi um efeito possivelmente ligado as propriedades antioxidantes da vitamina E.

Vale ressaltar que, a vitamina E é lipossolúvel e absorvida no intestino delgado juntamente com os lipídios da dieta e outras vitaminas lipossolúveis. E a princípio, ela tem o papel de proteção do epitélio germinativo dos testículos contra uma degeneração, entretanto, a suplementação desta vitamina pode ocasionar na redução de reservas de outras vitaminas lipossolúveis, por reduzir sua absorção e, conseqüentemente prejudicar o desempenho reprodutivo animal (Zanini, 2001).

Tabela 7 – Fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E sobre a concentração espermática no sêmen *in natura* de espermatozóide de suínos

Fonte de óleo	Nível de Vitamina E (mg/kg)				CV (%)
	150	300	450	Média	
Concentração espermática (x10 ⁶ células/mL)					
Soja	424,6 ^a	401,5 ^a	439,2 ^a	421,7	
Salmão	468,3 ^a	393,1 ^a	457,3 ^a	439,6	
Média	446,5 ^A	397,3 ^B	448,2 ^A		21,04

^{a,A,B}Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha/coluna diferiram pelo teste SNK (P<0,05).

Não houve efeito da fonte de óleo, mas verificou-se efeito da suplementação da vitamina E, que talvez possa ter dado a proteção antioxidante aos espermatozóides de ambos os tratamentos. Os resultados verificados corrobora aos de Maldjian et al. (2005) reportaram aumento da concentração espermática do sêmen cujos animais foram suplementados

com DHA na ração, sem qualquer adição extra de antioxidante, quando comparado com o sêmen dos animais que não receberam suplementação.

As características do sêmen, observadas neste estudo são satisfatórias, visto que, coincidem com os resultados reportados por Owsiany et al. (1998) e considerados normais para suínos adultos.

Com relação à concentração de antioxidantes totais (AOT) no sêmen foi constatado efeito das fontes de óleo e dos níveis de vitamina E ($P < 0,05$; Tabela 8). Após o desdobramento da interação, constatou-se que não houve diferença dos contrastes observados dentro da interação ($P > 0,05$).

Os animais suplementados com óleo de salmão apresentaram menor ($P < 0,05$) concentração de antioxidantes totais no sêmen que os animais tratados com óleo de soja (Tabela 8). Os resultados corroboram com os registrados por Zanini (2003b) trabalhando com diferentes fontes de óleo na dieta de galos, onde constatou que o uso de ração com óleo de peixe apresentou menor AOT no sêmen.

Tabela 8 – Fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E sobre a concentração de antioxidantes totais (AOT) no sêmen *in natura* de espermatozóide de suínos

Fonte de óleo	Nível de Vitamina E (mg/kg)				CV (%)
	150	300	450	Média	
Concentração de antioxidantes totais (mmol/l)					
Soja	21,66	21,79	22,24	21,89 ^a	
Salmão	21,18	21,14	21,12	21,14 ^b	
Média ¹	21,42 ^B	21,46 ^B	21,68 ^A		11,54

^{a, b/A, B} Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha/coluna diferiram pelo teste SNK ($P < 0,05$).

¹Efeito linear ($P < 0,05$).

O fornecimento de diferentes fontes de óleo vegetal e animal mostraram diferenças na AOT no sêmen. Óleos de origem animais, como óleo de peixe, contêm elevado teor de PUFA's e baixo teor de vitamina E (tocoferol), e isto faz com que seja mais difícil a conservação deste óleo mesmo em condições de refrigeração (Araújo, 1999).

Bell et al. (1993) reportaram existir uma correlação negativa entre a motilidade espermática total e peroxidação lipídica. Foi verificada uma correlação negativa da motilidade com AOT nos espermatozóides para a fonte de óleo de soja ($r=-0,39$) e salmão ($r=-0,45$). Isto demonstra que realmente os espermatozóides dos animais tratados com óleo de salmão, por serem ricos em PUFA e mais susceptíveis a peroxidação, apresentaram maior grau de peroxidação, conseqüentemente menor AOT (Tabela 8).

Maldjian et al. (2005) reportaram que nenhuma melhora na qualidade dos parâmetros analisados dos espermatozóides de sêmen *in natura* havia sido observada após a suplementação com óleo de peixe na ração de suínos, sem qualquer adição extra de antioxidantes. Contudo, observaram-se resultados significativos do sêmen *in natura* e com isso pode-se aferir que parece existir um sinergismo entre antioxidantes e óleos de origem animal quando são adicionados na ração, e que por isso, significantes melhorias da qualidade dos espermatozóides no sêmen *in natura* tem sido reportadas (Maldjian et al., 2003; Speake et al., 2003).

Desta forma, embora os efeitos não tenham sido muito expressivos na qualidade do sêmen *in natura*, o fornecimento de óleo de salmão na ração de suínos reprodutores promoveu o aumento do teor de DHA na membrana espermática dos espermatozóides do sêmen *in natura* (Tabela 6, capítulo 1). Portanto, as membranas plasmáticas dos espermatozóides dos animais suplementados com óleo de salmão, devido ao aumento do teor de DHA, precisam de maior proteção antioxidante em virtude da relação entre AOT e DHA. Apesar disso, as concentrações de antioxidante suplementadas nas rações protegeram os espermatozóides ricos em DHA, visto que a motilidade dos mesmos não reduziu comparada às dos animais tratados com óleo de soja (Tabela 2). A motilidade espermática de suínos reduz quando os animais são inadequadamente suplementados na dieta com vitamina E e selênio (Marin-Guzman et al., 1997).

CONCLUSÃO

A adição de óleo de salmão na ração de suínos reprodutores não alterou os parâmetros físicos e morfológicos do sêmen *in natura*, com exceção do vigor.

Os níveis de vitamina E de 150 e 450 mg/kg de ração aumentou a concentração espermática.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG e ao CNPq pelo suporte financeiro dado a esta pesquisa. À Perdigão Agroindustrial S/A pelo apoio logístico, sem o qual este trabalho não seria realizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, R.J. A free radical theory of male infertility. *Reprod. Fertil. Dev.* 6:19-24, 1994.
- ARAÚJO, J.M.A. Química dos alimentos: teoria e prática. 2 ed. Viçosa: UFV, 1999. 416p.
- BARTH, A.D.; OKO, R.J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames, IA: Iowa University Press, 1989. 285p.
- BELL, M.; WANG, R.; HELLSTROM, W.J.G.; SIKKA, S.C. Effect of cryoprotective additives and cryopreservation protocol on sperm membrane lipid peroxidation and recovery of motile human sperm *Journal of Andrology* 14:472–478, 1993.
- BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; SLEBODZINSKI, A.B.; PIETRAS, B.; WIECZOREK, G. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biol. Trace Elem. Res.* 47:69-74, 1995.
- CECIL, H.C.; BAKST, M.R. *In vitro* lipid peroxidation of turkey spermatozoa. *Poult. Sci.* 72:1370-1378, 1993.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte, MG:1998. 49p.(Manual).
- CONQUER, J.A.; MARTIN, J.B.; TUMMON, I.; WATSON, L.; TEKPETEY, F. Effect of DHA supplementation on DHA status and sperm motility in asthenozoospermic males. *Lipids*, 35(2):149-154, 2000.
- CONNOR, W.E.; LIN, D.S.; WOLF, D.P.; ALEXANDER, M. Uneven Distribution of Desmosterol and Docosahexaenoic Acid in the Heads and Tails of Monkey Sperm, *J. Lipid Res.* 39, 1404–1411, 1998.

- FERREIRA NETO, J.M.; VIANA, E.S.; MAGALHÃES, L.M. Patologia clínica veterinária. Belo Horizonte: Rabelo Brasil, 1977. 279p.
- GULAYA, N.M.; TRONKO, M.D.; VOLKOV, G.L.; MARGITICH, M. Lipid composition and fertile ability of human ejaculate, Ukr. J. Biochem. 65:64-70, 1993.
- HAMMERSTEDT, R. H. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of the effect on design of storage preservation systems. *Reprod. Fertil. Dev.* 5:675-690, 1993.
- JONES, R.E.; PLUMATE, S.R. Synthesis of docosahexaenoyl coenzyme A in human spermatozoa. *J. Androl.* 14:428-432, 1993.
- JONES, R.E.; PLYMATE, S.R. Evidence for the regulation of fatty acid utilization in human sperm by docosahexaenoic acid. *Biol. Reprod.* 39:76-80, 1988.
- KING, G. J., MACPHERSON, J. W. A comparison of two methods for boar semen collection. *Journal of Animal Science*, Chamapign, 36(4):563-565, 1973.
- KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hyposmotic test. *Theriogenology*, 39:1279-1289, 1993.
- MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T.; CEROLINI, S.; PENNY, P.; NOBLE, R.C. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology* 63:411-421, 2005.
- MALDJIAN, A.; PENNY, P.; NOBLE, R.C. Docosahexaenoic acid-rich marine oils and improved reproductive efficiency in pigs. In: De Vriese SR, Christophe AB., editors. *Male fertility and lipid metabolism*. Champaign, Illinois: AOCS Press; 2003. p. 60–72.
- MARIN-GUZMAN, J.; MAHAN, D.C.; WHITMOYER, R. Effects of dietary selenium and vitamin E on the ultrastructure and ATP concentration of boar spermatozoa, and the efficacy of added sodium selenite in extended semen on sperm motility. *J. Anim. Sci.* 78:1544-1550, 2000.
- MARIN-GUZMAN, J.; MAHAN, D.C.; CHUNG, Y.K.; PATE, J.L.; POPE, W.F. Effects of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissue responses, semen quality and subsequent fertilization rates in mature gilts. *J. Anim. Sci.* 75:2994-3003, 1997.

- MURGAS, L.D.S.; FIALHO, E.T.; OLIVEIRA, A.I.F.; LIMA, J.A.F. Desempenho reprodutivo de varrões híbridos alimentados com óleo de soja como fontes de ácidos graxos. *Ciências Agrotécnicas*, 25(6):1423-1434, nov/dez, 2001.
- NATIONAL RESEACH COUNCIL – NRC. Nutrient requeriments of swine. 10ed. Washington: National Academy of Science, 1998. 189p.
- NISSEN, H.P.; KREYSEL, H.W. Polyunsaturated fatty acids in relation to sperm motility. *Andrologia* 15(3):264-269, 1983.
- NIKI, E.; NOGUCHI, N.; GOTOH, N. Dynamics of lipid peroxidation and its inhibition by antioxidants. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 21, p. 313-317, 1993.
- OLIW, E.H.; SPRECHER, H.W. Metabolism of polyunsaturated (n-3) fatty acids by monkey seminal vesicles: Isolation and biosynthesis of n-3 epoxides. *Biochim. Biophys. Acta* 1086:287-294, 1991.
- OWSIANNY, J.; KAWECKA, M.; CZARNECKI, R.; ROZYCKI, R. Relation between the size of testes and the quantitative parameters of the semen of young boars. *Pig News and Information*, 19(2):57-60, 1998.
- PAULENZ, H.; TAUGBOL, O.; KOMMISRUUD, E.; GREVLE, I.S. Effect of dietary supplementation with cod liver oil on cold shock and freezability of boar semen. *Reprod. Dom. Anim.* 34;431-435, 1999.
- PÉREZ-LLANO, B.; LORENZO, J.L.; YENES, P.; TREJO, A.; GARCIA-CASADO, P. A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology* 56:387-398, 2001.
- SCOTT, J.W. Lipid metabolism of spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 18:65-76, 1973 (Suppl).
- SIRRI, F. et al. Fatty acid composition of lipid in eggs laid by hens fed diets supplemented with different fats. In: *European Symposium on Quality off Egg and Egg Products*, 6, 1995. *Proccedings...Zaragoza*. Zaragoza: Ricardo Cepero Briz, 1995, p. 411-500.
- SPEAKE, B.K.; SURAI, P.F.; ROOKE, J.A. Regulation of avian and mammalian sperm production by dietary manipulation. In: *De Vriese SR, Christophe AB., editors. Male fertility and lipid metabolism*. Champaign, Illinois: AOCS Press; 2003. p. 96–117.
- SURAI, P.F. et al. Effect of vitamin E and selenium supplementation of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation

- susceptibility in sperm, testes and liver. *Biol. Trace Elem. Res.* 64(1-3):119-132, 1998.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. Manual de utilização do programa SAEG (Sistema para Análise Estatística e Genéticas). Viçosa: UFV, 1997. 149p.
- VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; GARCIA-ARTIGA, C.; ROCA, J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology* 47:913-922, 1997.
- ZANINI, S.F.; TORRES, C.A.A.; BRAGAGNOLO, N.; TURATTI, J.M.; SILVA, M.G.; ZANINI, M.S. Fontes de óleos e níveis de vitamina E e sobre desempenho produtivo e reprodutivo de galos. *Revista Brasileira de Ciências Avícola*, Suplemento 5, p.71, 2003a.
- ZANINI, S.F.; TORRES, C.A.A.; NEURA, B.; TURATTI, J.M.; SILVA, M.G.; ZANINI, M.S. Evaluation of the ratio of w6:w3 fatty acids and vitamin E levels in the diet on the reproductive performance of cockerels. *Arch. Tierernahr*, 57(6):429-442, 2003b.
- ZANINI, S.F. Fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E na ração sobre o desempenho produtivo e reprodutivo de galos leves. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa. 139p. 2001.

FONTES DE ÓLEO E NÍVEIS DE SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA E NA RAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN SUÍNOS ACONDICIONADOS A 17 E 5 °C

(Oil sources and vitamin E in the diet on the boar semen quality preserved at 17 and 5 °C)

Elenice Andrade Moraes e Amorim, Ciro Alexandre Alves Torres

Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG

36570-000, Brasil

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da adição de fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E na ração sobre as características do sêmen suíno resfriado a 17 e 5 °C. Foram utilizados 24 suínos machos reprodutores Dalboard 85, com idades entre 12 e 18 meses, distribuídos num delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 X 3, com duas fontes de óleo (soja e salmão) e três níveis de antioxidantes (150, 300 e 450 mg de vitamina E/kg). A motilidade e o HOST dos espermatozóides dos animais tratados com óleo de salmão a 17 e 5 °C foi superior ($P < 0,05$) aos tratados com óleo de soja, após 24, 48 e 72 horas. O tratamento com óleo de salmão aumentou ($P < 0,05$) o vigor espermático em ambas as temperaturas avaliadas após 24 e 48 horas. A motilidade, vigor e HOST a 17 e 5 °C diferiram ($P < 0,05$) em relação ao período em que foram acondicionados, onde os valores de 24 horas foi superior aos de 48 horas, e estes superior aos de 72 horas. A morfologia anormal total aumentou ($P < 0,05$) no sêmen dos animais tratados com óleo de soja e resfriados a 17 °C, enquanto que o sêmen a 5 °C não apresentou diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos. A morfologia espermática anormal foi maior ($P < 0,05$) no sêmen a 5 °C que a 17 °C, após 24, 48 e 72 horas. O sêmen a 5 °C apresentou parâmetros de viabilidade (motilidade, morfologia e HOST) inferior ($P < 0,05$) ao sêmen a 17 °C. A fonte de óleo de salmão melhorou as características espermáticas avaliadas do sêmen suíno resfriado a 17 e 5 °C durante o período de acondicionamento de 24 a 48 horas.

Palavras-chaves: ácidos graxos, espermatozóides, motilidade, óleo de salmão, resfriamento, varrões

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the addition of oil sources and dietary supplementation of the vitamin E on boar sperm characteristics cooled at 17 and 5 °C. Twenty-four mature Dalboard 85 boars, of proven fertility and in routine semen production for artificial insemination, were randomly divided, in factorial arrangement 2 X 3, with two oil sources (soy and salmon) and three levels of antioxidants (150, 300 and 450 vitamin E mg/kg). The motility and HOST of the animals sperm treated with salmon oil at 17 and 5°C was superior ($P<0.05$) that animals treated with soy oil, after 24, 48 and 72 hours. The treatment with salmon oil increased ($P<0.05$) the sperm vigor in both temperatures evaluated after 24 and 48 hours. The motility, vigor and HOST of sperm at 17 and 5 °C differed ($P<0.05$) during the period which were preserved, where the values of 24 hours was superior 48 hours and their were superior 72 hours. The total abnormal morphology increased ($P<0.05$) in the semen of the animals treated with soy oil and cooled at 17 °C mean while the semen at 5 °C did not show any difference ($P>0.05$) among the animals from the treatments. The abnormal morphology was bigger ($P<0.05$) in the semen at 5 °C that at 17 °C, after 24, 48 and 72 hours. The semen at 5 °C showed decreased viability parameters (motility, morphology and Host) ($P<0.05$) than the semen at 17 °C. The salmon oil source improved the sperm characteristics of the boar semen cooled at 17 and 5 °C during the 24 and 48 hours of preservation time.

Keywords: fatty acid, sperm, motility, salmon oil, cooling, boars

INTRODUÇÃO

A membrana espermática apresenta uma composição mista de fosfolipídios que pode diferir de espécie para espécie, além da temperatura de transição de fase ser variável para cada tipo de fosfolipídio (Buhr et al., 1994). Durante o resfriamento, a separação lateral de fases pode ocorrer e as proteínas ficam agrupadas e excluídas dos arranjos hexagonais dos

lipídios gelificados, permanecendo em locais onde há lipídios ainda em estado fluído. Em função da separação de fases, há aumento da permeabilidade da membrana com perda de cátions e enzimas, redução da atividade enzimática e perturbações nos processos de difusão controlados pela membrana (De Leeuw et al., 1991). Além disso, durante o resfriamento, o desequilíbrio iônico intra e extracelular pode reduzir a motilidade espermática (Watson, 1996).

A temperatura de armazenamento do sêmen suíno, entre 15 e 18 °C, não interrompe totalmente o metabolismo dos espermatozoides, que continuam produzindo metabólitos, os quais se acumulam e interferem na motilidade espermática. Além disso, essa temperatura não impede a multiplicação bacteriana, a qual pode afetar a qualidade do sêmen (Weitze, 1990). Teoricamente, quanto mais baixa a temperatura de armazenamento, menor será o metabolismo e maior poderá ser o tempo de armazenamento do sêmen. O armazenamento do sêmen suíno em temperaturas próximas a 5 °C seria uma vantagem, visto que, o mesmo poderia permanecer estocado em refrigeradores domésticos (Landsverk, 2000), de conveniência para a maioria dos produtores. No entanto, o espermatozóide suíno é sensível a temperaturas inferiores a 15 °C, abaixo da qual há significativa redução da motilidade (De Leeuw et al., 1990). Sabe-se que na faixa de temperatura de 25 a 5 °C, ocorre a redução da fluidez dos lipídios da membrana do espermatozóide suíno, o que poderia explicar sua maior sensibilidade ao resfriamento (Buhr et al., 1994).

Weber (1989), ao estudar o armazenamento do sêmen suíno a 5 °C, verificou que a colocação direta a 5 °C causa queda brusca da motilidade e do percentual de acrossomas normais. Em outros estudos desenvolvidos para viabilizar o acondicionamento do sêmen suíno em temperaturas inferiores a 15°C foi evidenciado que os efeitos relacionados ao choque térmico foram amenizados quando o sêmen permanecia por certo período incubado em temperaturas acima de 15 °C (Pursel et al., 1972; Tamuli e Watson, 1994). Além disto, foi verificado que o resfriamento gradual resulta em maior viabilidade espermática que o resfriamento direto (Weitze et al., 2000). Assim, objetivou-se avaliar o efeito de fontes de óleo e níveis de

suplementação de vitamina E sobre as características do sêmen resfriado a 17 e 5 °C após 24, 48 e 72 horas de acondicionamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e período

O experimento foi conduzido de setembro de 2005 a janeiro de 2008, a 27°00'30" de latitude sul e 51°09'06" de longitude oeste, altitude média de 750 m, clima Cfa, segundo a classificação de Köppen-Geiger (verão quente) com temperatura média anual de 17 °C e precipitação pluviométrica média anual de 1.800 mm, nas dependências do Centro de Difusão Genética da Perdigão Agroindustrial S/A (Videira/SC).

As análises de motilidade espermática total e o vigor espermático foram realizados no Laboratório do CDG. Demais análises (teste hiposmótico e morfologia anormal espermática) foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa.

Animais e manejo

Foram utilizados 24 suínos machos reprodutores Dalboard 85, com idades entre 12 e 18 meses, alojados em baias individuais com água *ad libitum* e suplementação concentrada diária, segundo exigências estabelecidas pelo NRC (1998).

Os animais foram distribuídos num delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 X 3, com duas fontes de óleo (soja e salmão) e três níveis de antioxidantes (150, 300 e 450 mg de vitamina E/kg de ração), por um período experimental de 10 semanas. Foram adicionados 3,5% de óleo, independente da fonte utilizada. A composição centesimal foi baseada nas exigências nutricionais do NRC (1998) que se encontra na Tabela 1, do capítulo 1.

Determinação de lipídios e vitamina E

Nos óleos, rações e espermatozoides

A extração de lipídios, a determinação da composição de ácidos graxos e a quantificação do teor de vitamina E nos óleos e rações, bem

como nos espermatozóides foram baseadas na metodologia descrita no capítulo 1.

Coleta do sêmen

Antes de cada coleta foi realizada a higienização externa do prepúcio com água e sabão neutro, e interna com solução fisiológica, para evitar possíveis contaminações do sêmen.

As amostras de sêmen foram coletadas, semanalmente (1 coleta/macho/semana, pelo método da mão enluvada (King e Macpherson, 1973), em sala apropriada com um manequim. O sêmen foi coletado em copo plástico de 700 mL contido em um copo térmico, com água previamente aquecida a 37 °C.

Avaliação e processamento do sêmen

Imediatamente após a coleta do sêmen o ejaculado foi analisado quanto ao seu volume (mL), concentração espermática ($\times 10^6/\text{mL}$), motilidade, vigor, porcentagem de espermatozóides vivos e mortos, morfologia e teste hiposmótico, conforme normas do CBRA (1998), e descrito no capítulo 2.

Diluição e envase do sêmen

Antes da coleta do sêmen o diluente *Beltsville Thawing Solution* (BTS) foi mantido à temperatura de 37 °C. Depois da coleta e avaliação do sêmen, o ejaculado foi diluído com BTS, com 3 bilhões de espermatozóides totais em 100 mL, sendo envasado em garrafas plásticas, rotineiramente utilizadas na inseminação artificial e fechadas com tampas de plástico. Logo após o processo da diluição e envase, Três garrafas (doses) de cada tratamentos foram acondicionadas em duas diferentes temperaturas: 17 °C (câmara fria) e 5 °C (geladeira de 280 L), sem ter sido realizado anteriormente uma curva de resfriamento para o sêmen mantido a 5 °C.

Após o armazenamento, a cada intervalo de 24 horas, num total de 72 horas, uma garrafa plástica de cada tratamento era retirada e desta uma amostra de 2 mL foi retirada e transferida para um tubo de ensaio previamente aquecido e mantido em banho-maria a 37 °C por 10 minutos,

antes de sua avaliação (motilidade, vigor, morfologia e submetido ao teste hiposmótico).

Avaliação do sêmen resfriado

Motilidade espermática total, vigor espermático e a morfologia espermática

As avaliações dessas variáveis foram realizadas conforme descrito no capítulo 2.

Teste hiposmótico

A integridade da membrana plasmática foi avaliada no sêmen diluído resfriado, conforme a técnica da preparação úmida. Na solução à base de citrato de sódio e frutose (0,9 mL) com osmolaridade de 150 mOsmol/L (Vazquez et al., 1997) foi adicionado 10 µL de sêmen diluído, e incubado por 30 minutos, em banho-maria à 37 °C. Após esse período, alíquotas de 15 µL da mistura foram colocadas entre lâmina e lamínula, para a contagem de 100 células de cada solução em microscopia de contraste de fase com aumento de 400x. As células foram classificadas quanto à presença ou não da cauda enrolada, segundo descrito por Kumi-Diaka (1993).

Análises estatísticas

As análises dos parâmetros avaliados foram realizadas com utilização do programa SAEG (UFV, 1997). As variáveis foram submetidas aos testes de normalidade e homocedacidade. Posteriormente, foram submetidas à análise de variância dos dados e utilizadas o teste de Student Newman-Keuls (SNK) para comparação de médias entre as fontes de óleo, com nível de significância de 5% e análise de regressão para os níveis de antioxidantes usados. Quando houve interação foi determinado o efeito do nível de antioxidante dentro de cada fonte.

As variáveis que não atenderam às premissas para a análise de variância, mesmo após as transformações, foram submetidas ao teste não paramétrico de Wilcoxon.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição dos ácidos graxos e vitamina E identificados nos óleos, rações e espermatozóides do sêmen in natura

Os principais ácidos graxos identificados nos óleos, nas rações e espermatozóides são mostrados, respectivamente, nas Tabelas 2, 3 e 6, do capítulo 1.

Os valores de vitamina E analisados nos óleos, nas rações e nos espermatozóides podem ser observados nas Tabelas 4, 5 e 7, respectivamente, do capítulo 1.

Características do sêmen in natura

As características físico-morfológicas espermáticas, como motilidade, vigor, morfologia, HOST e a porcentagem de espermatozóides vivos realizados no sêmen *in natura* foram mostrados e discutidos no capítulo 2.

Características seminais do sêmen suíno acondicionado a 17 e 5 °C

Os efeitos da suplementação da dieta com fontes de óleo e níveis de vitamina E sobre a qualidade do sêmen suíno resfriado encontram-se nas tabelas 1, 2, 3 e 4. Os valores médios das características observadas neste estudo aproximam-se dos padrões de normalidade considerados para a espécie (CBRA, 1998).

No presente estudo observou-se que o acondicionamento do sêmen a 17 e 5 °C reduziu ($P < 0,05$) a qualidade espermática do sêmen suíno, independente do tratamento, quando comparado com os resultados do sêmen *in natura* (capítulo 2).

O uso de sêmen suíno resfriado a 17 °C é rotina na suinocultura, mas não é o resfriamento a 5 °C, em geral, limitado por estar associado a menor fertilidade e prolificidade devido à redução da motilidade e perda da integridade da membrana após o acondicionamento (De Leeuw et al., 1990), além de perdas de funções celulares, ligadas a motilidade (Watson e Green, 2000). Por isso, avaliou-se os efeitos das fontes de óleo adicionadas nas rações sobre a motilidade (Tabela 1), vigor (Tabela 2), HOST (Tabela 3) e morfologia anormal total (Tabela 4) do sêmen resfriado a 17 e 5 °C após 24, 48 e 72 horas de acondicionamento.

Neste estudo, não foi observado efeito ($P>0,05$) do nível de vitamina E e de sua interação com a fonte de óleo.

Tabela 1 – Fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E sobre a motilidade espermática (%) do sêmen acondicionado a 17 e 5 °C

Fonte de óleo	Nível de Vitamina E (mg/kg)				CV (%)
	150	300	450	Média	
Motilidade a 17 °C após 24 horas					
Soja	72,2	70,2	72,7	71,7 ^b	
Salmão	74,2	74,4	76,0	74,8 ^a	
Média	73,2	72,3	74,4		11,2
Motilidade a 5 °C após 24 horas					
Soja	65,2	63,2	65,7	64,7 ^b	
Salmão	67,2	67,4	70,0	67,8 ^a	
Média	66,2	65,3	67,4		12,4
Motilidade a 17 °C após 48 horas					
Soja	68,2	66,2	68,7	67,7 ^b	
Salmão	70,2	70,4	72,0	70,8 ^a	
Média	69,2	68,3	70,4		11,9
Motilidade a 5 °C após 48 horas					
Soja	55,2	53,2	55,7	54,7 ^b	
Salmão	61,2	61,4	63,0	61,8 ^a	
Média	58,2	57,3	59,3		14,1
Motilidade a 17 °C após 72 horas					
Soja	65,2	63,2	65,7	64,7 ^b	
Salmão	67,2	67,4	70,0	67,8 ^a	
Média	66,2	65,3	67,4		12,4
Motilidade a 5 °C após 72 horas					
Soja	44,2	42,2	44,7	43,7 ^b	
Salmão	50,2	50,4	52,0	50,8 ^a	
Média	47,2	46,3	48,4		17,4

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferiram pelo teste SNK ($P<0,05$).

A motilidade espermática do sêmen dos animais tratados com óleo de salmão e resfriado a 17 e 5 °C foi superior ($P<0,05$) aos animais tratados com óleo de soja, para todos os períodos em que foram acondicionados

(Tabela 1). Os resultados corroboram os de Corrêa et al. (2005) que avaliaram o efeito do diluente PIGPEL-5 e BTS a 5 °C após 24 horas de acondicionamento e, foram maiores que os valores reportados pelos autores após acondicionamento de 48 horas. Vale ressaltar que os valores comparados aos de Corrêa et al. (2005) vêm de amostras de sêmen diluídas com diluente BTS, porém tratados com diferentes fontes de ácidos graxos poliinsaturados, logo os resultados superaram os valores obtidos com um diluente desenvolvido especificamente para a temperatura de 5 °C.

Os valores observados por Roner et al. (2005) que avaliaram a capacidade de preservação do sêmen suíno acondicionado a 17 e 5 °C durante 72 horas, foram inferiores ao obtidos, para ambas as temperaturas. Os autores verificaram motilidade de 63,7 e 55,7%; 50,6 e 40,0%, e 28,1 e 10,6% para as temperaturas de 17 e 5 °C, respectivamente, após 24, 48 e 72 horas de acondicionamento.

Observou-se valores de motilidade superiores aos reportados por Katzer (2002), 43% de motilidade, nas 48 horas de acondicionamento, após colocar o sêmen suíno diretamente a 5 °C com diluente BTS. Este valor de 43% seria inaceitável para seu uso na inseminação, e pode ser resultado da rápida velocidade de resfriamento utilizada. Entretanto, verificou-se no capítulo 1, que a adição de óleo de salmão (DHA) na ração promoveu alteração na composição da membrana espermática que pode ter contribuído para que a motilidade do sêmen resfriado a 5 °C, nas 24 e 48 horas, não reduzisse a valores muito baixos.

A motilidade espermática é considerada um parâmetro importante na qualidade do sêmen de suíno, pois ejaculados com motilidade $\leq 60\%$ fertiliza poucos ovócitos (Britt et al., 1999; Johnson et al., 2000). Na tabela 1, verificou-se maior motilidade no sêmen dos animais tratados com óleo de salmão e acondicionado a 5 °C até 48 horas que os animais tratados com óleo de soja.

O tratamento com óleo de salmão aumentou ($P < 0,05$) o vigor dos espermatozóides resfriado nas temperaturas estudadas após 24 e 48 horas de acondicionamento, não diferindo ($P > 0,05$) após 72 horas (Tabela 2).

Os valores observados para o vigor espermático, corroboram com os de Corrêa et al. (2005) nos períodos de acondicionamento de 24 e 48 horas

(3,4 e 3,2; respectivamente, 17 e 5 °C), mas são superiores aos encontrados pelos autores a 72 horas (1,9 e 0,7; respectivamente, 17 e 5 °C). Baseado nos critérios de Britt et al. (1999) e Johnson et al. (2000), a motilidade de 60% e o vigor 3,0 são considerados índices limites para qualidade seminal. Neste estudo, a motilidade total e o vigor espermático foram dependentes do período de acondicionamento.

Tabela 2 – Fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E sobre o vigor espermático do sêmen suíno acondicionado a 17 e 5 °C

Fonte de óleo	Nível de Vitamina E (mg/kg)				CV (%)
	150	300	450	Média	
Vigor a 17 °C após 24 horas					
Soja	4,47	4,17	4,25	4,30 ^b	
Salmão	4,40	4,42	4,45	4,42 ^a	
Média	4,43	4,29	4,35		14,1
Vigor a 5 °C após 24 horas					
Soja	3,40	3,17	3,25	3,30 ^b	
Salmão	3,40	3,42	3,45	3,42 ^a	
Média	3,40	3,30	3,35		20,0
Vigor a 17 °C após 48 horas					
Soja	4,14	4,12	4,15	2,14 ^b	
Salmão	4,24	4,17	4,35	2,25 ^a	
Média	4,19	4,14	4,25		20,0
Vigor a 5 °C após 48 horas					
Soja	2,60	2,65	2,64	2,63 ^b	
Salmão	2,86	2,71	2,66	2,74 ^a	
Média	2,73	2,68	2,65		18,5
Vigor a 17 °C após 72 horas					
Soja	2,50	2,65	2,50	2,55	
Salmão	2,45	2,62	2,55	2,54	
Média	2,47	2,64	2,52		19,6
Vigor a 5 °C após 72 horas					
Soja	2,16	2,11	2,16	2,14	
Salmão	2,10	2,15	2,14	2,13	
Média	2,13	2,13	2,15		26,3

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha/coluna diferiram pelo teste SNK (P<0,05).

A porcentagem de espermatozoides reativos ao HOST aumentou ($P<0,05$) com a adição de óleo de salmão na ração do sêmen resfriado para ambas as temperaturas nos períodos de armazenamento (Tabela 3).

Tabela 3 – Fontes de óleo e níveis de suplementa o de vitamina E sobre o teste hiposmótico (HOST) do sêmen suíno acondicionado a 17 e 5  C

Fonte de �leo	Nível de Vitamina E (mg/kg)				CV (%)
	150	300	450	Média	
HOST a 17 �C após 24 horas					
Soja	79,7	78,6	79,6	79,3 ^b	
Salmão	85,5	84,2	83,6	84,4 ^a	
Média	82,6	81,4	81,6		5,5
HOST a 5 �C após 24 horas					
Soja	60,3	61,2	60,3	60,6 ^b	
Salmão	72,2	72,0	71,7	72,0 ^a	
Média	66,3	66,7	66,0		7,3
HOST a 17 �C após 48 horas					
Soja	68,7	67,7	68,6	68,3 ^b	
Salmão	74,5	73,2	72,6	73,4 ^a	
Média	71,6	70,4	70,6		6,41
HOST a 5 �C após 48 horas					
Soja	52,3	53,3	52,3	52,6 ^b	
Salmão	64,2	64,0	63,7	64,0 ^a	
Média	58,3	58,7	58,0		8,3
HOST a 17 �C após 72 horas					
Soja	62,7	61,6	62,6	62,3 ^b	
Salmão	68,5	67,2	66,6	67,4 ^a	
Média	65,6	64,4	64,6		7,0
HOST a 5 �C após 72 horas					
Soja	46,3	47,3	46,3	46,6 ^b	
Salmão	58,2	58,0	57,7	58,0 ^a	
Média	52,3	52,7	52,0		9,2

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferiram pelo teste SNK ($P<0,05$).

Para as características espermáticas estudadas (motilidade, vigor e o HOST) a 17 e 5 °C os valores observados diferiram ($P < 0,05$) em relação ao período em que foram acondicionados, onde o período de 24 horas foi superior ao de 48 horas que foi superior ao de 72 horas.

A morfologia anormal total observada neste estudo aumentou ($P < 0,05$) no sêmen dos animais tratados com óleo de soja e resfriados a 17°C. Não foi observado diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos em relação ao sêmen resfriado a 5 °C (Tabela 4). Entretanto, a porcentagem de defeitos totais foi maior ($P < 0,05$) no sêmen acondicionado a 5 °C que a 17 °C, para todos os momentos avaliados. Os resultados registrados corroboram com os de Roner et al. (2005) para as temperaturas de 17 e 5 °C, respectivamente, após 24 e 48 horas.

Nenhuma curva de resfriamento foi realizado para o sêmen submetidos ao resfriamento a 5 °C. Embora se saiba que um resfriamento mais rápido implica maiores lesões aos espermatozóides, o sêmen mantido a 5 °C apresentou, de modo geral, índices de viabilidade (motilidade, morfologia e Host) inferior ($P < 0,05$) ao sêmen mantido a 17 °C. Ainda hoje, não está bem definida qual é a velocidade de resfriamento adequada para o armazenamento do sêmen suíno em temperaturas abaixo de 17 °C, pressupõem-se que um resfriamento lento venha a amenizar os efeitos deletérios do choque térmico pelo frio. Segundo Watson e Plummer (1985), a velocidade de resfriamento influencia decisivamente no efeito do choque térmico sobre os espermatozóides.

Comparando os valores registrados no presente estudo, de motilidade, HOST e morfologia aos de Juliano et al. (2005) que avaliaram a qualidade do sêmen armazenado com BTS e PIGPEL-5 em diferentes temperaturas (17 e 5 °C), constatou-se valores maiores quanto a motilidade e morfologia espermática anormal apenas quando o diluente utilizado foi o BTS, sendo valores deste estudo inferiores aos do PIGPEL-5. Há resultados contraditórios com relação ao diluente PIGPEL-5, que foi desenvolvido especificamente para ser utilizado em sêmen suíno a ser resfriado a 5 °C. isto pode estar relacionado a diferenças em relação a fatores genéticos ou de meio. No entanto, vale ressaltar que os valores alcançados neste estudo aproximaram-se aos do diluente específico para a temperaturas de 5 °C.

Seria interessante avaliar a fertilidade do sêmen e estudar qual seria economicamente mais viável utilizar.

Tabela 4 – Fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E sobre a morfologia anormal (%) do sêmen acondicionado a 17 e 5 °C

Fonte de óleo	Nível de Vitamina E (mg/kg)				CV (%)
	150	300	450	Média	
Defeitos totais a 17 °C após 24 h					
Soja	4,75	4,62	5,12	4,83 ^a	
Salmão	3,56	3,75	3,62	3,64 ^b	
Média	4,16	4,62	5,12		39,7
Defeitos totais a 5 °C após 24 h					
Soja	9,0	9,62	8,12	8,92 ^a	
Salmão	8,5	8,0	8,12	8,20 ^a	
Média	8,75	8,81	8,12		26,0
Defeitos totais a 17 °C após 48 h					
Soja	8,75	8,62	9,12	8,83 ^a	
Salmão	7,56	7,75	7,62	7,64 ^b	
Média	8,15	8,19	8,37		20,4
Defeitos totais a 5 °C após 48 h					
Soja	11,0	11,62	10,16	10,93 ^a	
Salmão	10,5	9,97	10,0	10,15 ^a	
Média	10,75	10,80	10,08		20,6
Defeitos totais a 17 °C após 72 h					
Soja	9,75	9,62	10,12	9,83 ^a	
Salmão	8,56	8,75	8,62	8,64 ^b	
Média	9,16	9,19	9,37		18,2
Defeitos totais a 5 °C após 72 h					
Soja	13,5	14,31	12,72	13,51 ^a	
Salmão	13,37	12,97	12,75	13,03 ^a	
Média	13,44	13,64	12,73		14,2

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha/coluna diferiram pelo teste SNK (P<0,05).

Não foi observado efeito dos níveis de vitamina E ($P>0,05$). Visto que, não foi verificado perdas na qualidade seminal, nem aumento da morfologia anormal espermática, pode-se inferir que os níveis utilizados tiveram a função antioxidante desejada. Segundo Marin-Guzman et al. (1997 e 2000), que testaram os níveis de 0 e 220 UI (unidades internacionais) na ração de suínos, sendo o melhor nível o de 220 UI para a qualidade animal, pois verificaram que vitamina E teve um papel de proteger os espermatozóides contra danos oxidativos.

O fornecimento de óleo de salmão na ração de suínos reprodutores promoveu o aumento do teor de DHA na membrana espermática dos espermatozóides do sêmen *in natura* (Tabela 6, capítulo 1), proporcionando melhoria na qualidade espermática para os espermatozóides que são acondicionados a temperatura de 17 e principalmente a 5 °C.

CONCLUSÃO

A adição de óleo de salmão melhorou as características espermáticas avaliadas do sêmen suíno resfriado a 17 e 5 °C durante o período de acondicionamento de 24 e 48 horas, com exceção do vigor que foi melhor no período de 24 e 48 horas.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG e ao CNPq pelo suporte financeiro dado a esta pesquisa. À Perdigão Agroindustrial S/A e MINITUB do Brasil pelo apoio logístico, sem o qual este trabalho não seria realizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUHR, M.M.; CURTIS, E.F.; KAKUDA, S. Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*. 31:224- 238, 1994.
- BRITT, J.H.; ALMOND, G.W.; FLOWERS, W.L. Diseases of the reproductive system. In: Straws, B.; D'Allaire, S.; Mengeling, W.; Taylor, D. Eds., *Diseases of swine*, 8th ed. Blackwell Sciences Ltd, Ames, IA, p.905, 1999.

- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte, MG:1998. 49p.(Manual).
- CORRÊA, M.N.; BIANCHI, I.; LUCIA Jr., T.; SCHMIDTT, E.; RECH, D.C.; PERUZZO, I.A.; MACEDO Jr., M.; COLARES, T.; DESCHAMPS, J.C. Efeito do diluente PIGPEL-5 sobre alguns parâmetros da avaliação de sêmen suíno acondicionado a 5 °C. XII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 2005. Anais... p.279-280, 2005.
- DE LEEUW, F.E.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A.J. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Reproduction in Domestic Animals*, Suppl. 1, p.95–104, 1991.
- DE LEEUW, F.E.; CHEN, H.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, J. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*, 27:171-183, 1990.
- FERREIRA NETO, J.M.; VIANA, E.S.; MAGALHÃES, L.M. *Patologia clínica veterinária*. Belo Horizonte: Rabelo Brasil, 1977. 279p.
- JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62:143-172, 2000.
- JULIANO, F.; BIANCHI, I.; CORRÊA, M.N.; LUCIA Jr., T.; SERRET, C.G.; ULGUIM, R.R.; DESCHAMPS, J.C. Efeito do diluente PIGPEL-5 com distintos crioprotetores no sêmen suíno resfriado, armazenado em geladeira e caixas refrigeradoras à 5 e 17 °C. XII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 2005. Anais... p.287-288, 2005.
- KATZER, L.H. Resfriamento de sêmen suíno: Efeito da temperatura de armazenamento, incubação prévia, taxa de resfriamento e diluentes. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Reprodução de Suínos) Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2002. 70f.
- KING, G. J., MACPHERSON, J. W. A comparison of two methods for boar semen collection. *Journal of Animal Science*, Chamapign, 36(4):563-565, 1973.
- KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypoosmotic test. *Theriogenology*, 39:1279-1289, 1993.

- LANDSVERK, K. Packaging and distribution - their impact on fertility. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 4, 1999, Beltsville, Maryland, USA. Proceedings... Lawrence : Allen, 2000. 280p. p.137-139.
- MARIN-GUZMAN, J.; MAHAN, D.C.; WHITMOYER, R. Effects of dietary selenium and vitamin E on the ultrastructure and ATP concentration of boar spermatozoa, and the efficacy of added sodium selenite in extended semen on sperm motility. *J. Anim. Sci.* 78:1544-1550, 2000.
- MARIN-GUZMAN, J.; MAHAN, D.C.; CHUNG, Y.K.; PATE, J.L.; POPE, W.F. Effects of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissue responses, semen quality and subsequent fertilization rates in mature gilts. *J. Anim. Sci.* 75:2994-3003, 1997.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. Nutrient requirements of swine. 10ed. Washington: National Academy of Science, 1998. 189p.
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; SCHULMAN, L.L. Interaction of extender composition and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *Journal of Animal Science*, 35(3):580-584, 1972.
- RONER, M.N.B.; PALHARES, M.S.; SILVA FILHO, J.M.; RUFINO, L.M.; SANTOS, A.D. Qualidade espermática do sêmen suíno submetido a um sistema de refrigeração e conservação a 17 e 5 °C. XII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 2005. Anais... p.295-296, 2005.
- STRZEZEK, J.; FRASER, L.; KUKLINSKA, M.; DZIEKONSKA, A.; LECEWICZ, M. Effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on biochemical characteristics of boar sêmen. *Reproductive Biology*, 4(3):271-286, 2004.
- TAMULI, M.K.; WATSON, P.F. Cold resistance of live boar spermatozoa during incubation after ejaculation. *Veterinary Record*, 135(7):160-162, 1994.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. Manual de utilização do programa SAEG (Sistema para Análise Estatística e Genéticas). Viçosa: UFV, 1997. 149p.

- VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; GARCIA-ARTIGA, C.; ROCA, J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology* 47:913-922, 1997.
- WATSON, P.F.; GREEN, C.E. Cooling and capacitation of boar spermatozoa: What do they have in common? In: Johnson, L.A., GUTHRIE, H.D. Eds., *Boar Semen Preservation. Proc. IV International Conference of Boar Semen Preservation, Beltsville, Maryland – USA*, p.35-41, 2000.
- WATSON, P.F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reproduction in Domestic Animals*, 31(1):135-140, 1996.
- WEBER, H. Zur Kälteschockempfindlichkeit von Eberspermien; Einflub von Verdünnermedium, Inkubation und Abkühlrate. 1989. 103f. Tese (Doutorado em Reprodução de Suínos) - Escola Superior de Veterinária de Hannover, Alemanha.
- WEITZE, K.F. The use of “long-term extender” in pig AI– a view of the international situation. *Pig News and Information*, 11(1):23- 26, 1990.
- WEITZE, K.F.; WEBER, H.; WABERSKI, D. Influence of incubation time and cooling rate on chilling sensitivity of diluted boar semen. In: *INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION. 4.*, 1999, Beltsville, Maryland, USA. *Proceedings...* Lawrence: Allen, 2000. 264p.

FONTE DE ÓLEO E NÍVEIS DE SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA E NA RAÇÃO SOBRE A CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN SUÍNO

(Oil sources and vitamin E in the diet on the boar semen cryopreservation)

Elenice Andrade Moraes e Amorim, Ciro Alexandre Alves Torres

Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG
36570-000, Brasil

RESUMO

Objetivou-se avaliar a adição de fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E na ração sobre a criopreservação de sêmen suíno. Foram utilizados 24 suínos machos reprodutores Dalboard 85, com idades entre 12 e 18 meses, distribuídos num delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 X 3, com duas fontes de óleo (soja e salmão) e três níveis de antioxidantes (150, 300 e 450 mg de vitamina E/kg). O congelamento do sêmen reduziu ($P<0,05$) a qualidade espermática quando comparado com os resultados do sêmen *in natura*, independente do tratamento. Após o descongelamento, o sêmen dos animais tratados com óleo de soja na ração reduziu ($P<0,05$) a motilidade espermática total, vigor espermático, porcentagem de espermatozóides vivos e HOST. A motilidade média do sêmen após a diluição, e durante as etapas do congelamento foi de 85 e 84% para os animais tratados com óleo de salmão e soja, respectivamente. Entretanto, após o descongelamento, a motilidade dos animais tratados com óleo de salmão e soja reduziu para de 30 e 24%, respectivamente ($P<0,05$). Para a porcentagem de espermatozóides vivos e morfologia normal espermática, o sêmen dos animais que receberam suplementação com óleo de soja apresentou menores valores ($P<0,05$) que os tratados com óleo de salmão na ração. A suplementação com óleo de salmão na dieta de suínos, rico em ácidos graxos poliinsaturados, promove uma redução das características negativas observadas no sêmen suíno descongelado.

Palavras-chaves: ácidos graxos, congelamento, espermatozóides, óleo de salmão, varrões

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the addition oil sources and dietary supplementation of the vitamin E on the boar sperm fatty acid composition. Twenty-four mature Dalboard 85 boars, of proven fertility and in routine semen production for artificial insemination, were randomly divided, in factorial arrangement 2 X 3, with two oil sources (soy and salmon) and three levels of antioxidants (150, 300 and 450 vitamin E mg/kg). The semen frozen process reduced ($P<0.05$) the sperm quality when compared to the results of fresh sperm, independent of treatment. The total sperm motility, vigor, percentage of live sperm and HOST were reduced ($P<0.05$) in the semen thawed of the animals treated with soy oil in the diet. The motility of the semen after dilution and during cryopreservation process was 85 and 84% for the animals treated with salmon and soy oil, respectively. After thawing, the motility of the animals treated with salmon and soy oil were 30 and 24%, respectively ($P<0.05$). The percentage of live sperm and normal morphology, the sperm of the animals treated with soy oil presented lower values ($P<0.05$) for animals treated with salmon oil compared to the ones treated with salmon oil. The rich fatty acid unsaturated salmon oil supplemented to the diet for boars reduced of the negative characteristics observed in the thawed boars sperm.

Keywords: fatty acid, frozen, sperm, salmon oil, boars

INTRODUÇÃO

A criopreservação do sêmen é de grande utilidade nos programas de melhoramento genético, contribuindo para a preservação das características de animais de alto valor genético e ainda pode ser utilizada nos casos onde a inseminação artificial deve ser realizada em locais de difícil acesso ou distantes das centrais de inseminação artificial.

Os processos de congelamento do sêmen suíno possuem poucas aplicações práticas quando comparados aos de outras espécies de mamíferos domésticos, particularmente devido à grande variabilidade nos resultados de fertilidade após inseminação com doses de sêmen

descongeladas (Pursel e Johnson, 1971; Paquignon e Courot, 1975; Paquignon et al., 1977; Toniolli et al., 2001).

Durante as etapas do congelamento do sêmen deve-se levar em consideração a complexidade bioquímica da membrana plasmática do espermatozóide, a interação de seus componentes e a influência do resfriamento, congelamento e descongelamento nessas interações. A membrana plasmática é uma estrutura altamente dinâmica que também regula o processo de fertilização (Flesch e Gadella, 2000). Diferença na composição de lipídios da membrana espermática tem sido reportada como um fator chave na diferenciação da congelabilidade dos espermatozoides (Parks e Lynch, 1992). Em muitas espécies de mamíferos, mais de 60% dos ácidos graxos são PUFAs de cadeia longa da série ômega 3 (ω 3) (Poulos et al., 1973; Nissen e Kreysel, 1983). Esta específica composição de lipídios confere uma maior fluidez à membrana plasmática devido à presença de algumas ligações duplas (Erickson, 1998). Esta diferença física específica pode dar a membrana uma melhor resistência a danos devido a formação de cristais de gelo. Os lipídios que compõem a membrana plasmática dos espermatozoides de suínos são particularmente os insaturados, DHA (30%) e DPA (25%) (Penny et al., 2000). A alteração da composição de lipídios da membrana espermática afeta a criopreservação dos espermatozoides. A criopreservação induz muito estresse sobre os espermatozoides, incluindo a desestabilização da membrana plasmática, que resulta na perda de motilidade espermática e de sua função (Steponkus et al., 1983).

O lipídio é um dos componentes chaves de todos os diluentes usados durante resfriamento e congelamento. Os lipídios também são componentes celulares de membranas biológicas, e os principais componentes lipídicos dos espermatozoides, caracterizados por conterem grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) (Scott, 1973). Os PUFAs da série ω 3 e ω 6 são ácidos graxos essenciais, visto que, não podem ser sintetizados pelos animais e precisam ser fornecidos pela ração. A possibilidade de aumentar a congelabilidade de espermatozoides suínos pelo aumento do conteúdo de DHA na membrana plasmática pela ração é considerada. Aumento deliberado do grau de insaturações e, portanto da fluidez da membrana, poderia aumentar a resistência dos espermatozoides suínos aos

danos causados pelo processo de resfriamento/descongelamento (Paulenz et al., 1999). Mas apesar de haver efeitos benéficos dos ácidos graxos ω_3 , altas concentrações de PUFA dentro das frações lipídicas dos espermatozoides torna-os altamente susceptíveis à peroxidação com conseqüente risco de danos à estrutura celular (Niki et al., 1993). Portanto, é necessário um sistema antioxidante para protegê-los contra danos oxidativos (Aitken, 1994). Assim, objetivou-se avaliar o efeito de diferentes fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E sobre o processo de congelamento/descongelamento do sêmen suíno de reprodutores.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e período

O experimento foi conduzido de setembro de 2005 a janeiro de 2006, a 27°00'30" de latitude sul e 51°09'06" de longitude oeste, altitude média de 750 m, clima Cfa, segundo a classificação de Köppen-Geiger (verão quente) com temperatura média anual de 17 °C e precipitação pluviométrica média anual de 1.800 mm, nas dependências do Centro de Difusão Genética da Perdigão Agroindustrial S/A (Videira/SC).

Todas as análises realizadas no sêmen descongelado foram feitas no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa.

Animais e manejo

Foram utilizados 24 suínos machos reprodutores Dalboard 85, com idades entre 12 e 18 meses, alojados em baias individuais com água *ad libitum* e suplementação concentrada diária, segundo exigências estabelecidas pelo NRC (1998).

Os animais foram distribuídos num delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 X 3, com duas fontes de óleo (soja e salmão) e três níveis de antioxidantes (150, 300 e 450 mg de vitamina E/kg de ração). Foram adicionados 3,5% de óleo, independente da fonte utilizada. A composição centesimal foi baseada nas exigências nutricionais do NRC (1998) que se encontra na Tabela 1, do capítulo 1.

Coleta do sêmen

Antes de cada coleta foi realizada a higienização externa do prepúcio com água e sabão neutro, e a interna com solução fisiológica, para evitar possíveis contaminações do sêmen.

As amostras de sêmen foram coletadas, semanalmente (1 coleta/macho/semana), pelo método da mão enluvada (King e Macpherson, 1973), em sala apropriada com um manequim. O sêmen foi coletado em copo plástico de 700 mL contido em um copo térmico, com água previamente aquecida a 37 °C. Imediatamente após a coleta, a amostra de sêmen foi encaminhada para o laboratório de processamento de sêmen, onde foi colocada em banho-maria na temperatura de 37 °C para avaliações da qualidade.

Avaliação e processamento do sêmen

Imediatamente após a coleta do sêmen, o ejaculado foi analisado quanto ao seu volume (mL), concentração espermática ($\times 10^6/\text{mL}$), motilidade, vigor espermático, porcentagem de espermatozóides vivos e mortos, morfologia anormal e teste hiposmótico, conforme normas do CBRA (1998), cujos valores encontram-se descrito no capítulo 2.

Avaliação do sêmen durante o pré-congelamento

As avaliações da motilidade total espermática e do vigor espermático do sêmen durante o período de pré-congelamento foram realizadas em 6 etapas:

1^a = sêmen *in natura*,

2^a = sêmen diluído com meio centrifugador,

3^a = sêmen centrifugado,

4^a = sêmen diluído com meio de congelamento,

5^a = sêmen diluído com meio de congelamento após o resfriamento,

6^a = sêmen após congelamento no vapor de nitrogênio líquido.

Motilidade espermática total e vigor espermático

As avaliações dessas variáveis foram realizadas conforme descrito no capítulo 2.

Centrifugação e envase do sêmen

O sêmen foi processado e congelado pelo método descrito por Fürst et al. (2005), modificado quanto ao período de incubação a temperatura ambiente. O ejaculado foi diluído com meio centrifugador (Tabela 1) na proporção de 1:1 e, mantidos à temperatura ambiente de 23 a 25 °C. por 120 minutos. Depois, centrifugados a 800 g por 10 minutos. O meio de congelamento (Tabela 2) foi adicionado à temperatura de 17 °C. Após a centrifugação e retirada do plasma seminal, os *pellets* foram ressuspensos com meio de congelamento para uma concentração final de 1 bilhão de espermatozoides por mL. Para determinar esta concentração, foi utilizado a câmara de Neubauer, para isso, foi feita a diluição de 20 µL de sêmen em 19,98 mL (diluição de 1:1000) de solução formol salina tamponada a 1%. Após a homogeneização da mistura, uma alíquota foi colocada na câmara, onde a contagem foi feita sob microscopia de contraste de fase (aumento de 400X).

Alíquotas foram retiradas para análise física dos espermatozoides. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL na concentração final de 500 milhões de espermatozoides/palheta.

Resfriamento do sêmen

O sêmen foi resfriado seguindo o protocolo proposto por Fürst et al. (2005). As palhetas contendo o sêmen foram colocadas dentro de tubo de ensaio de 20 mL mantidos anteriormente a temperatura de 17 °C. Em seguida o tubo de ensaio revestido por um refil (saco plástico) foi colocado dentro de um recipiente de plástico de 240 mL contendo 120 mL de álcool absoluto preenchendo a metade do tubo de ensaio, que também estava mantido à temperatura de 17 °C. O recipiente foi então colocado na posição horizontal dentro de uma geladeira de 280 L, com temperatura interna de 4 a 5 °C, com taxa média de -0,5 °C, por um período de resfriamento de 35 minutos. Após este período, o tubo de ensaio contendo as palhetas foi retirado do recipiente e mantido na temperatura da geladeira por mais 25 minutos, sendo este último, o tempo de equilíbrio.

Tabela 1 – Composição do meio de centrifugação glicose-EDTA

Reagentes	Quantidade
D(+) glicose monohidratada	6,000 g
Citrato de sódio	0,375 g
EDTA	0,370 g
Bicarbonato de sódio	0,125 g
Penicilina G (sódica ou potássica)	100,000 UI
Sulfato de estreptomicina	0,100 g

EDTA = etileno diaminotetra-acetodissódico. Fonte: Martin et al., 1979.

Tabela 2 – Composição do meio de congelamento

Reagentes	Quantidade (mL)
Solução de lactose a 11%	50,0
Diluyente de centrifugação	25,0
Gema de ovo	20,0
Orvus-es-paste	0,8
Glicerol	5,0

Fonte: Martin et al., 1979.

Congelamento

O sêmen foi congelado seguindo o protocolo proposto por Ohata et al. (2005). O congelamento foi realizado em vapor de nitrogênio, colocando as palhetas sobre um suporte de aço inox a uma altura de 5 cm acima da lâmina de nitrogênio líquido, acondicionado em uma caixa de isopor com 40 cm de comprimento x 32 cm de altura x 20 cm de largura, contendo 5 cm de nitrogênio no seu interior, durante 20 minutos. Após esse período as palhetas foram submersas no nitrogênio, para congelação final dos espermatozoides. Em seguida, foram colocadas em raques, devidamente identificadas e armazenadas em botijão de nitrogênio, para análises posteriores.

Descongelamento

As amostras de sêmen de cada tratamento foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 20 segundos (Ohata et al., 2005).

Avaliação do sêmen descongelado

A motilidade espermática total e o vigor espermático foram avaliados tal como descrito no capítulo 2.

HOST

A integridade da membrana plasmática foi avaliada no sêmen diluído congelado/descongelado, conforme a técnica da preparação úmida. Alíquotas de 10 µL do sêmen diluído foi adicionado em 0,9 mL da solução à base de citrato de sódio e frutose com osmolaridade de 150 mOsmol/L (Vazquez et al., 1997), e incubado por 30 minutos, em banho-maria à 37 °C. Após esse período, alíquotas de 15 µL da mistura foram colocadas entre lâmina e lamínula, para a contagem de 100 células de cada solução em microscopia de contraste de fase com aumento de 400x. As células foram classificadas quanto à presença ou não da cauda enrolada, segundo descrito por Kumi-Diaka (1993).

Morfologia espermática

Para a avaliação da morfologia espermática utilizou-se a técnica de preparação úmida. Alíquotas de 40 µL de sêmen foi adicionado em 1 mL de formol-salino tamponado e estocado a temperatura ambiente até análises. Foram contadas 100 células com auxílio de microscópio óptico com contraste de fase em aumento de 1000x para a determinação do percentual de anormalidades espermáticas classificadas segundo CBRA (1998) dividindo as anormalidades em defeitos maiores e menores.

Análises estatísticas

As análises dos parâmetros avaliados foram realizadas com utilização do programa SAEG (UFV, 1997).

As variáveis foram submetidas aos testes de normalidade e homocedacidade. Posteriormente, foram submetidas à análise de variância dos dados e utilizadas o teste de Student Newman-Keuls (SNK) para comparação de médias entre as fontes de óleo, com nível de significância de 5% e análise de regressão para os níveis de antioxidantes usados. Quando

houve interação foi determinado o efeito do nível de antioxidante dentro de cada fonte.

As variáveis que não atenderam às premissas para a análise de variância, mesmo após as transformações, foram submetidas ao teste não paramétrico de Wilcoxon.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição de ácidos graxos e o teor de vitamina E identificados nos óleos, rações e nos espermatozoides do sêmen in natura

Os principais ácidos graxos identificados nos óleos, nas rações e espermatozoides podem ser observados, respectivamente, nas Tabelas 2, 3 e 6, do capítulo 1. Os valores de vitamina E analisados nos óleos, nas rações e nos espermatozoides podem ser observados nas Tabelas 4, 5 e 7, do capítulo 1.

Características seminais do sêmen in natura

As características físico-morfológicas espermáticas, como motilidade espermática total, vigor espermático, morfologia espermática, HOST e a porcentagem de espermatozoides vivos realizados no sêmen *in natura* foram demonstrados e discutidos no capítulo 2.

Características do sêmen suíno criopreservado

A qualidade do sêmen de suínos reprodutores é afetada pela criopreservação (Almlid e Johnson, 1988), pois o processo de criopreservação ocasiona perdas significativas aos espermatozoides de suínos se comparado com os do sêmen *in natura* ou resfriado a 17 °C. Sabendo disso, o aspecto final do estudo do papel dos lipídios neste experimento foi verificar a possibilidade de aumentar a insaturações dos espermatozoides de suínos, com a finalidade de diminuir os danos ocasionados na membrana plasmática durante o resfriamento e congelamento.

Nenhum efeito da interação entre a fonte de óleo e os níveis de vitamina E foi observado ($P > 0,05$).

Foi observado que a qualidade do sêmen de suínos é afetada pela criopreservação ($P < 0,05$), independente do tratamento, quando comparado com os resultados do sêmen *in natura*, cujos valores encontram-se no capítulo 2.

A motilidade espermática total média durante as etapas do resfriamento/congelamento do sêmen estão apresentadas na Figura 1.

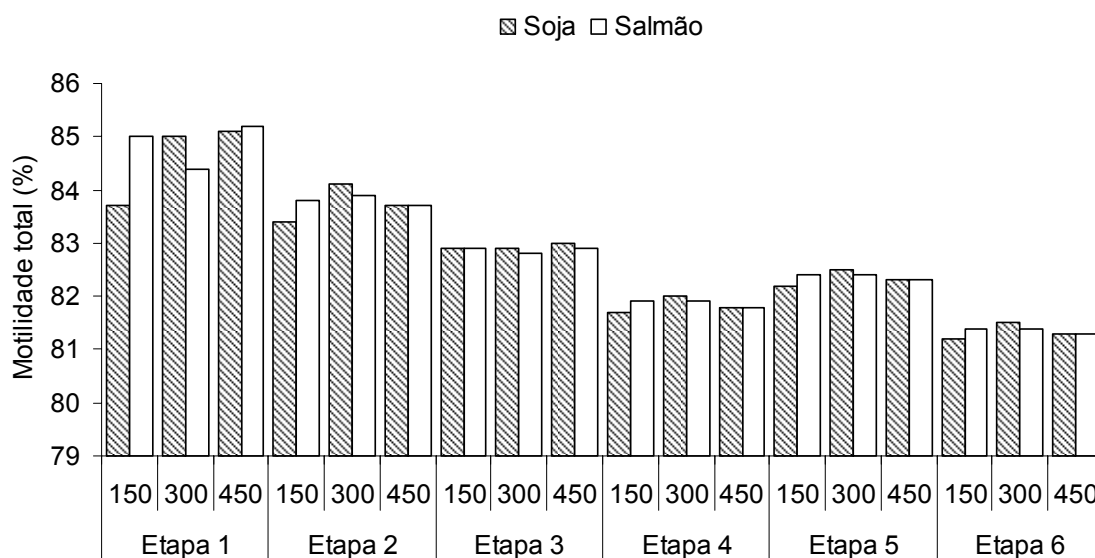


Figura 1 – Fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E sobre a motilidade espermática total do sêmen suíno durante as etapas do protocolo de resfriamento e congelamento*.

Etapas: (1) sêmen *in natura*; (2) sêmen diluído com meio de centrifugação; (3) sêmen centrifugado (4) sêmen diluído com meio de congelamento; (5) sêmen diluído com meio de congelamento após o resfriamento; (6) sêmen após o congelamento no vapor de nitrogênio líquido.
* $P > 0,05$.

Após o descongelamento, a motilidade espermática total dos animais tratados com óleo de salmão e soja foi de 30 e 24%, respectivamente. Amostras de sêmen dos animais tratados com óleo de soja na ração apresentaram igual ($P < 0,05$) motilidade espermática total e valores maiores de vigor espermático (Tabela 3), porcentagem de espermatozoides vivos (Tabela 4) e teste hiposmótico (HOST; Tabela 6) que os animais tratados com óleo de salmão.

Os valores médios das características observadas aproximam-se dos padrões de normalidade considerados para a espécie (CBRA, 1998). Vale

ressaltar, que a seleção dos varrões para este estudo não utilizou as características seminais como fator determinante, visto não ser o objetivo do mesmo verificar a capacidade de congelabilidade dos respectivos varrões mas sim avaliar os danos sofridos pelos espermatozóides após o descongelamento do sêmen.

Tabela 3 – Fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E sobre a motilidade espermática total e vigor espermático do sêmen descongelado de suíno

Fonte de óleo	Nível de Vitamina E (mg/kg)				CV (%)
	150	300	450	Média	
Motilidade espermática total (%)					
Soja	23,8	25,2	24,3	24,4 ^b	
Salmão	27,7	31,1	31,2	30,0 ^a	
Média	25,8 ^B	28,1 ^A	27,7 ^A		14,5
Vigor espermático					
Soja	1,97	1,85	1,85	1,89 ^b	
Salmão	1,97	2,32	2,37	2,22 ^a	
Média	1,97	2,08	2,11		52,3

^{a, b, A, B} Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha/coluna diferiram pelo teste SNK (P<0,05).

A motilidade espermática total no pós descongelamento obtida neste estudo foi mais baixa às observadas em outros estudos com sêmen suíno criopreservado: 38,8%, (Paulenz et al., 1999), 40,9% (Murgas et al., 2001), 44,6% (Cerolini et al., 2001), 36% (Bianchi et al., 2005b, utilizando o protocolo de Westendorf et al. (1975) e 51,4% (Ohata et al., 2005). Isto se deve, provavelmente, pelo tipo de protocolo de resfriamento e congelamento utilizado ou pelo período de incubação do sêmen antes do resfriamento, ou a associação destes. Entretanto, a motilidade espermática total (30%) dos animais tratados com óleo de salmão foram próximos aos obtidos por Bianchi et al. (2005a) que avaliaram dois diferentes diluentes a base de gema de ovo e LDL, respectivamente, PIGPEL-5 e PIGPEL+, cujos valores obtidos 10 minutos após o descongelamento foram de 34 e 33% de motilidade espermática total. E maiores que os reportados por Maldijian et al.

(2005), que suplementaram a ração de suínos com óleo de peixe e obtiveram 24,9% de motilidade espermática total após o congelamento.

No entanto, os resultados de motilidade espermática total no pré-congelamento (85 e 84%, respectivamente, para os óleos de salmão e soja) foram superiores aos reportados por Bianchi et al. (2005b) que utilizando dois diferentes protocolos observaram motilidade espermática total de 68% (Westendorf et al., 1975) e 52% (Paquignon et al., 1974) no pré-congelamento. Vale ressaltar a motilidade espermática total do sêmen dos animais tratados com óleo de salmão na ração foi maior que a motilidade espermática total pós-descongelamento (22%) observada por Bianchi et al. (2005b), utilizando o protocolo preconizado por Paquignon et al. (1974), mesmo após 10 e 30 minutos de descongelamento.

Observou-se efeito linear ($P < 0,05$) da vitamina E sobre a motilidade espermática total, porcentagem de espermatozóides vivos e HOST para ambas as fontes de óleo. O consumo dos maiores níveis de suplementação de vitamina E promoveu o aumento dos valores destas variáveis, demonstrando que a função antioxidante da vitamina E colaborou para os bons resultados obtido no sêmen dos animais suplementados com óleo de salmão.

A porcentagem de espermatozóides vivos e a morfologia espermática (defeitos maiores) do sêmen dos animais suplementados com óleo de salmão apresentaram valores menores ($P < 0,05$) que os tratados com óleo de soja na dieta (Tabela 4 e 5), mostrando que o óleo de salmão, rico em PUFAs, após alterarem a composição da membrana dos espermatozóides no sêmen *in natura* (valores descritos no capítulo 2) promove uma melhora da qualidade do sêmen descongelado.

Tabela 4 – Fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E sobre a porcentagem de espermatozóides vivos no sêmen descongelado de suíno

Fonte de óleo	Nível de Vitamina E (mg/kg)				CV (%)
	150	300	450	Média	
	Espermatozóides Vivos (%)				
Soja	35,9	36,0	36,5	36,1 ^b	
Salmão	39,6	42,9	42,3	41,6 ^a	
Média	37,7 ^B	39,5 ^A	39,4 ^A		12,7

^{a,b/A,B} Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha/coluna diferiram pelo teste SNK (P<0,05).

No entanto, a porcentagem de espermatozóides vivos no sêmen dos animais tratados com óleo de salmão foi similar aos de Cerolini et al. (2001) e Murgas et al. (2001) que obtiveram 42,2% e 43,0% de espermatozóides vivos, respectivamente e, menor se comparado aos de Maldjian et al. (2005), que reportaram 56,8% espermatozóides vivos após descongelamento do sêmen dos animais suplementados com óleo de peixe que foram criopreservados segundo o protocolo preconizado por Westendorf et al. (1975) e modificado por Amlid (1987).

Constatou-se que a porcentagem de espermatozóides vivos foi maior que o número de espermatozóides com motilidade espermática total, isto sugere que a coloração eosina-nigrosina requer apenas a integridade estrutural da membrana espermática para indicar se a célula está íntegra ou não. Portanto, os espermatozóides apesar de apresentarem a membrana plasmática da cabeça intacta, possivelmente já podem estar passando por uma fase de esgotamento do ATP, na peça intermediária, não caracterizando assim, alteração na integridade estrutural da membrana plasmática, o que foi também observado por Mello (1999).

A morfologia (defeitos menores) não diferiu (P>0,05) entre os tratamentos (Tabela 5), e mostraram-se dentro de padrões desejáveis para efeito de seleção de varrões, pois a porcentagem de defeitos totais registrados em espermatozóides de ambos os tratamentos, são considerados padrão após o descongelamento, segundo as normas preconizadas pelo CBRA (1998).

Tabela 5 – Fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E sobre a morfologia espermática do sêmen descongelado de suíno

Fonte de óleo	Nível de Vitamina E (mg/kg)				CV (%)
	150	300	450	Média	
Defeitos Maiores (%)					
Soja	26,4	26,4	26,3	26,3 ^a	
Salmão	25,9	25,9	25,7	25,8 ^b	
Média	26,2	26,1	26,0		7,54
Defeitos Menores (%)					
Soja	15,7	15,9	14,9	15,5 ^a	
Salmão	14,9	15,1	14,5	14,8 ^a	
Média	15,3	15,5	14,7		34,9

^{a,b}Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferiram pelo teste SNK (P<0,05).

O HOST avalia a integridade funcional da membrana plasmática, com base nas propriedades osmóticas da mesma, e segundo Llano et al. (2001) os valores do HOST acrescenta informações que pode melhorar significativamente a predição da fertilidade.

O HOST foi avaliado no sêmen após o descongelamento (Tabela 6). Observou-se um número maior de espermatozóides reativos ao HOST (P<0,05) no sêmen dos animais tratados com óleo de salmão na ração que dos animais suplementados com óleo de soja. Apesar de baixos (P<0,05) quando comparados aos valores registrados no sêmen *in natura* (84,2 e 86,2% para óleo de soja e salmão, respectivamente; Tabela 4 do capítulo 2), não foi observada diferença entre as fontes de óleo.

Tabela 6 – Fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E sobre a porcentagem de espermatozóides reativos ao HOST do sêmen descongelado de suíno

Fonte de óleo	Nível de Vitamina E (mg/kg)				CV (%)
	150	300	450	Média	
	HOST (%)				
Soja ¹	16,8	18,2	17,3	17,4 ^b	
Salmão ¹	20,7	24,1	24,2	23,0 ^a	
Média	18,8 ^B	21,1 ^A	20,7 ^A		19,6

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha/coluna diferiram pelo teste SNK (P<0,05).

¹Efeito linear (P<0,05).

Os espermatozóides de suíno são mais susceptíveis a danos durante a diminuição da temperatura que os de outras espécies (Watson et al., 1992), provavelmente devido à composição da membrana plasmática. Mudanças na composição e estrutura da membrana plasmática de espermatozóides de suíno devido ao choque térmico a 17 °C (De Leeuw et al., 1990) e no congelamento (Buhr et al., 1994) tem sido reportado. Llano et al. (2001) observaram que o HOST de sêmen suíno foi mais sensível aos danos causados pelo choque térmico (37 a 15°C) que a avaliação da motilidade espermática total e do acrossoma.

Foi feita uma correlação entre a motilidade espermática total e a funcionalidade da membrana, onde se verificou os seguintes valores $r=0,99$ e $r=1,00$ para fonte de óleo de soja e salmão, respectivamente. Esta correlação é alta, pois a motilidade espermática total é dependente do transporte de soluções através da membrana íntegra e das atividades bioquímicas do metabolismo espermático (Jeyendran et al., 1984).

No entanto, o valor de 23% de espermatozóides reativos ao HOST, apesar de baixo, é significativo, visto que, vem representar a porcentagem de espermatozóides reativos de um total de 30% de espermatozóides móveis (Tabela 3), ou seja, destes 30% de espermatozóides móveis, 23% apresentam a membrana plasmática funcional após a etapa de congelamento e descongelamento. Segundo Maxwell e Johnson (1997) as alterações que podem ocorrer nos espermatozóides após o congelamento

estão associadas com a etapa de resfriamento, e essas alterações podem ser minimizadas se o sêmen tiver um período de incubação posterior ao resfriamento. Quando amostras de sêmen pré-diluídas são mantidas acima de 15 °C, por 1 a 5 h, o espermatozóide adquire uma resistência gradual ao choque térmico (Pursel et al., 1972 e 1973). Portanto, apesar de, em todos os parâmetros avaliados, o sêmen dos animais que receberam óleo de salmão na ração apresentarem resultados melhores que os tratados com óleo de soja ($P < 0,05$), nenhum outro ganho foi observado em termos de melhoria da qualidade seminal mesmo após um período de incubação de 2 hora a 15 °C antes do sêmen ser resfriado para temperaturas inferiores a 15°C.

Sabe-se que durante o congelamento e descongelamento ocorre uma redução na proporção de PUFA em espermatozóides de suínos (Maldjian et al., 2005). Desta forma, embora os efeitos não tenham sido muito expressivos neste estudo, o fornecimento de óleo de salmão na ração de suínos ocasionou alterações na membrana espermática dos espermatozóides do sêmen *in natura* (Tabela 6, capítulo 1), com o aumento de DHA, que indiretamente proporcionou melhoria na qualidade do sêmen pós-descongelamento.

CONCLUSÃO

Os tratamentos não possibilitaram melhora benéfica do sêmen pós-descongelamento. Apesar disso, a suplementação com óleo de salmão na ração proporcionou melhores resultados das características espermáticas no sêmen suíno descongelado que o óleo de soja.

Os níveis de vitamina E 450 mg/kg de ração aumentou a porcentagem de espermatozóides vivos e reativos ao teste hiposmótico.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG e ao CNPq pelo suporte financeiro desta pesquisa. À Perdigão Agroindustrial S/A, MINITUB do Brasil e Lagoa da Serra Ltda pelo apoio logístico, sem o qual este trabalho não seria realizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMLID, T.; CLARKE, R. N.; PURSEL, V. G.; JOHNSON, L. A. Effectiveness of in vitro methods for predicting in vivo fertilizing capacity of boar spermatozoa cryopreserved with 2% or 4% glycerol. *Zuchthyg*, 24:8-15, 1989.
- ALMLID, T.; JOHNSON, A.L. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *J. Anim. Sci.* 66:2899-2905, 1988.
- ALMLID, T.; STAVNE, S.E.; JOHNSON, A.L. Fertility evaluation of the straw freezing technique for boar semen under practical artificial insemination conditions. *Zuchthygiene*, 22:193-202, 1987.
- BIANCHI, I.; CORRÊA, M.N.; LUCIA Jr., T.; CORRÊA, E.K.; PIASSI, L.M.; CALDERAM, K.; ULGUIM, R.R.; MADEIRA, E.M.; DESCHAMPS, J.C. Efeito de diferentes crioprotetores no descongelamento de sêmen suíno. XII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos. *Anais....2005.* p.271-272, 2005a.
- BIANCHI, I.; CORRÊA, M.N.; PIASSI, L.M.; LUCIA Jr., T.; CORRÊA, E.K.; MADEIRA, E.M.; PERONDI, A.; CORCINE, C.D.; COREZZOLLA, J.L.; DESCHAMPS, J.C. Efeito de diferentes métodos de congelamento sobre a motilidade de sêmen suíno. XII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos. *Anais....2005.* p.273-274, 2005b.
- BUHR, M.M., CURTIS, E.F., KAKUDA, N.S. Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology* 31:224-238, 1994.
- CAIZA DE LA CUEVA F.; RIGAU, T.; PUJOL R.; PIEDRAFITA, J.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. Resistance to hyperosmotic stress in boar spermatozoa: the role of the ionic pumps and the relationship with cryosurvival. *Anim. Reprod. Sci.* 48:301-315, 1997.
- CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI T.M. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopresrvation of boar semen. *Reproduction*, 121:395-401, 2001.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte, MG:1998. 49p.(Manual).

- DE LEEUW, F.E.; CHEN, H.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, J. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*, 27:171-183, 1990.
- ERICKSON, M.C. Chemistry and function of phospholipids. In: Akoh, C.C., Min, D.B., Eds. *Food lipids, chemistry, nutrition and Biochemistry*. New York: Marcel Dekker Inc; 1998. p.41.
- FERREIRA NETO, J.M.; VIANA, E.S.; MAGALHÃES, L.M. *Patologia clínica veterinária*. Belo Horizonte: Rabelo Brasil, 1977. 279p.
- FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* 1469:197-235, 2000.
- FÜRST, R.; CARVALHO, G.R.; FÜRST, M.C.O. et al. Efeito do resfriamento do semen equino sobre sua congelabilidade. *Arq. Brás. Vet. Zootec.* 57(5):599-607, 2005.
- FÜRST, R. Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen eqüino. 2006. Tese de Doutorado – Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, 114p. 2006.
- HOFMO P.O.; ALMLID T. Recent developments in freezing of boar semen with special emphasis on cryoprotectants. *Rep. Dom. Anim.* 26(suppl. 1):1992.
- JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PALAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J.D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 70:219-225, 1984.
- KING, G. J., MACPHERSON, J. W. A comparison of two methods for boar semen collection. *Journal of Animal Science*, Chamapign, 36(4):563-565, 1973.
- KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hyposmotic test. *Theriogenology*, 39:1279-1289, 1993.
- LARSSON, K., EINARSSON, S., NICANDER, L. Influence of thawing diluent on vitality, acrosome morphology ultrastructure and enzyme release of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Vet. Scand.* 17:83-100, 1976.

- MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T.; CEROLINI, S.; PENNY, P.; NOBLE, R.C. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology* 63:411-421, 2005.
- MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GUNZEL, Anne-Rose. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J. Reprod. Fert., supply.*, 27:47-51, 1979.
- MAXWELL, W.M.C., JOHNSON, L.A. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology*, v.48, p.209-219, 1997.
- MELO, M.I.V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino. *Arquivo Bras. Méd. Vet. Zootec.* 51(1):71-78, 1999.
- MURGAS, L.D.S.; SELLÉS, E.; GADEA, J.; RUIZ, S. Crioconservación espermática en la especie porcina: Estudio de dos sistemas de congelación con semen heterospérmico. In: X Congresso da ABRAVES, 2001, Porto Alegre. X Congresso ABRAVES. CD-ROOM, 2001.
- NATIONAL RESEACH COUNCIL – NRC. Nutrient requeriments of swine. 10ed. Washington: National Academy of Science, 1998. 189p.
- NISSEN, H.P.; KREYSEL, H.W. Polyunsaturated fatty acids in relation to sperm motility. *Andrology* 15:264-269, 1983.
- OHATA, P.M.; BERNARDI, M.L.; REIS, G.R.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I. Congelabilidade do sêmen suíno de acordo com o período de equilíbrio pré-congelamento e da sensibilidade ao resfriamento. *Archives of Veterinary Science* 10(1):69-74, 2005.
- OHATA, P.M., WENTZ, I., BERNARDI, M.L., CASTAGNA, C., BORTOLOZZO, F.P. Influência do período de equilíbrio pré-congelamento e plasma seminal na congelabilidade do sêmen suíno. *Anais do X Congresso ABRAVES, v. II, Porto Alegre, 2001.*
- PAQUIGNON, M; COUROT, M. Survie des spermatozoides de verrat après décongélation. Effet du rythme de collectes, de la concentration et du taux de glycérol. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biopys.* 15:517-523, 1975.
- PAQUIGNON, M., BUSSIERE, J., BARITEAU, F., COUROT, M. Resultats pratiques d'utilisation de semence congelee de verrat. *Journees rech. Porcine en France, 1977.*

- PAQUIGNON, M., MERGOUNIS, D., COUROT, M., DU MESNIL DU BUISSON, F. Technologie de la congélation de la semence de verrat: étude vitro. Journées Rech. Porcine France, p. 71-76, 1974.
- PARKINSON, T. J., WHITFIELD, C. H. Optimisation of freezing conditions for bovine spermatozoa. *Theriogenology* 27:781-797, 1987.
- PARKS, J.E.; LYNCH, D.V. Lipid composition and thermotropic phase behaviour of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 29:255-266, 1992.
- PAULENZ, H.; TAUGBOL, O.; KOMMISRUUD, E.; GREVLE, I.S. Effect of dietary supplementation with cod liver oil on cold shock and freezability of boar semen. *Reprod. Dom. Anim.* 34:431-435, 1999.
- PENNY, P.C.; NOBLE, R.C.; MALDJIAN, A.; CEROLINI, S. Potential role of lipids for the enhancement of boar fertility and fecundity. *Pig News Inform.* 25:119-126, 2000.
- PEREZ-LLANO, B.; LORENZO, J.L.; YENNES, P.; TREJA, A.; GARCIA-CASADO, P. A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology* 56:387-398, 2001.
- POULOS, A.; DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. *Comp. Biochem Physiol* 46:541-549, 1973.
- PURSEL V. G., JOHNSON L. A., SCHULMAN L. L.. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa *J. Animal Sci.* v. 37 p. 528-531, 1973.
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; RAMPACEK, G.B. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J. Anim. Sci.* 34:278-283, 1972.
- PURSEL, V.G; JOHNSON, L.A.. Fertility with frozen boar spermatozoa. *J. Anim. Sci.* 33:265, 1971.
- PURSEL V. G., JOHNSON L. A. Distribution of glutamic oxaloacetic transaminase dehydrogenase activities in boar semen after cold shock and freezing. *Cryobiology.* v. 7, p. 141-144, 1970.
- STEPONKUS, P.L.; DOWGERT, M.F.; GORDON-KAMM, W.J. Destabilization of the plasma membrane of isolated plant protoplasts

- during freeze–thaw cycle: the influence of cold acclimation, *Cryobiology*, 20:448–465, 1983.
- TARDIF, S., LAFOREST, J.P., CORMIER, N., BAILEY, J.L. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology*. v. 52, p. 447-459, 1999.
- TONIOLLI, R.; BARROS, D. Q.; JATAHY, P.C.; MORAIS, R. M.; MOREIRA, F.R.C. Fertilidade de porcas inseminadas: análise de diferentes parâmetros. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 25:444-447, 2001.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. Manual de utilização do programa SAEG (Sistema para Análise Estatística e Genéticas). Viçosa: UFV, 1997. 149p.
- VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; GARCIA-ARTIGA, C.; ROCA, J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology* 47:913-922, 1997.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fert.Dev.* 7:871-891, 1995.
- WATSON, P.F.; NOILES, E.E.; CURRY, M.R.; MAZUR, P.; CRITSER, J.K.; HAMMERSTEDT, R.H. Response of spermatozoa to hyposmotic stress reflects cryopreservation success. 12 th Int. Congress on Animal Reproduction 3:1502-1504, 1992.
- WESTENDORF P, RITCHER L, TREU H. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma. Labor-und Besamungsergebnisse mit dem Hülsenberger Paillettenverfahren. *DtschTiera"rztl Wschr.* v.82, p.261–267, 1975.

ADDING DIFFERENT CHOLESTEROL CONJUGATES LOADED CYCLODEXTRIN ON BULL SPERM CRYOSURVIVAL

E.A.M. Amorim^{a,b}, J.K. Graham^a, C.A.A. Torres^b

^aDepartment of Biomedical Sciences, Colorado State University, 1680
Campus Delivery, Fort Collins, CO 80523, USA

^bDepartment of Animal Science, Federal University of Vicosa, Vicosa, MG
36570000, Brazil

ABSTRACT

This study compared the effect of adding other cholesterol conjugates, which should incorporate into and increase membrane fluidity at low temperatures thereby increasing cryosurvival. Ejaculates from four bulls were divided in three experiments (E). Ejaculates from each of four bulls were diluted to 120 million cells in a Tris diluent. In E1 and E2, the sperm diluted were sub-divided into four treatments: No additive (control); 1.5 mg cholesterol loaded cyclodextrin (CLC)/120 million sperm (positive control); and 1.5 mg cyclodextrin pre-loaded with cholestanol or desmosterol/120 million sperm. In E3, the sperm diluted were sub-divided into 10 treatments: T1: no additive (control); T2: 0.75 mg and T3: 1.5 mg (Heptanoate); T4: 0.75 mg and T5: 1.5 mg (Palmitate); T6: 0.75 mg and T7: 1.5 mg (Pelargonate); T8: 0.75 mg and T9: 1.5 mg (stearate), and T10: 1.5 mg CLC/ml (positive control). The semen from the experimental animals was incubated for 15 min at 22 °C to allow the incorporation of cholesteryl conjugates. After this period, in the E1 samples from each treatment were used to determine the motility and osmotic tolerance and, the ability of fresh sperm to bind to the zona pellucida (ZP) and chicken egg perivitelline membrane (CEPM) using a Hamilton Thorne Motility Analyser (CASA) and epifluorescence microscopy, respectively. The sperm from E2 and E3, the sperm were diluted 1:1 (v:v) in Tris with 20% Egg Yolk (EY) and cooled to 5 °C. After dilution 1:1 (v:v) with Tris containing 10% EY and 16% glycerol to a final concentration of 30 million sperm and were allowed to equilibrate for 15 minutes before packaging into 0.5 ml French straws, and thereafter freezing in static liquid nitrogen vapor for 20 minutes and plunging into liquid nitrogen for storage.

Samples were thawed to determine the motility (E2 and E3), the ability of sperm to bind to the ZP (E3) and to CEPM (E2), and viability (E3) using Epics V Flow Cytometer. In the E1, treating fresh sperm with CLC resulted in more binding to the ZP compared to all other treatments ($P < 0.05$). No differences were observed between ZP and CEPM binding ability ($P > 0.05$). The percentages of motile sperm, when the sperm were exposed to anisotonic conditions, and then returned to isosmolality, were higher for fresh samples treated with cholesterol, cholestanol or desmosterol loaded cyclodextrin than control cells ($P < 0.05$). In the E2, after cryopreservation the percentages of motile sperm and number of sperm binding to each CEPM were similar for sperm treated with CLC and cholestanol compared to sperm treated with desmosterol ($P > 0.05$). All treatments provided higher motility and binding efficiency than control sperm ($P < 0.05$). And for E3, higher percentages of motile sperm and viable cells were maintained after thawing the sperm treated with CLC and cholesteryl-pelargonate compared to all other treatments ($P < 0.05$). The percentage of motile sperm and number sperm binding to CEPM was higher for CLC-treated cells ($P < 0.05$). Therefore, adding cholesterol or cholesteryl-pelargonate or cholestanol to bull sperm membranes improved cell cryosurvival.

Keywords: bull, cholesteryl conjugates, fresh/frozen semen, motility, viability, zona binding.

INTRODUCTION

Sperm cryosurvival is affected by altering the lipid composition of sperm plasma membranes. Cryopreservation induces many stresses on the sperm, including destabilizing the plasma membrane which results in the loss of sperm motility and function (Steponkus et al., 1983). Treating bull sperm with cholesterol-loaded cyclodextrin (CLC) prior to cryopreservation increases sperm cryosurvival rates (Purdy and Graham, 2004b; Mocé and Graham, 2006).

Sperm sensitivity to "cold shock" damage is determined by membrane phospholipid composition and membrane cholesterol to phospholipid ratio (Holt, 2000), and sperm possessing high cholesterol:phospholipid ratios

(rabbit and human sperm) are more resistant to the “cold shock” damage than the ones with low ratios, boars, stallions, rams and bulls (Watson, 1981; Parks and Lynch, 1992; White, 1993).

When cyclodextrins, the cyclic oligosaccharides of glucose which contain a hydrophobic center with incorporating lipids capability (Klein et al., 1995) are preloaded with cholesterol (CLC) and then incubated with bull sperm before cryopreservation, resulted in higher percentages of motile and viable cells recovered after freezing and thawing, compared with control sperm (Purdy and Graham, 2004b; Combes et al., 1998). This added cholesterol most likely benefits cells by lowering the temperature at which the sperm plasma membranes undergo the lipid phase transition from the fluid to the gel state as the cells are cooled (Ladbrooke et al., 1968).

Cyclodextrins may be used to alter the cholesterol content of cell membranes (Christian et al., 1997; Visconti et al, 1999), and if cyclodextrins are pre-loaded with cholesterol, it is incorporated into membranes (Navratil et al., 2003). If stallion (Combes et al, 2000; Moore et al, 2005), bull (Purdy and Graham, 2004a,b) and ram (Morrier et al., 2004) sperm are treated with cholesterol-loaded cyclodextrins (CLC) prior to freezing, they exhibit higher cryosurvival rates than untreated sperm.

This study compared the effect of adding cholesterol and other sterols, to the sperm membrane which may be incorporated into and increase membrane fluidity at low temperatures thereby increasing cryosurvival.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Mature Holstein bulls were housed at the Animal Reproduction Laboratory at Colorado State University (CSU), fed a diet providing 100% of their nutritional needs, and provided water *ad libitum*. All animal care and procedures used to collect semen were approved by the Animal Care and Use Committee of Colorado State University.

Materials

All chemicals were reagent grade and purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), except for Hoechst 33342 which was purchased from ICN, Biomedicals, Inc. (Aurora, OH).

Cyclodextrins preparation

Methyl- β -cyclodextrin was loaded with cholesterol as described by Purdy and Graham (2004a), and the same was done for others cholesterol conjugates used in all experiments.

Briefly, Cholesterol, 200 mg, was dissolved in 1 ml of chloroform. In a separate glass tube 1 g of methyl- β -cyclodextrin was dissolved in 2 ml of methanol. A 0.45 ml aliquot of the cholesterol solution was added to the cyclodextrin solution, stirred until the combined solution was clear, after which the mixture was poured into a glass Petri dish and the solvents removed using a stream of nitrogen gas. The resulting crystals were allowed to dry for an additional 24 hours, at which time they were removed from the dish and stored in a glass container at 22 °C. A working solution of the cholesterol-loaded cyclodextrin was prepared by adding 50 mg of CLC to 1 ml TALP (Graham et al., 1986) at 37 °C and mixed briefly using a vortex mixer.

Experiment 1: Effect of cholestanol or desmosterol loaded cyclodextrin addition to a fresh bull sperm ejaculates

Semen collection and processing

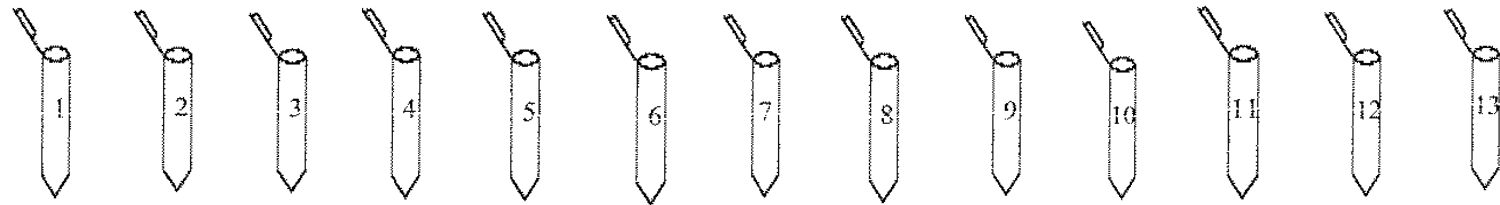
Semen from four bulls (8 ejaculate/bull) was collected using an artificial vagina. Immediately following collection, the concentration of sperm in each ejaculate was determined photometrically. Ejaculates from four bulls were diluted to 120 million cells in a Tris diluent and sub-divided into four treatments: No additive (control); 1.5 mg CLC/120 million sperm (positive control); and 1.5 mg/120 million sperm of cyclodextrin pre-loaded with cholestanol or desmosterol. The sperm treated were incubated for 15 min at 22 °C to allow for incorporation of compounds. After this period, samples from each treatment were used to determine the motility, osmotic tolerance

and ability of fresh sperm to bind to the zona pellucida (ZP) and the chicken egg perivitelline membrane (CEPM) using a Hamilton Thorne Motility Analyser (CASA) and epifluorescence microscopy, respectively.

Osmotic tolerance limits of fresh sperm

Fresh semen samples after incorporation of cholesteryl conjugates were centrifuged at 400 g for 8 minutes and the supernatant was removed. The remaining sperm pellets were resuspended into a 1.5 ml *ependorf* to a concentration of 1 billion cells/ml in Tris. A 20 µl aliquot of sperm was transferred into a 0.5 ml *ependorf* centrifuge tube containing 150 µl from one of the 13 anisotonic solutions of 0, 50, 75, 150, 225, 270, 300, 350, 370, 425, 500, 600 or 1200 mOsm in stock solution STALP and incubated at room temperature for 5 min. Then returned to near anisotonic sample into a 1.5 ml *ependorf* centrifuge tube containing different volumes of STALP each at a different osmotic pressure to return to isosmolality by removing 100 µl aliquot from each anisotonic sample into the a 1.5 ml *ependorf* centrifuge tube containing different volume of STALP solutions at different osmolalities to restore cells to an isotonic environment as follows: sperm at 0 and 50 mOsm were diluted into 300 µl of STALP at 380 mOsm; sperm at 75 to 500 mOsm were diluted into 400 µl of STALP at 300 mOsm; sperm at 600 mOsm were diluted into 300 µl of STALP at 300 mOsm; and sperm at 1200 mOsm were diluted into 300 µl of water (Figure 1; Meyers, 2007). The percentage of motile sperm in each sample was evaluated using CASA.

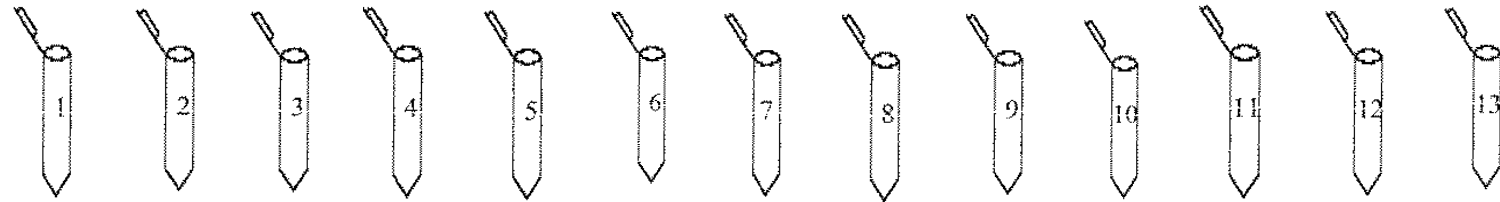
Incubation in STALP anisotropic solutions:



mOsm	0	50	75	150	225	270	300	350	370	425	500	600	1200
Anisotropic Solution	150 μ l	150 μ l	150 μ l	150 μ l	150 μ l	150 μ l	150 μ l	150 μ l	150 μ l	150 μ l	150 μ l	150 μ l	150 μ l
Semen	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l

Incubation: 5 minutes at 22 °C.

Return to isotonic conditions:



STALP (mOsm)	380	380	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	---
	300 μ l	300 μ l	400 μ l	400 μ l	400 μ l	400 μ l	400 μ l	400 μ l	400 μ l	400 μ l	400 μ l	300 μ l	---
Water Milipore	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	100 μ l	300 μ l
Sperm in anisotropic	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Final mOsm	295	306	261	275	288	296	301	310	314	323	340	294	275

Figure 1 – Anisotropic solutions assay.

Zona binding assay

Bovine oocytes

The fresh sperm from each treatment were stained with Hoechst and prepared one hour before the bovine oocytes insemination. Semen sample (2 ml fresh sperm diluted to 120×10^6) was centrifuged in 15 ml conical tubes at 400 g for 5 minutes. Following centrifugation, the supernatant from each tube was removed and discarded. The remaining sperm pellets were suspended in 1 ml of TALP with 35 μ l/ml Hoechst 33342, and incubated for 15 minutes at 37 °C water bath for 15 minutes, after wash at 400 g for 5 minutes and the sperm pellets were suspended to a final concentration of 5 million sperm/ml in TALP. Five ml aliquots (10,000 sperm) were added to droplets with 10 oocytes each.

The oocytes were aspirated from the follicles (approximately 2-4 mm in diameter) with a 20 gauge needle and the follicular fluid examined using a stereomicroscope with oocytes been placed in TALP. The oocytes cumulus cells were removed by vortexing for two minutes at maximum speed and the denuded oocytes then washed four times in TALP before being stored at 5 °C in a hyperosmotic solution (1.5 M $MgCl_2$, 40 mM HEPES, 0.1% PVP) until further use.

The oocytes were washed four times in TALP and incubated in TALP for 1 hour at 38.5 °C in an atmosphere of 5% CO_2 in air. After incubation, 10 oocytes were randomly placed into 45 μ l droplets of TALP (1 droplets/treatment) to which sperm were

added and incubated together at 38.5 °C in an atmosphere of 5% CO_2 in air for 2 hours after which the oocytes were washed four times in TALP, using a small-bore fire polished glass pipette to remove loosely bound sperm. Groups of five oocytes were placed onto glass slides and covered with a cover slip supported by a mix of paraffin wax and petroleum jelly (Coutinho da Silva, 2005). Oocytes were viewed using a quadriculate ocular in epifluorescence microscope (Eclipse E800, Nikon Instruments, Melville, NY) equipped with a 360/40 nm band pass excitation filter and a 460/50 nm band pass emission filter. The total number of sperm bound to each zona pellucida was determined at 400x magnification.

Chickene egg perivitelline membrane (CEPM) preparation

The ability of bull sperm to bind to the perivitelline membranes (PM) was conducted using the CEPM described by Barbato et al. (1998). PM was prepared by separation the egg yolk from the egg white, and removing the excess white from the yolk using a paper towel. The intact yolk was put onto a piece of parafilm, the membrane was ruptured and the yolk gently washed away using TALP keeping the membrane in the parafilm. The membrane was removed from the parafilm and placed into a 10 ml glass vial. The membrane was washed several times with TALP till the solution was clear and no visible yolk was present. The PM was then placed into a Petri dish, gently spread to a single layer and then cut into seven small squares (1x1 cm), using a scalpel and an spectrophotometer cuvette as a template. Each perivitelline piece was put into a culture tube (16x100 mm) containing 1 ml of TALP. Sperm from a control bull was evaluated using one PM square for each membrane.

Sperm from each treatment were evaluated using the other PM squares. Three separate PM were used to replicate each experiment. Each PM square was inseminated with 50×10^6 fresh sperm from different treatments. The membrane and the sperm were co-incubated for two hours, at 37 °C in an atmosphere of 5% of CO₂ in air, and the tubes gently shaken every 30 min to keep the membranes from folding. One hour before the end of the incubation time, 1 µl of Hoechst 33342 (1 mg/ml in water) was added to each of the tubes to get the sperm stained. After incubation, each membrane was placed into a new tube containing 1 ml TALP and the membranes washed 5 times to remove any unbound sperm. Each PM square was placed onto a glass slide, gently spread to remove any folds, covered with a coverslip and examined using fluorescence microscopy at 400x (Graham, not published).

The number of sperm bound to the membrane in 6 predetermined fields of each membrane square was determined. The relative number of sperm bound per membrane for each bull was calculated, by dividing the total sperm number bound to that particular PM by the number of sperm bound by the control bull sperm to the same membrane. The three replicate membranes means were then determined for each bull (Spizziri, 2007).

Experiment 2: Effect of adding cholestanol or desmosterol to bull sperm membranes on the cryosurvival

Semen collection, processing and cryopreservation

Semen from four bulls (8 ejaculates) was collected using an artificial vagina. Immediately following collection, the sperm concentration of each ejaculate was determined photometrically. Ejaculates from each of four bulls were diluted to 120 million cells in a Tris diluent and sub-divided into four treatments: No additive (control); 1.5 mg CLC/120 million sperm (positive control); and 1.5 mg/120 million sperm of cyclodextrin pre-loaded with cholestanol or desmosterol. Then, the sperm treated were incubated for 15 min at 22 °C to allow for incorporation of the compounds. After this period, each semen were diluted 1:1 (v:v) in Tris with 20% EY and cooled to 5 °C. After dilution 1:2 (v:v) with Tris containing 10% EY and 16% glycerol for final concentration of 15 million sperm/ml the dilution was allowed to equilibrate for 15 minutes before packaging into 0.5 ml French straws, freezing in static liquid nitrogen vapor for 20 minutes and plunging into liquid nitrogen for storage (Mocé and Graham, 2006). Straws were thawed (37 °C for 30 second) to determine the motility and the ability of the sperm to bind to the CEPM using CASA and Epics V Flow Cytometer, respectively (Purdy et al., 2004).

Motility analysis

Straws were thawed in a 37 °C water bath for 30 seconds and the sperm motile characteristics were determined after 10 minutes using CASA. The percentage of total motility sperm for a minimum of 200 cells using at least five areas of the slide were measured using the following parameters: frames acquired, 30; minimum contrast, 20; minimum cell size, 6; threshold straightness, 60; medium VAP cut-off, 60; low VAP cut-off, 25; low VSL cut-off, 10; non-motile head size, 17; non-motile head intensity, 70; magnification, 1.95; static size limits, 0.46–2.47; static intensity, 1.28; and static elongation limits, 5–60.

Chicken egg perivitelline membrane (CEPM) binding assay

CEPM was prepared identical to the ones from experiment 1.

The frozen/thawed sperm from each treatment were stained with Hoechst after PM preparation. Two straws were used and suspended in 1 ml TALP and centrifuged in 15 ml conical tubes at 400 g for 5 minutes. Following centrifugation, the supernatant from each tube was removed and discarded. The remaining sperm pellets were suspended in 1 ml of TALP with 35 µl/ml Hoechst 33342 and incubated for 15 minutes at 37 °C water bath. After this period, the samples were washed at 400 g for 5 minutes and the sperm pellets were suspended to a final concentration of 5 million sperm/ml in TALP (Mocé and Graham, 2006).

Sperm from a control bull was evaluated using one PMs square for each membrane. Sperm from each treatment were evaluated using the others PMs squares. Three separate PM were used to replicate each experiment. Each PM piece was inseminated with 5 µl aliquots (10,000 sperm) from the different bulls. The membranes and the sperm were co-incubated for two hours, at 37 °C in an atmosphere of 5% of CO₂ in air, and the tubes gently shaken every 30 min to keep the membranes from folding. One hour before the end of the incubation, 5 µl aliquots (10,000 sperm prepared) will be added to each tube containing perivitelline membranes. After incubation, each membrane was placed into a new tube containing 1 ml TALP and the membranes was washed 5 times to remove any unbound sperm (Graham, not published).

Each PM square was placed onto a glass slide, gently spread to remove any folds, covered with a coverslip and examined using fluorescence microscopy at 400x.

The number of sperm bound to the membrane in 6 predetermined fields of each membrane piece was determined. The relative number of sperm bound per membrane for each bull was calculated, by dividing by the total sperm number bound to that particular PM by the number of sperm bound by the control bull sperm to the same membrane preparation. The three replicate membranes means were then determined for each bull (Spizziri, 2007).

Experiment 3: Cholesteryl-heptanoate, -palmitate, -pelargonate, or –stearate loaded cyclodextrin added to fresh bull ejaculates to improve sperm cryosurvival

Semen collection, processing and cryopreservation

Semen from four bulls was collected using an artificial vagina. Immediately following collection, the sperm concentration in each ejaculate was determined photometrically. Ejaculates from each of four bulls were diluted to 120 million cells in a Tris diluent and sub-divided into 10 treatments: No additive (control); 1.5 mg CLC (positive control); 0.75 mg or 1.5 mg of cyclodextrin pre-loaded with cholesterol conjugated to heptanoate, palmitate, pelargonate or stearate. The sperm treated were incubated for 15 min at 22 °C to allow for incorporation of cholesteryl conjugates. After this period, the samples from each treatment were diluted 1:1 (v:v) in Tris with 20% EY and cooled to 5 °C. After 1:1 (v:v) dilution with Tris containing 10% EY and 16% glycerol, samples were allowed to equilibrate for 15 minutes before packaging into 0.5 ml French straws, freezing in static liquid nitrogen vapor for 20 minutes and plunging into liquid nitrogen for storage (Mocé and Graham, 2006). Straws were thawed to determine the sperm motility and its ability to bind to the ZP and its viability using CASA, epifluorescence microscopy and Epics V Flow Cytometer, respectively.

Motility analysis

Straws were thawed and the percentages of motile sperm were determined as described in Experiment 2.

Viability analysis

Straws were thawed as described above and the contents of one straw per treatment emptied into a test tube containing 1ml of Tris diluent. Sperm were stained for flow cytometric analysis by transferring a 0.5 ml aliquot from each tube into a second tube containing 0.5 ml Tris, 5 µl SYBR-14 (20 µM solution in Me₂SO), and 10 µl propidium iodide (PI; 2.4mM solution in water; Molecular Probes, Eugene OR) as described by Garner et al. (1994) and Purdy and Graham (2004). The samples were incubated for 10

minutes at 22 °C before being analyzed using an Epics V flow cytometer (Coulter Electronics, Miami, FL) equipped with an argon laser tuned to 488nm at 100mW power. Fluorescence from 50,000 cells was measured using a 515 long-pass filter, a 525 nm band-pass filter to detect SYBR-14, a 590nm dichroic mirror, and a 630 nm long-pass filter to detect PI (Garner et al., 1994). Using this protocol, all cells stained with SYBR-14, permitted cells to be distinguished from egg yolk particles, but only non-viable cells stained with PI.

The fluorescent stained of sperm was monitored and photographed with a Zeiss Axiophot epifluorescent microscope (Carl Zeiss Inc., Thornwood, NY) equipped with a fluorescein isothiocyanate filter set (Zeiss #487909). Ektachrome 400 (Eastman Kodak, Rochester, NY) slide film was used to photograph sperm (30 seconds).

Chicken egg perivitelline membrane binding assay

The cryopreserved sperm straws used were 1.5 mg cholesterol, 0.75 mg of pelargonate and 1.5 mg of stearate loaded cyclodextrin, which were used to determine the sperm ability to bind to the chicken egg perivitelline membrane.

Straws were thawed and the percentage of motile sperm and number sperm binding to CEPM were determined as described in Experiment 2.

Statistical analysis

Percentages of motile (total and progressive), viable cells, osmotic tolerance and zona binding were analyzed by analysis of variance and treatment differences separated by Student-Newman-Keuls (SNK) mean separation technique (SAS, 1985). Data of motile were transformed to minimize variation due to bulls. Data were transformed within each ejaculate by subtracting each treatment from its own control value.

Data from zona binding assay were transformed by square root transformation to adjust for unequal variances. To find the binding potential of an individual sperm cell data were also normalized to take into account the percentage of motility sperm added to each CEPM. To find the sperm motility number bound to the CEPM the total sperm number mean bound for each

bull was divided by the percent motile sperm (Spizirri, 2007). Data were then analyzed by paired *t* test for the pair-wise comparison between treatments (SAS, 1985).

RESULTS

Experiment 1

Percentages of total and progressively motile sperm were similar for fresh semen treated with CLC, cholestanol, desmosterol and control (Table 1; $P>0.05$).

Table 1 - Percentages of total and progressive motility in fresh bull sperm treated with 0 (Control) or 1.5 mg steroids-loaded cyclodextrins before cryopreservation

Motility (%)	Control	Cholesterol	Cholestanol	Desmosterol
Total	93 ^a	92 ^a	94 ^a	96 ^a
Progressive	21 ^a	21 ^a	25 ^a	26 ^a

^aDifferent superscripts within rows indicate treatment differences ($P>0.05$).

The percentages of total and progressively motilit sperm were higher than controls for fresh samples treated with cholesterol, cholestanol or desmosterol loaded cyclodextrin exposed to anisosmotic conditions 0, 50, 75, 150 and 225 mOsm; 0, 50 and 75 mOsm; and 50 and 75 mOsm, respectively, which returned to isosmolality and the control samples did not (Figure 2 and 3; $P<0.05$).

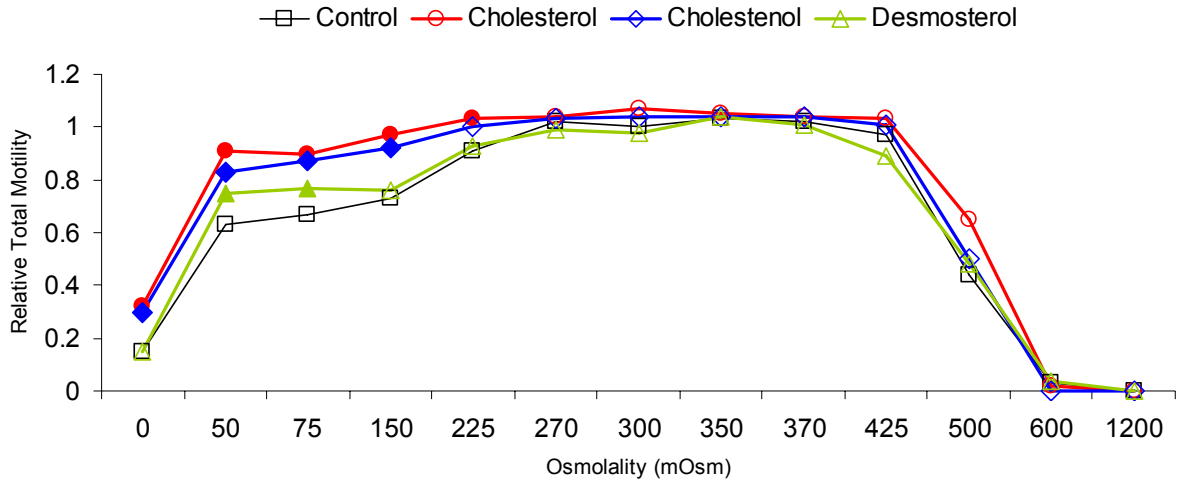


Figure 2 – Relative of total sperm motility after return to isosmotic conditions. Filled symbols indicate that a treatment is different from control at a particular osmolality ($P < 0.05$).

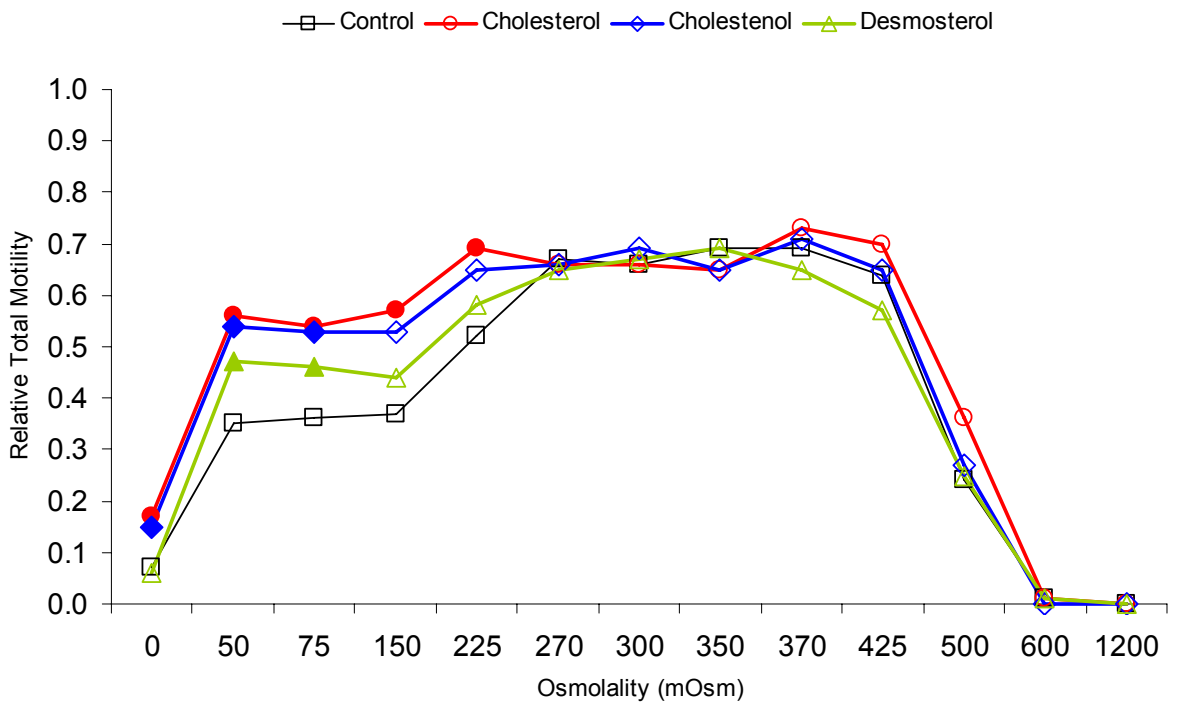


Figure 3 – Relative of progressively motile sperm after return to isosmotic conditions. Filled symbols indicate that a treatment is different from control at a particular osmolality ($P < 0.05$).

Treating fresh bull sperm with CLC resulted in increased sperm number binding to the chicken egg perivitelline membrane (CEPM; Figure 4) and bovine zona pellucida (BZP; Figure 5) compared to cholesterol or desmosterol loaded cyclodextrin and controls cells (Table 2; $P < 0.05$). The CEPM and ZP binding capacities did not differ between themselves (Table 2; $P > 0.05$). The ocular field visualization was better for sperm number binding to the perivitelline membrane than bovine zona pellucida (Figure 4 and 5, respectively).

Table 2 – Percentages of fresh sperm bound to chicken egg perivitelline membrane (CEPM) and bovine zona pellucida (ZP)

Treatments	CEPM	ZP
Control	1.00 ^{C,a}	1.00 ^{C,a}
Cholesterol	1.81 ^{A,a}	1.55 ^{A,a}
Cholestanol	1.42 ^{B,a}	1.26 ^{B,a}
Desmosterol	1.24 ^{BC,a}	1.20 ^{B,a}

^{A,B,C}Different superscripts within columns indicate treatment differences for SNK ($P < 0.05$).

^aDifferent superscripts within rows indicate membrane differences ($P < 0.05$).

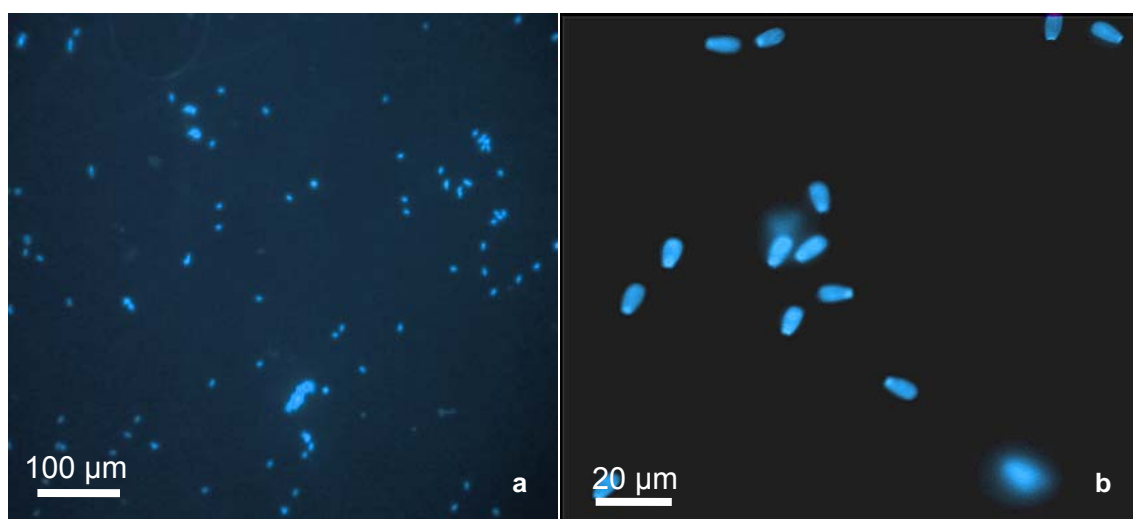


Figure 4 – Egg perivitelline membrane (a,b).

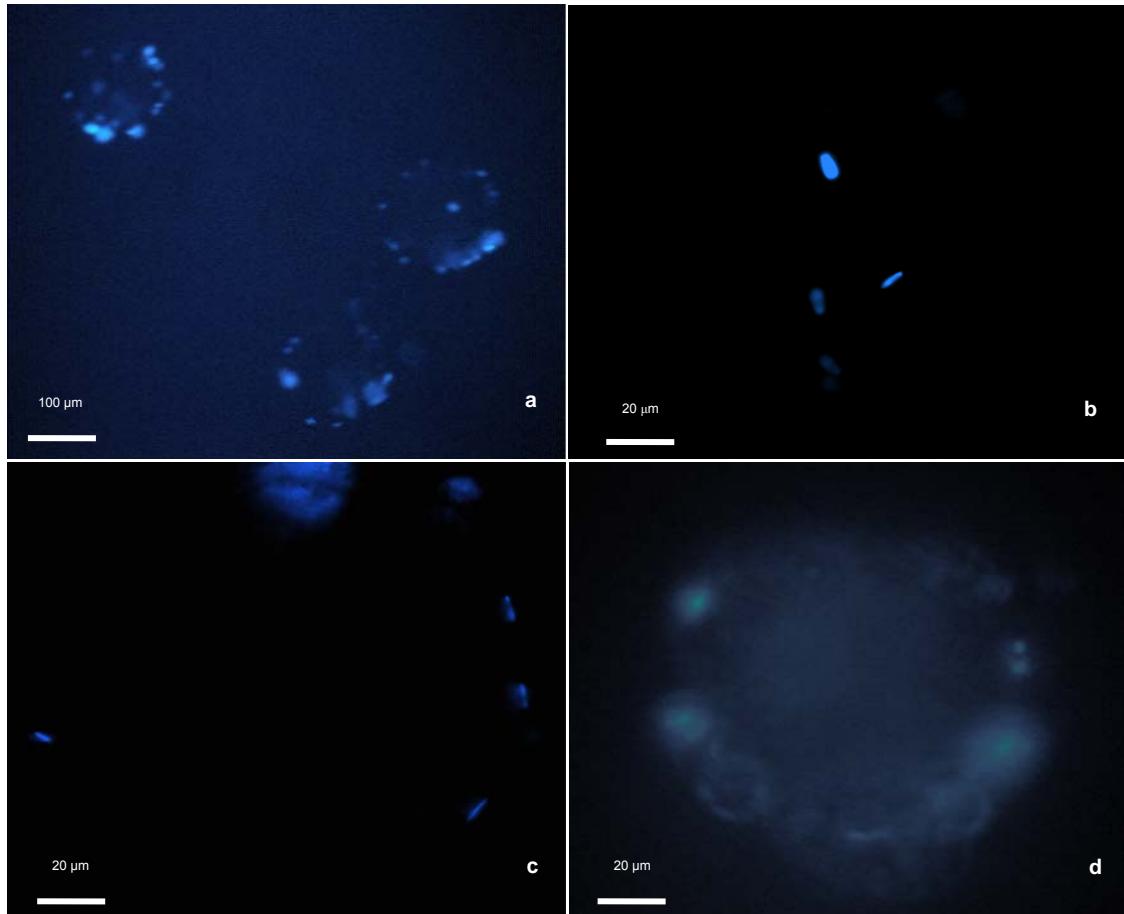


Figura 5 – Bovine zona pellucida at different focus (a, b, c, d).

Experiment 2

After cryopreservation the percentages of sperm motility and the number of sperm binding to each CEPM were similar to sperm treated with CLC (56% and 115 sperm/CEPM, respectively) and cholestanol (53% and 108 sperm/CEPM, respectively; $P>0.05$) and both differ from desmosterol treated ones (42% and 86 sperm/CEPM, respectively; Table 3; $P<0.05$). However, when the sperm binding potential was determined on a motile sperm basis by dividing the average number of sperm bound to a chicken egg perivitelline membrane for each bull by the percentage of motile sperm, all treatments showed a higher motility and binding efficiency than control sperm (32% and 62 sperm/CEPM, respectively; Table 3; $P<0.05$).

Table 3 – Percentages of total and progressive motility and the number of sperm bound to chicken egg perivitelline membrane (NSBEM)

Treatments	Total Motility	Progressive Motility	NSBEM
Control	32 ^C	9 ^B	62 ^C
Cholesterol	56 ^A	16 ^A	115 ^A
Cholestanol	53 ^A	15 ^A	108 ^A
Desmosterol	42 ^B	11 ^{AB}	86 ^B

^{A,B,C}Values different within columns indicate treatment differences (P<0.05).

Experiment 3

Bull sperm frozen containing 1.5 mg CLC and 0.75 mg pelargonate exhibited higher percentages of motility sperm (55% and 46%, respectively) than the other treatments (37-24%, respectively; Figure 6; P<0.05).

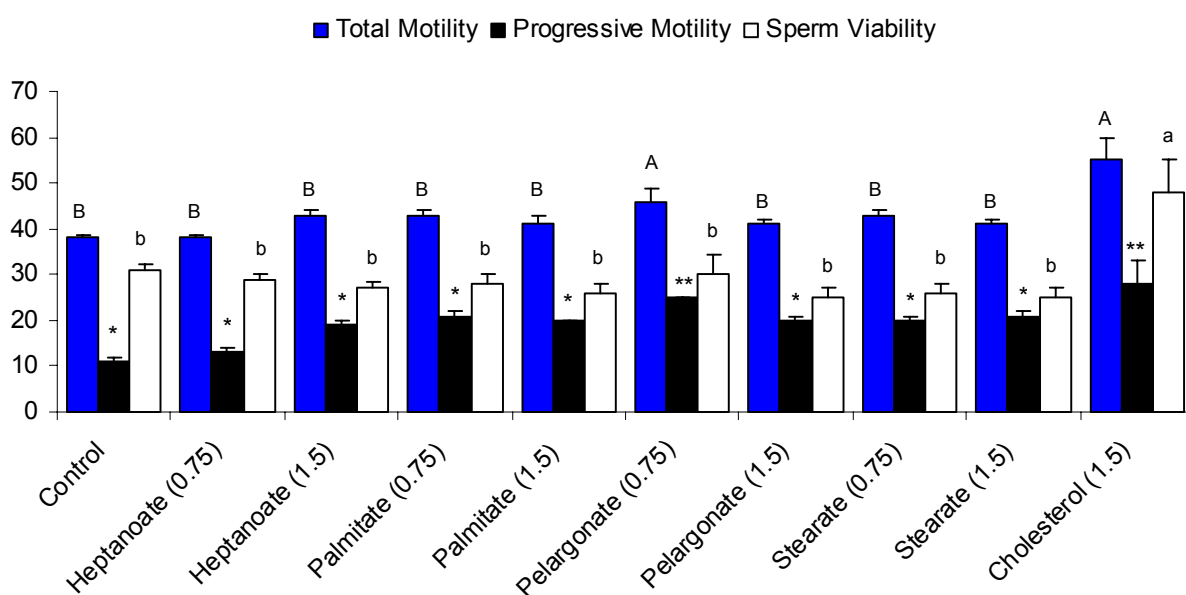


Figure 6 – Percentages of total and progressive motility and viability in fresh bull sperm treated with CLC and cholesteryl conjugates before cryopreservation.

Higher percentages of viable cells (Figure 7) were maintained after thawing for bull sperm treated with CLC and 0.75 mg pelargonate (45% and 30%, respectively, Figure 6) than others treatments (24-28%, respectively;

Figure 6; $P < 0.05$). Control and treated sperm with heptanoate, palmitate, or stearate loaded cyclodextrin exhibited similar percentages of motile and viable sperm after freezing (Figure 6; $P > 0.05$).

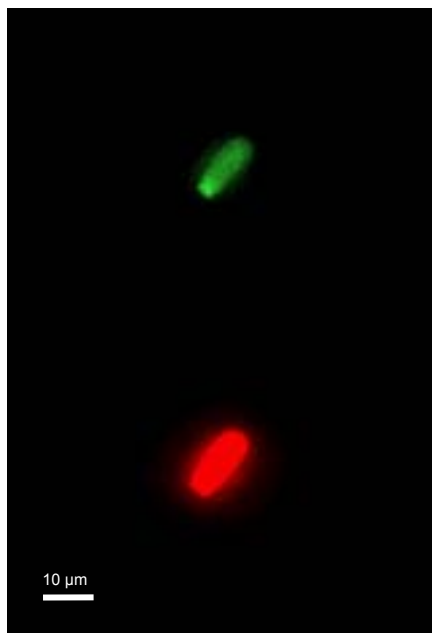


Figure 7 – Bull sperm stained with SYBR-14 and PI. Live sperm are stained green and dead sperm are stained red.

Percentages of number of sperm binding to each CEPM were higher for sperm treated with CLC (157 sperm/CEPM; $P < 0.05$) followed by pelargonate (118 sperm/CEPM) when compared to sperm treated with stearate and control cells (88 and 85 sperm/CEPM, respectively; Table 4; $P < 0.05$).

Table 4 – Percentages of total motility and number of sperm binding to each chicken egg perivitelline membrane (NSBEM)

Treatments	Total Motility	NSBEM
Control	40 ^B	85 ^C
Cholesterol (1.5 mg)	54 ^A	157 ^A
Pelargonate (0.75 mg)	52 ^{AB}	118 ^B
Stearate (1.5 mg)	41 ^B	88 ^C

^{A,B,C} Values different within columns indicate treatment differences ($P < 0.05$).

DISCUSSION

Bull sperm treated with CLC (1.5 mg CLC/120x10⁶ sperm) prior to cryopreservation increases the percentages of motile sperm after thawing. Similar results were found by Mocé and Graham (2006) in which cholesterol-loaded into methyl- β -cyclodextrin improved both the percentages of motile and membrane intact sperm after cryopreservation, using the CLCs concentration of 2 mg. Previous studies using diluted bull or stallion sperm also reported similar results when similar concentrations of CLCs were added to sperm prior to cryopreservation (Purdy and Graham, 2004a,b; Moore et al., 2005) with the same concentration.

Purdy and Graham (2004a) also found a significant difference in post thaw motility for CLC-treated bull sperm (60 vs 42%). In the present study, the CLC-treated sperm exhibited a higher motility percentages (24%) than the control one. A sperm motile number increase, were observed for CLC and pelargonate (49 and 24%, respectively) treatments or CLC, cholestanol and desmosterol (75, 65 and 31%, respectively) treatments.

In this study, bull sperm incubated with CLCs prior to freezing, resulted in higher recovery percentages of motile and viable cells after cryopreservation. Similarly, others have reported that stallion sperm treated with cholesterol-loaded methyl- β -cyclodextrin maintained higher percentages of motile and viable sperm after cryopreservation than untreated sperm Combes et al., 1998; Graham, 1998).

Percentages of live cells increased (from 24 to 45 and 30 percentages greater than the control samples), when sperm were treated with 1.5 mg of CLC and 0.75 mg of pelargonate to 120x10⁶ sperm. Previous studies using diluted bull or stallion sperm reported similar increases in the percentage of live sperm (between 9 and 20 percentage greater compared with the control samples), when similar concentrations of CLC were added to sperm before cryopreservation (Combes et al., 2000; Purdy and Graham, 2004a). Fluorometry is an indirect method of assessing the percentage of membrane-intact cells in a semen sample (Bilgili and Renden, 1984; Graham, 2001). Then, these results showed the protective effect of CLC and pelargonate on the plasma membrane during cryopreservation. The optimal level of

cholesterol- and pelargonate- for cryopreservation of bull sperm was 1.5 and 0.75 mg -loaded cyclodextrin/120 million sperm, respectively.

In this study, CLC and cholestanol in fresh sperm showed higher motility after been exposed to anisotonic STALP solution and the turn back to isotonic conditions to evaluate the osmotic tolerance of desmosterol and control. Because during cryopreservation, cells are first exposed to hyperosmotic cryoprotective agent (CPA) solutions that causes an initial efflux of intracellular water, followed by an influx of permeating CPA and water as the cells undergo equilibration. And the addition of permeating cryoprotectants creates an anisotonic environment for the sperm, if removed causes large increases in cell volume leading to membrane damage or lysis (Guthrie et al., 2002). These series of osmotic changes in the cell environment during the cryopreservation procedure may adversely affect the integrity of the sperm, resulting in the loss of the ability to participate in fertilization. The optimal osmotic tolerance observed in fresh bull sperm treated with CLC and cholestanol, indicates that the sperm of both treatments possibly could be resistant to membrane damage during cryopreservation.

Purdy et al. (2005) demonstrated increased membrane fluidity at lower temperatures for bull sperm treated with CLC than for untreated sperm. On the other hand, cholesterol could be increase sperm membrane permeability and lessening the osmotic cell damage, because CLC treatment increases the osmotic tolerance of stallion sperm (Moore et al., 2005).

Assays that evaluate the ability of sperm to bind to the zona pellucida *in vitro* have also been developed. This assay evaluates the effectiveness (concentration and capacity) of sperm receptors to bind to the oocyte, the oolemma and initiate fertilization. Parameters of fertility (Graham, 1996) as sperm receptors may be utilized as a tool to determine the ability of a sperm population to bind to the zona pellucida, acrosome reaction, and penetration of the oocyte (Brackett et al., 1982; Pantke et al., 1995; Carrell, 2000), being these parameters of fertility. Brackett et al. (1982) suggested that if sperm do not undergo capacitation and the acrosome reaction *in vitro*, they will be unable to fertilize the oocyte.

In this study, the perivitelline membrane of the chicken's egg binding assay confirmed that fresh and/or frozen bull sperm can bind to the CEP, indicating that the perivitelline membrane of the chicken's egg possesses receptors that can bind bovine sperm. This is confirmed for most mammalian species and the CEP is comprised of three glycoproteins, ZP1, ZP2, and ZP3. One of the zona pellucida proteins is a receptor for species-specific attachment of capacitated sperm and another zona pellucida protein induces the acrosome reaction on zona pellucida bound sperm. Removal of the zona pellucida eliminates some of the species specificity for sperm to bind to and fertilize an oocyte (Sinowitz et al., 2003), allowing for an effective *in vitro* assay of sperm quality. Binding to the zona pellucida has been correlated to fertilizing potential of the sperm from several species using homologous and heterologous oocytes (Brackett et al., 1982; Fazeli et al., 1993; Pantke et al., 1995; Braundmeier et al., 2002; Sinowitz et al., 2003). Although, not specifically observed in this experiment, previous reports suggest that the sperm bound to the ZP will undergo an acrosome reaction and are capable of penetration (Sinowitz et al., 2003)

In vitro assay in which the sperm number bound to the zona pellucida (either whole or pieces of the zona pellucida) after incubation for a set period of time have been developed for sperm from humans, bulls, boars, stallions and other species. Part of the difficulty in conducting these assays is to obtain sufficient numbers of zona pellucidae. Molecular similarity between the zona pellucida and the perivitelline membrane of the chicken's egg permit sperm from many species, including bull sperm to bind to the perivitelline membrane. Setting up such an assay is simple and chicken perivitelline membrane material is plentiful (Graham and Mocé, 2005).

Regardless, zona pellucida binding assays may be useful to determine sperm-oocyte/perivitelline membrane interactions, an important part of the fertilizing process. In this study, no difference was observed in the results between chicken egg perivitelline membrane and bovine zona pellucida binding assays. For both, chicken egg perivitelline membrane and bovine zona pellucida. The fresh sperm treatment with CLC in fresh sperm showed better percentages of bound than cholestanol and desmosterol loaded cyclodextrin and control cells.

Freezing causes a loss of cholesterol or cryocapacitation (Cormier and Bailey, 2003). With higher cholesterol concentrations prior to cooling combined with a lower amount of cholesterol lost during cryopreservation, the overall higher cholesterol content of CLC-treated sperm after thawing may prevent premature capacitation and increase longevity of cryopreserved sperm. However, the additional plasma membrane cholesterol may affect capacitation and the acrosome reaction in cells (Purdy and Graham, 2004b). In this study, after cryopreservation, perivitelline membrane of the chicken's egg binding assay confirmed that CLC and cholestanol added to the sperm membrane may increase the sperm bound number.

Further studies need to be conducted to determine if pelargonate and cholestanol affects sperm capacitation after cryopreservation.

CONCLUSION

Adding cholesterol or cholestanol or pelargonate to bull sperm membranes improved cell cryosurvival, whereas treatments with cyclodextrins preloaded with other cholesterol-like molecules did not.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Colorado State University Experiment Station at Colorado State University (Fort Collins – CO – USA), CNPq (Entity of the Brazilian Government for to the Scientific and Technological Development) and FAPEMIG (Brazil).

REFERENCES

- AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Sperml Function. In: McKinnon, A.O., Voss, J.L. (Eds)., Equine Reproduction. Lea and Febiger. Philadelphia, London. pp. 715-745, 1993.
- BARBATO, G.F.; CRAMER, P.G.; HAMMERSTEDT, R.H. A practical *in vitro* sperm-egg binding assay that detects subfertile males. *Biology of Reproduction*, 58(3):686-699, 1998.
- BILGILI, S.F.; RENDEN, J.A. Fluorometric determination of avian sperm viability and concentration. *Poultry Sci* 63:2275–7, 1984.

- BRACKETT, B.G.; COFONE, M.A.; BOICE, M.L.; BOUSQUET, D. Use of zona-free hamster ova to assess sperm fertilizing ability of bull and stallion. *Gamete Res.* 5: 217-227, 1982.
- BRAUNDMEIER, A.G., DEMERS, J.M., SHANKS, R.D., SAACKE, R.G., MILLER, D.J. Examination of the binding ability of bovine sperm to the zona pellucida as an indicator of fertility. *J. Androl.* 23(5):645-51, 2002.
- CARRELL, D.T. Semen analysis at the turn of the century: an evaluation of potential uses of new sperm function assays. *Arch. Androl.* 44(1):65-75, 2000.
- CHRISTIAN, A.E.; HAYNES, M.P.; PHILLIPS, M.C.; ROTHBLAT, G.H. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J. Lipid Res.*, 38:2264-2272, 1997.
- COMBES, G.B.; VARNER, D.D.; SCHROEDER, F.; BURGARDT, R.C.; BLANCHARD, T.L. Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine sperm after thawing. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 56:127-132, 2000.
- COMBES, G.B.; VARNER, D.D.; SCHROEDER, F.; BURGARDT, R.C.; BLANCHARD, T.L. Effect of supplemental cholesterol on postthaw motility and plasma membrane integrity of equine sperm. In: *Proceedings of the 7th International Symposium on Equine Reproduction*; Pretoria, South Africa, p.35–36, 1998.
- CORMIER, N.; BAILEY, J.L. A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation. *Biol. Reprod.* 69:177-185, 2003.
- COUTINHO DA SILVA, M.A. Effect of milk proteins on intracellular C^{2+} concentration and stallion sperm binding to zonae pellucidae. Thesis (Ph.D.) – Colorado State University, Department of Biomedical Sciences. 2005. 100p.
- FAZELI, A.R., STEENWEG, W., BEVERS, M.M., DE LOOS, F.A., VAN DEN BROEK, J., COLENBRANDER, B. Development of a sperm zona pellucida binding assay for bull semen. *Vet. Rec.* 132(1):14-6, 1993.
- GARNER, D.L.; JOHNSON, L.A.; YUE, S.T.; ROTH, B.L.; HAUGLAND, R.P.; Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14A and propidium iodide, *J. Androl.* 15:620-629, 1994.

- GARNER, D.L.; JOHNSON, L.A.; ALLEN, C.H. Fluorometric evaluation of cryopreserved bovine sperm extended in egg yolk and milk. *Theriogenology* 30:369–378, 1988.
- GARNER, D.L.; JOHNSON, L.A. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol Reprod* 53:276–284, 1985.
- GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, 64:492-504, 2005.
- GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol Reprod* 43:55–64, 1990.
- GRAHAM, J.K.; FOOTE, R.H.; PARRISH, J.J. Effect of dilauroyphosphatidylcholine on the acrosome reaction and subsequent penetration of bull sperm into zona-free hamster eggs. *Biol. Reprod.* 35:413-424, 1986.
- GRAHAM, E.F.; SCHMEHL, M.K.L.; NELSON, D.S. Problems with laboratory assays. In: *Proceedings of the Eighth Technical Conference on Artificial Insemination*; 1980. p. 59–66.
- GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim Reprod Sci* 68:239–247, 2001.
- GRAHAM, J.K. An update on semen extenders and cyoprotectants. In: *Proceedings of the 17th Technical Conference on A.I. and Reprod.*, 1998, Madison, WI, pp.32-36, 1998.
- GRAHAM, J.K. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.* 12 (1):119-129, 1996.
- GUTHRIE, H.D.; LIU, J.; CRITSER, J.K. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine sperm. *Biol. Reprod.*, 67:1811-1816, 2002.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62:3-22, 2000.
- JASKO, D.J., LEIN, D.H., FOOTE, R.H. The repeatability and effect of season on seminal characteristics and computer-aided sperm analysis in the stallion. *Theriogenology* 35(2):317-27, 1991.

- KLEIN, U.; GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with β -cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochem*, 34:13784–13793, 1995.
- LADBROOKE, B.D.; WILLIAMS, R.M.; CHAPMAN, D. Studies on lecithin-cholesterol-water interactions by differential scanning calorimetry and X-ray diffraction. *Biochim Biophys Acta*, 150:333–340, 1968.
- LIU, D.Y., Garrett, C., Baker, H.W. Low proportions of sperm can bind to the zona pellucida of human oocytes. *Hum. Reprod.* 18(11):2382-9, 2003.
- MAZUR, P. Cryobiology: the freezing of biological systems, *Science* 168:939–949, 1970.
- MAZUR, P.; RALL, W.F.; LEIBO, S.P. Kinetics of water loss and likelihood of intracellular freezing in mouse ova: influence of the method of calculating the temperature dependence of water permeability. *Cell Biophys.* 6:197-214, 1984.
- MEYERS, M.A. Cryopreserving sex-sorted stallion spermatozoa. Thesis (M.S.) – Colorado State University, Department of Biomedical Sciences. 2007. 108p.
- MOCÉ, E.; GRAHAM, J.K. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. *Journal Animal Science*, 84:826-833, 2006.
- MORRIER, A.; THÉRIAULT, M.; CASTONGUAY, F.; BAILEY, J.J. Effect of cholesterol loaded methyl- β -cyclodextrin on ram sperm during cryopreservation, cold-shock and artificial insemination. *Proceedings of the Society for the Study of Reproduction Meeting*. Vancouver, Canada. p.239 (Abstr. 636), 2004.
- MOORE, A.I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology* 51:241–249, 2005.
- MULLER, C.H. The andrology laboratory in an Assisted Reproductive Technologies program. Quality assurance and laboratory methodology. *J. Androl.* 13(5):349-60, 1992.
- NAVRATIL, A.M.; BLISS, S.P.; BERGHORN, K.A.; HAUGHIAN, J.M.; FARMERIE, T.A.; GRAHAM, J.K.; CLAY, C.M.; ROBERSON, M.S.. Constitutive localization of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH)

- receptor to low density membrane microdomains is necessary for GnRH signaling to ERK. *J. Biol. Chem.*, 278:31593-31602, 2003.
- PANTKE, P.; HYLAND, J.K.; GALLOWAY, D.B.; LIU, D.Y., BAKER, H.W.G. Development of a zona pellucida-sperm binding assay for the assessment of stallion fertility. *Biol. Reprod. Mono. Series 1*, 681- 687, 1995.
- PARKS J.E.; LYNCH, D.V. Lipid composition and thermotropic phase behaviour of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 29:255-266, 1992.
- PURDY, P.H.; FOX, M.H.; GRAHAM, J.K. The fluidity of Chinese hamster ovary cell and bull sperm membranes after cholesterol addition. *Cryobiology* 51:102–112, 2005.
- PURDY, P.H.; GRAHAM, J.K. Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility, *Biol. Reprod.* 71:522–527, 2004b.
- PURDY, P.H.; GRAHAM, J.K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*, 48:36-45, 2004a.
- ROTTEM, S., YASHOUV, J., NE'EMAN, A., RAZIN, A. Composition, ultra-structure and biological properties of membrane from *Mycoplasma mycoides* var. *capri* cells adapted to grow with low cholesterol concentrations. *Biochim. Biophys. Acta.* 323:495-508, 1973.
- SAS Institute Inc., *SAS User's Guide: Statistics*, 1985 ed., SAS Institute Inc., Cary, NC, 1985.
- SINOWATZ, F., WESSA, E., NEUMULLER, C., PALMA, G. On the species specificity of sperm binding and sperm penetration of the zona pellucida. *Reprod. Domest. Anim.* 38(2):141-146, 2003.
- SPIZZIRRI, B.E. Effect of cholesterol-loaded-cyclodextrins on fertility potential of stallion spermatozoa. Thesis (M.S.), Colorado State University, Department of Biomedical Sciences. 2007. 96p.
- STEPONKUS, P.L.; DOWGERT, M.F.; GORDON-KAMM, W.J. Destabilization of the plasma membrane of isolated plant protoplasts during freeze–thaw cycle: the influence of cold acclimation, *Cryobiology*, 20:448–465, 1983.

- TONER, M.; CRAVALHO, E.G.; HUGGINS, C.E. Thermodynamics and kinetics of intracellular ice formation during freezing of biological cells, *J. Appl. Physiol.* 69:1582–1593, 1990.
- VISCONTI, P.E.; GALANTINO-HOMER, H.; NING, X.; MOORE, G.D.; VALENZUELA, J.P.; JORGEZ, C.J.; ALVAREZ, J.G.; KOPF, G.S. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J. Biol. Chem.* 274(5):3235-42, 1999.
- WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In.: *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*. G. J. Morris and A. Clarke, eds. Academic Press, London, p.189-218, 1981.
- WHITE, I.G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod. Fertil. Dev.*, 5:639-658, 1993.
- WILHELM, K.M., GRAHAM, J.K., SQUIRES, E.L. Comparison of the fertility of cryopreserved stallion sperm with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. *Theriogenology* 46(4):559-78, 1996.
- WOODS, E.J.; BENSON, J.D.; AGCA, Y.; CRITSER, J.K. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues, *Cryobiology* 48:146–156, 2004.

DELIVERING CHOLESTEROL OR CHOLESTANOL TO STALLION SPERM MEMBRANES IMPROVES CRYOSURVIVAL

E.A.M. Amorim^{a,b}, J.K. Graham^a, C.A.A. Torres^b

^aDepartment of Biomedical Sciences, Colorado State University, 1680
Campus Delivery, Fort Collins, CO 80523, USA

^bDepartment of Animal Science, Federal University of Vicosa, Vicosa, MG
36570000, Brazil

ABSTRACT

The objective of this study was to compare the effect of adding cholesterol and cholestanol loaded cyclodextrins in stallion sperm prior to cryopreservation to optimize sperm cryosurvival. Ejaculates from each of 8 stallions were diluted to 120 million cells in a STALP diluent. The diluted sperm were sub-divided into three treatments: No additive (control); 1.5 mg CLC/120 million sperm (positive control); and 1.5 mg/120 million sperm of cyclodextrin pre-loaded with cholestanol/120 million sperm. To set the experiments, the treated sperm were incubated for 15 min at 22 °C to allow for incorporation of cholesteryl conjugates. After this period, the semen was diluted 1:5 (v/v) with Lactose-Egg Yolk diluent and cooled to 5 °C over a 2 hours period. Loaded into 0.25 mL polyvinylchloride straws, frozen in liquid nitrogen vapor for 10 min, and then plunged into liquid nitrogen until further use. Higher percentages of motile sperm were maintained after thawing when 1.5 mg CLC was added to sperm from stallions which did not give a good response to previous freezing, compared to cholestanol and control sperm from the same stallions ($P < 0.05$). Addition of CLC also resulted in more sperm binding to the zona pellucida of bovine oocytes after cryopreservation than cholestanol and control sperm ($P < 0.05$). In conclusion, CLC improved the percentage of post-thaw motility of equine sperm as well as increased the number of sperm that bind to zona pellucida.

Keywords: Cryopreservation, Equine, Motility, Semen, Steroids, Zona binding.

INTRODUCTION

Cryopreservation induces partially irreversible damage to sperm that result in reduced fertility for frozen sperm from many stallions compared to fresh or cooled ones. Damage occurs to sperm membranes when the spermatozoa are cooled to 5°C and during cryopreservation. During this transition phase, phospholipids are lost from the plasma membrane due to the increased membrane permeability, and disruption, and cell death (Darin-Bennett et al., 1973; Watson, 1981). Previous studies indicate that the cholesterol/phospholipid ratio of the plasma membrane is a major determinant in plasma membrane fluidity and stability during cryopreservation (Darin-Bennett and White, 1977; Watson, 1981). Recently, techniques to increase sperm membrane cholesterol levels have increased cryosurvival rates of bull and stallion sperm (Purdy and Graham, 2004a; Moore et al., 2005; Purdy et al., 2005).

The membrane transition temperature is reduced by cholesterol, which keep it into a fluid state thereby reducing the membrane damage that occurs at low temperatures (Amann and Pickett, 1987). Sperm from species that possess very high cholesterol/phospholipid ratios, such as human and rabbit sperm, do not experience this membrane damage when cooled (Darin-Bennett and White, 1977).

To prevent phospholipid rearrangement and to increase membrane fluidity at low temperatures, cholesterol may be added to the plasma membrane of several cell types (Ladbrooke et al., 1968; Klein et al., 1995), including sperm (Combes et al., 2000; Purdy and Graham, 2004a). When cholesterol is added to synthetic liposomal membranes, it reduces the temperature at which the phase transition occurs and at high concentrations eliminates the phase transition altogether (Ladbrooke et al., 1968; Rottem et al., 1973). Cholesterol may be easily incorporated into or extracted from the plasma membranes of cells using cyclodextrins. It is possible to have the same occurrence for cholestanol because its chemical structure resembles that of cholesterol, with a double bond missing at the 5-6 position of the ring (Seyama, 2003).

Cyclodextrins, cyclic heptasaccharides consisting of $\beta(1-4)$ glucopyranose units, are water soluble but have a hydrophobic center (Purdy

and Graham, 2004a) and can transport cholesterol into or out of membranes down to concentration gradient (Klein et al., 1995). When cholesterol is loaded into cyclodextrins (CLC) and the CLCs added to bovine sperm prior to cryopreservation, higher percentages of motile and membrane intact sperm were recovered after thawing compared to untreated sperm (Purdy and Graham, 2004b). Similar results have also been reported for stallion sperm treated with a single concentration of CLCs (Combes et al., 2000). Whereas this procedure has been optimized for bull sperm (Purdy and Graham, 2004a) it has not been optimized for stallion sperm. The objective of this study was to compare the effect of adding cholesterol and cholestanol loaded cyclodextrins in stallion sperm prior to cryopreservation to optimize its cryosurvival.

MATERIALS AND METHODS

Materials

All chemicals were reagent grade and purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), except for Hoechst 33342 which was purchased from ICN, Biomedicals, Inc. (Aurora, OH).

Cyclodextrins preparation

Methyl- β -cyclodextrin was loaded with cholesterol as described by Purdy and Graham (2004a), and the same was done for cholestanol used in experiment. Briefly, 1 g of methyl- β -cyclodextrin was dissolved in 2 ml of methanol in a glass test tube. In a second glass test tube, 200 mg of cholesterol was dissolved in 1 ml of chloroform and a 0.45 mL aliquot of this cholesterol solution was added to the methyl- β -cyclodextrin solution. The solution of cyclodextrin and cholesterol was mixed and the solvents removed using a stream a nitrogen gas. The resulting crystals were stored at 22 °C until further use. A working solution of CLC was prepared by adding 50 mg of CLC to 1 ml of a 37 °C hepes buffered saline solution (STALP). This CLC working solution was vigorously vortexed prior to the removal of any aliquot.

Semen collection and processing

Ejaculates from eight light horse stallions housed at the Colorado State University Equine Reproduction Laboratory were used. Stallions were maintained under the guidelines presented by the Colorado State University's Animal Care and Use Committee.

Eighteen ejaculates from eight stallions were collected using a CSU Model Artificial Vagina (Animal Reproduction Systems, Inc., Chino, CA) and immediately following collection, the sperm concentrations were determined using a densimeter (Animal Reproduction Systems, Inc., Chino, CA). A small sample was diluted to 50×10^6 in EZ-Mixin® Basic Formula Extender (Animal Reproduction Systems, Inc., Chino, CA), and the percentages of total and progressively motile spermatozoa were determined using a computer assisted sperm analysis (CASA; IVOS, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA); ejaculates containing less than 50% total motility were discarded. Each ejaculate was diluted 1:1 (v/v) in STALP and was centrifuged in 50 ml conical tubes (Fisher Scientific, Houston, TX) at 400 g for 7 min. Following centrifugation, the supernatant from each tube was removed and discarded. The sperm pellets were suspended to 120 billion sperm/ml with STALP and sub-divided into three treatments: No additive (control); 1.5 mg CLC/120 million sperm (positive control); and 1.5 mg/120 million sperm of cyclodextrin pre-loaded with cholestanol/120 million sperm. All portions were held at 22 °C for 15 minutes. After this period, the semen was diluted 1:5 (v/v) with Lactose-Egg Yolk diluent and cooled to 5 °C over a 2 hours period. Loaded into 0.25 ml polyvinylchloride straws (Minitube of America, Verona, WI), frozen in liquid nitrogen vapor for 10 min (-60°C/min; Cochran et al., 1984; Cristanelli et al., 1985; Pickett et al., 1987), and then plunged into liquid nitrogen until further use.

Motility analysis

Straws were thawed in a 37 °C water bath for 30 seconds, extended in STALP and a subsample analyzed by CASA for total and progressive motility.

System parameters for motility analysis with the CASA were 45 frames acquired at 60 frames per second; minimum contrast 70, minimum

cell size 4 pixels; lower VAP cut off 20 $\mu\text{m/s}$; lower VSL cut-off 0 $\mu\text{m/s}$; VAP cut-off for progressive cells 50 $\mu\text{m/s}$ and straightness 75%. A 6.5 μl drop of spermatozoa from each sample was placed on a 37 °C preheated micro slide (VWR International, West Chester, PA) and a minimum of 200 sperm per sample were analyzed.

Zona Binding Assay

The bovine oocytes were aspirated from follicles (approximately 2-4 mm) in diameter were aspirated with a 20 gauge needle and the follicular fluid examined using a stereomicroscope and oocytes were placed in STALP. The cumulus cells of the oocytes were removed by vortexing for two minutes at maximum speed and the denuded oocytes then washed four times in STALP before being stored at 5 °C in a hyperosmotic solution (1.5 M MgCl_2 , 40 mM HEPES, 0.1% PVP) until further use.

Oocytes were washed four times in STALP and incubated for 1 hour at 38.5 °C in an atmosphere of 5% CO_2 in air, following which ten oocytes were randomly placed into 45 μl droplets of STALP (1 droplets/treatment) to which sperm were added and incubated together at 38.5 °C in an atmosphere of 5% CO_2 in air for 2 hours. After which the oocytes were washed four times in STALP, using a small-bore fire polished glass pipette to remove loosely bound sperm. Groups of five oocytes were placed onto glass slides and covered with a cover slip supported by a mix of paraffin wax and petroleum jelly (Coutinho da Silva, 2005).

Oocytes were viewed using an epifluorescence microscope (Eclipse E800, Nikon Instruments, Melville, NY) equipped with a 360/40 nm band pass excitation filter and a 460/50 nm band pass emission filter. The total number of sperm bound to each zona pellucida was determined at 400x magnification.

Experiment 1: Effect of cholesterol or cholestanol loaded cyclodextrins on stallion sperm motility after cryopreservation

One straw from each treatment was thawed in a 37 °C water bath for 30 seconds for assessment of motility (total and progressive) using CASA.

The contents of each straw were diluted 1:4 (v:v) in Lactose Egg Yolk diluent to give a final spermatozoa concentration of 20×10^6 sperm/ml and each sample maintained at room temperature for approximately 10 minutes before analysis (Meyers, 2007).

Experiment 2: Effect of cholesterol or cholestanol loaded cyclodextrins on stallion sperm zona binding assay after cryopreservation

Frozen/thawed spermatozoa from each of five of the stallions in Experiment 1 were used to determine if CLC or cholestanol treatment prior to cryopreservation affected the ability of sperm to bind to the bovine zona pellucida for each stallion and treatment. Two single 0.25 ml straw was thawed as described above and the spermatozoa were diluted 1:3 (v:v) in STALP. The cells were then centrifuged at 400 g for 5 minutes and the *pellet* suspended in 1 ml of STALP.

The spermatozoa were stained with 35 µg/ml Hoechst 33342 (ICN, Biomedical, Inc., Aurora, OH) and incubated for 15 minutes at 37 °C. To remove excess Hoeschst 33342, the spermatozoa were centrifuged again at 400 g for 5 minutes and suspended in STALP to a final concentration of 2 million spermatozoa/ml. A total of 10,000 spermatozoa (5 µl) from each sample were added to droplets containing 10 bovine oocytes.

The spermatozoa and oocytes were allowed to co-incubate for two hours at 38.5 °C an atmosphere of 5% CO₂ in air. The oocytes were then washed four times in STALP using a small-bore fire polished glass pipette to remove loosely bound spermatozoa. The oocytes were divided into 2 groups of five oocytes which were placed onto a glass slide, a coverslip was attached with paraffin wax and petroleum jelly (Coutinho da Silva, 2005).

The oocytes were viewed using an epifluorescence microscope (Eclipse E800, Nikon Instruments, Inc, Melville, NY) equipped with a 360/40 nm band pass excitation filter and a 460/50 nm band pass emission filter. The total number of spermatozoa bound to each zona pellucida was determined at 400x magnification.

Statistical analysis

In all experiments, treatment differences for sperm motility and zona binding were determined using analysis of variance (SAS, 1985). The Student-Newman-Keuls test was used to separate treatment means for each analysis (SAS, 1985). The effects were considered significant if $P < 0.05$.

RESULTS

Experiment 1

The percentage of total and progressively motile fresh sperm was 91% and 50%, respectively. After thawing the total and progressive sperm motility was higher in stallion sperm containing 1.5 mg CLC (69% and 46%) compared to sperm treated with cholestanol (54% and 36%) and non-treated (55% and 34%; Table 1; $P < 0.05$).

Table 1 – The percentages of total and progressive motility stallion spermatozoa treated with CLC or cholestanol, prior to cryopreservation

Motility (%)	Control	Cholesterol	Cholestanol
Total	55 ^b	69 ^a	54 ^b
Progressive	35 ^b	46 ^a	36 ^b

^{a,b} Different superscripts within rows indicate treatment differences ($P < 0.05$).

Experiment 2

The addition of CLC to stallion sperm prior to cryopreservation resulted in higher motility and numbers of bound to the zona pellucida (58% and 111 sperm/ZP) than cholestanol (51% and 72 sperm/ZP) and control (51% and 70 sperm/ZP) (Table 2; $P < 0.05$). However, when the sperm binding potential was determined on a motile spermatozoa basis by dividing the average number of spermatozoa bound to a zona pellucida for each stallion by the percentage of motile sperm, CLC treatment provided higher total motility and binding efficiency than other treatments ($P < 0.05$).

Table 2 – Percentages of total and progressive motility and total number of stallion sperm binding to bovine zona pellucida (NSBZP) treated with CLC or cholestanol, prior to cryopreservation

Treatment	Motility		NSBZP
	Total	Progressive	
Control	51 ^B	21 ^B	70 ^B
Cholesterol	58 ^A	23 ^B	111 ^A
Cholestanol	51 ^B	22 ^B	72 ^B

^{A,B,C}Values different within columns indicate treatment differences ($P < 0.05$).

DISCUSSION

Stallion spermatozoa are damaged during cryopreservation due to ice crystal formation and to plasma membrane damage when it undergoes a phase transition from liquid to crystalline/gel state (Amann and Pickett, 1987). Increasing the plasma membrane cholesterol:phospholipid ratio reduces the temperature at which the membrane phase transition occurs and may eliminate it completely (Ladbrooke et al., 1968; Rottem et al., 1973; Klein et al., 1995).

This study confirms that treating stallion spermatozoa with CLC (1.5mg CLC/120 million spermatozoa) prior to cryopreservation increases the percentages of motile spermatozoa after thawing (Combes et al., 2000; Moore et al., 2005). The optimum level of CLC concentration, 1.5mg CLC/120 million spermatozoa, was determined for stallion spermatozoa (Moore et al., 2005) and is similar to the concentration reported for bull spermatozoa (Purdy and Graham, 2004b).

Previous studies reported that stallion spermatozoa can bind to the bovine zona pellucida, undergo the acrosome reaction and penetrate (Sinowatz et al., 2003; Coutinho da Silva, 2005). In this study, the zona pellucida binding assay confirmed that stallion spermatozoa can bind to the zona pellucida of bovine oocytes, indicating that the bovine zona pellucida possesses sperm receptors that can bind both bovine and equine sperm (Sinowatz, et al., 2003; Moore et al., 2005).

A successful interaction between spermatozoa and the ZP is critical for fertilization, including the acquisition and completion of capacitation, recognition and binding to specific ZP receptors, and induction of physiological acrosome reaction (Oechninger 2003). The spermatozoa bound number depends on sperm capacitation and the ability of sperm receptors to bind the ZP3. This study showed that the capacity of spermatozoa to bind to the ZP of the oocyte is enhanced by the presence of CLC. However, the correlation between sperm zona binding and fertility ratio is controversial. Meyers et al. (1996) reported that stallion sperm with more efficient zona pellucida binding also exhibit greater fertility potential. However, Braundmeier et al. (2002) did not find high correlations between bull zona binding ability and fertility. Regardless, zona pellucida binding assays may be useful to determine spermatozoa-oocyte interactions, an important part of the fertilizing process. In this study, there was difference, on a per motile sperm basis, between CLC and other treatments to bind the zona pellucida, indicating that CLC treatment did not decrease the ability of sperm to capacitate and have the acrosome reaction. These data are similar to those reported by Moore et al. (2005) in which CLC-treated stallion spermatozoa had an increased binding ability. Purdy and Graham (2004b) also reported that although CLC treatment improved cryosurvival rates of bull sperm, it did not alter an individual sperm's ability to bind to the zona pellucida. Therefore, although additional cholesterol in the sperm plasma membrane enhances cryosurvival, the cell's ability to capacitate and acrosome react is not hindered.

The data reported in this study show the positive results of CLC addition to stallion sperm by using in vitro laboratory assays including increasing the percentages of motile and increasing the ability of the sperm to bind to the zona pellucida. This technique may prove beneficial to sperm cryopreservation from all stallions in general, but more importantly from stallions whose sperm routinely do not freeze in good condition.

CONCLUSION

Adding cholesterol to stallion sperm prior to cryopreservation improved cell cryosurvival.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Colorado State University Experiment Station at Colorado State University (Fort Collins – CO – USA), CNPq (Entity of the Brazilian Government returned to the Scientific and Technological Development) and FAPEMIG (Brazil).

REFERENCES

- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principal of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.* 7:145–173, 1987.
- BRAUNDMEIERS, A.G.; DEMERS, J.M.; SHANKS, R.D.; SAACKE, R.G.; MILLER, D.J. Examination of the binding ability of bovine spermatozoa to the zona pellucida as an indicator of fertility. *J. Androl.* 23(5):645-51, 2002.
- COCHRAN, J.D.; AMANN, R.P.; FROMAN, D.P.; PICKETT, B.W. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology* 22(1):25-38, 1984.
- COMBES, G.B.; VARNER, D.D.; SCHROEDER, F.; BURGHARDT, R.C.; BLANCHARD, T.L. Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. *J. Reprod. Fertil., Suppl.* 56:127-132, 2000.
- COUTINHO DA SILVA, M.A. Effect of milk proteins on intracellular C^{2+} concentration and stallion sperm binding to zonae pellucidae. Thesis (Ph.D.) – Colorado State University, Department of Biomedical Sciences. 2005. 100p.
- CRISTANELLI, M.J.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. Effects of egg yolk and glycerol levels in lactose-EDTA-egg yolk extender and of freezing rate on the motility of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology* 24(6):681-686, 1985.
- DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock, *Cryobiology* 14:466–470, 1977.

- DARIN-BENNETT, A.; POULOS, A.; WHITE, I.G. The effect of cold shock and freeze-thawing on release of phospholipids by ram, bull, and boar spermatozoa, *Aust. J. Biol. Sci.* 26:1409–1420, 1973.
- KLEIN, U.; GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry* 34(42):13784-93, 1995.
- LADBROOKE, B.D.; WILLIAMS, R.M.; CHAPMAN, D. Studies on lecithin-cholesterol-water interactions by differential scanning calorimetry and X-ray diffraction. *Biochim. Biophys. Acta.* 150(3):333-40, 1968.
- MEYERS, M.A. Cryopreserving sex-sorted stallion spermatozoa. Thesis (M.S.) – Colorado State University, Department of Biomedical Sciences. 2007. 108p.
- MEYERS, S.A.; LIU, I.K.; OVERSTREET, J.W.; VADAS, S.; DROBNIS, E.Z. Zona pellucida binding and zona-induced acrosome reactions in horse spermatozoa: Comparisons between fertile and subfertile stallions. *Theriogenology* 46(7):1277-88, 1996.
- MOORE, A.I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology* 51(3):241-9, 2005.
- OECHNINGER, S. Biochemical and functional characterization of the human zona pellucida. *Reprod Biomed* 7:641–648, 2003.
- PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L.; MCKINNON, A.O. Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination. *Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Bulletin*, No. 3. Colorado State University, Fort Collins/CO, 1987.
- PURDY, P.H.; FOX, M.H.; GRAHAM, J.K. The fluidity of Chinese hamster ovary cell and bull sperm membranes after cholesterol addition. *Cryobiology* 51(1):102-112, 2005.
- PURDY, P.H.; GRAHAM, J.K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*, 48:36-45, 2004a.
- PURDY, P.H.; GRAHAM, J.K. Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. *Biol. Reprod.* 71:522-527, 2004b.

- ROTTEM, S.; YASHOUV, J.; NE'EMAN, A.; RAZIN, A. Composition, ultra-structure and biological properties of membrane from *Mycoplasma mycoides* var. *capri* cells adapted to grow with low cholesterol concentrations. *Biochim. Biophys. Acta.* 323:495-508, 1973.
- SAS Institute Inc., *SAS User's Guide: Statistics*, 1985 ed., SAS Institute Inc., Cary, NC, 1985.
- SEYAMA, Y. Cholesterol metabolism, molecular pathology and nutritional implications. *Journal of Medicinal Food.* 6(3):217-224, 2003.
- SINOWATZ, F.; WESSA, E.; NEUMULLER, C.; PALMA, G. On the species specificity of sperm binding and sperm penetration of the zona pellucida. *Reprod. Domest. Anim.* 38(2):141-146, 2003.
- WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In.: *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes.* G. J. Morris and A. Clarke, eds. Academic Press, London, p.189-218, 1981.

ANEXO

1. Diluentes

1.1 Meio centrifugador glicose-EDTA

Reagentes	Quantidade
D(+) glicose monohidratada	6,000 g
Citrato de sódio	0,375 g
EDTA	0,370 g
Bicarbonato de sódio	0,125 g
Penicilina G (sódica ou potássica)	100,000 UI
Sulfato de estreptomicina	0,100 g

EDTA = etileno diaminotetra-acetodissódico.

Fonte: Martin et al., 1979.

1.2 – Meio congelador

Reagentes	Quantidade (mL)
Solução de lactose a 11%	50,0
Diluyente de centrifugação	25,0
Gema de ovo	20,0
Orvus-es-paste	0,8
Glicerol	5,0

Fonte: Martin et al., 1979.

1.3. Diluyente BTS

Reagentes	1000 mL
Glicose monohidratada	0,2 mM
Citrato de sódio	20,4 mM
EDTA	3,4 mM
Na ₂ CO ₃	11,8 mM
KCl	10,1 mM

EDTA = etileno diaminotetra-acetodissódico).

1.4. Stallion Media – STALP (Diluyente STALP)

Hepes Buffered Saline (STALP)	1000 mL
NaCl	37 mM
KCl	10 mM
KH ₂ PO ₄	1 mM
NaHCO ₃	24.99 mM
MgSO ₄ anhydrate	2.4 mM
HEPES	2.4 g
*CaCl ₂ .2H ₂ O	2 mM
Fructose	84 mM
Glucose	6 mM
Na Pyruvate	182 µM
Na Lactate	3.7 mL
Bovine Serum Albumin (BSA)	3 mg/mL

Adjust osmolality (300-310 mOsm) e pH (7.2-7.4).

*Put in last

1.5. Bull Media – TALP (Diluyente TALP)

Bull Talp	Quantidade em 100 mL
<u>Tyrodes</u>	
NaCl	0.569 g
KCl	0.023 g
KH ₂ PO ₄	0.004 g
NaHCO ₃	0.209 g
*CaCl ₂ .2H ₂ O	0.025 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.008 g
<u>Talp</u>	
Na Pyruvate	0.0022 g
Na Lactate	0.368 mL
Glucose	0.090 g
HEPES	0.238 g
BSA	0.300 g

Adjust osmolality (300-310 mOsm) e pH (7.2-7.4)

*Put in last

1.6. Lactose EDTA Media

Step 1: Prepare Glucose EDTA in 250 mL volumetric flask

a) Add the following ingredients to 150-200 mL of Nanopure e mix.

	<u>250 mL</u>
Glucose	15 g
Sodium Citrate Dihydrate	0.93 g
Disodium EDTA	0.93 g
Sodium Bicarbonate	0.30 g

b) Add Nanopure to the 250 mL line, Mix well.

Step 2: Prepare Lactose EDTA in the following measurements: (Use a 2 l flask) Start this mixing while preparing glucose EDTA e egg yolk).

	<u>500 mL</u>	<u>1000 mL</u>
Lactose	27.5 g	55 g
Glucose EDTA (step 2)	125 mL	250 mL
Nanopure Water	237.5 mL	475 mL
Egg Yolk (step 3)	100 mL	200 mL
Equex STM	2.5 mL	5 mL

(to break up the lipids/dissolve EY)

a) Bring up to appropriate volume in volumetric flask.

b) Measure osmolality e adjust to between 300 e 310 by adding the appropriate amount of Nanopure.

c) (osmo obtained) (total volume)/(desired osmo) = final total volume

**note: be sure to subtract initial volume (250) from final volume before Nanopure added.

d) Adjust pH to 7.2 with NaOH.

Step 3: Prepare Egg Yolk

a) Remove as much of egg white as possible by rolling cracked egg on brown paper towel.

b) Poke the membrane while holding it tightly e collect the yolk in a beaker.

Step 4: Fill centrifuge tubes (weigh to 50g) e centrifuge at 11, 500 for 20 min.

Step 5: Filter through 8 micron filter.

Step 6: Add 5% glycerol to the total volume.

Step 7: Add 0.5 mL of Ticarcillin (100 mg/mL) for every 100 mL of Lactose EDTA.

Step 8: Make labels e freeze.

1.7. Composição do BTS

Componentes	Quantidade
Glucose anidra	76,6 g
Dihidrato de citrate de sódio	14,3 g
Bicarbonato de sódio	2,6 g
EDTA	3,6 g
Cloreto de potássio,	2,5 g
Sulfato de gentamicina	0,4 g

2. Fluorescent stain

2.1 - Propidium Iodide (PI)

- Working solution at 1 mg/mL
- Stain 50×10^6 cells with 6 μ l PI
- Staining is consistent in any sperm diluent
- Stain can be store in refrigerator.

3. Solução Citrato- sódio-Frutose

3.1. Solução isosmótica com osmolaridade de 300 mOsm/L

Reagentes	Quantidade*
Citrato trissódico	1,47 g
Frutose	2,7 g
Água (qsp)	100 mL

Visando preparar uma solução hiposmótica de 150 mOsm/L, deve-se proceder da seguinte forma:

Concentração (mOsm/L)*	Volume de solução (300 mOsm/L)	Água
150	25 mL	qsp 50 mL

*Após realizar a diluição, aferir a solução em osmômetro.