

SP 4739
Imp 19820

POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL DE ESPERMATOZÓIDES OVINOS
SUBMETIDOS À CRIOPRESERVAÇÃO: INFLUÊNCIA DA CRIORESISTÊNCIA DA MEMBRANA
PLASMÁTICA

Azevedo, H.C.¹; Bicudo, S.D.²; Sousa, D.B.²; Maia, M.S.²; Rodello, L.²; Slicherle, C.C.²

¹Embrapa Tabuleiros Costeiros Aracaju-Sergipe-Brasil; ²FMVZ/UNESP; ³Embrapa Semi-Árido
hymerson@cpate.embrapa.br

Ejaculados de 25 carneiros da raça Santa Inês foram processados e submetidos às curvas automatizadas de refrigeração e congelamento (TK 3000® - Uberaba, Brasil). O sêmen foi descongelado em banho-maria a 42°C por 20 segundos e parte dele incubado a 37°C por duas horas em meio sintético do oviduto (SOF). Aliquotas de sêmen foram removidas para avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM) em vários momentos (MOMENTOS): sêmen *in natura* ou a fresco (S-FR, n=25), refrigerado (S-RE, n=125), congelado-descongelado (S-CD, n=125) e incubado (S-IN, n=125). Para a avaliação do PMM uma amostra de sêmen foi diluída em 500µL de meio X-Cell[®] (IMV, França) numa concentração de 4 x 10⁶ espermatozoides/mL, sendo adicionadas as sondas fluorescentes iodeto de propídio (PI - 5 mg/mL em PBS), iodeto de 5,5',6,6'tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1 - 153 M em DMSO) e aglutinina de *Pisum sativum* conjugada a fluoresceína de isotiocianato (FITC-PSA - 100 g/mL em 1% azida de sódio em PBS). Após a incubação a 37°C por 8 minutos, uma amostra de 10µL foi sacada e avaliada entre lâmina e lâminula sob inserção em microscópio com iluminação epifluorescente (1000x). Para análise dos resultados de PMM levou-se em consideração a crioresistência da membrana plasmática (CRIO), baseada na média da integridade de membrana plasmática (IMP) dos espermatozoides, mensurada a partir da combinação da FITC-PSA e PI nas amostras de sêmen descongelado. Desta forma, os 25 carneiros foram agrupados em três níveis de crioresistência de acordo com a média geral da IMP (X=22,1%) como segue: CRIO 1 - nível inferior (X=10,3%); CRIO 2 - nível médio (10,3%>X=29,9%) e; CRIO 3 - nível superior (X>29,9%). Para todas as variáveis foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA), delineamento inteiramente ao acaso. Para comparação das médias, foi empregado o método de Tukey (P<0,05), sendo as diferenças entre elas identificadas por letras sobrescritas: maiúsculas para diferenças entre MOMENTOS dentro de cada CRIO e, minúsculas para diferenças entre os níveis de CRIO dentro de cada MOMENTO. Os percentuais médios de espermatozoides com alto PMM foram os seguintes para o S-FR, S-RE, S-CD e S-IN respectivamente: CRIO 1 = 72,8%^{ba}, 26,6%^{ab}, 9,2%^{bc} e 2,8%^{bc}; CRIO 2 = 82,5%^{ba}, 27,3%^{ab}, 21,2%^{abc} e 11,9%^{abc}; CRIO 3 = 84,3%^{ba}, 15,6%^{bc}, 29,4%^{ab} e 13,7%^{bc}. Foi verificado um gradativo e agudo declínio do PMM à medida que o sêmen foi submetido à criopreservação e incubação (P<0,05). O PMM diferiu entre os agrupamentos animais e foi maior no CRIO 3 em relação ao CRIO 1 (P<0,05) sendo o comportamento do CRIO 2 praticamente intermediário em relação aos demais. Conclui-se que a criopreservação reduz o potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides ovinos e que diferenças nesta característica são evidentes entre agrupamentos animais no sêmen *in natura* e após a refrigeração, congelamento e incubação em SOF por influência do nível de crioresistência da membrana plasmática dos espermatozoides.

MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL IN RAM SPERMATOZOA SUBMITTED TO
CRYOPRESERVATION: INFLUENCE OF PLASMATIC MEMBRANE CRYORESISTENCE

Semen samples from 25 Santa Inês rams were processed and cryopreserved in an automatic cooling and freezing machine (TK 3000® - Uberaba, Brazil). The semen was thawed in a 42°C water bath for 20 seconds and part of it was incubated for two hours at 37°C in synthetic oviduct fluid (SOF). Samples of semen were removed to evaluate spermatic mitochondrial membrane potential (MMP) in the following moments (MOMENTS): fresh semen (FR-S, n=25); refrigerated semen (RE-S, n=125); frozen-thawed semen (FT-S, n=125) and incubated semen (IN-S, n=125). To MMP evaluation a semen sample was diluted in 500µL of X-Cell[®] previously heated at 37°C, keeping the sperm concentration at 4 x 10⁶ spermatozoa/mL. To the sample the following were added: 1.5 µL of propidium iodide (PI - 0.5 mg/mL in PBS), 1.5 µL of 5,5',6,6' tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodide (JC-1 - 153 M in DMSO) and 25 µL of *Pisum sativum* agglutinin conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC-PSA - 100 g/mL in 1% sodium azide in PBS). The mixture was homogenized whilst protected from the light and after 8 minutes of 37°C incubation, 10µL of this were removed to be examined under epifluorescence microscope (1000x). To the analysis of PMM results it was considered plasmatic membrane cryoresistence (CRIO), based on the average of plasmatic membrane integrity (PMI) of spermatozoids, measured from the FITC-PSA and PI combination in frozen-thawed semen samples. The 25 rams were grouped in three cryoresistence levels according to general average of PMI (X=22.1%), such as: CRIO 1 - inferior level (X=10.3%); CRIO 2 - intermediate level (10.3%>X=29.9%) and; CRIO 3 - superior level (X>29.9%). To all the variables it was used the variance analysis (ANOVA) in a completely randomized design. To compare the averages the method of Tukey was used (P<0.05) and the differences among them were identified by superscription letters: capital letters for differences among MOMENTS in each CRIO and lower cases for differences among the levels CRIO in each MOMENT. The proportions of spermatozoas presenting high MMP were the following to FR-S, RE-S, FT-S and IN-S, respectively: CRIO 1 = 72.8%^{ba}, 26.6%^{ab}, 9.2%^{bc} and 2.8%^{bc}; CRIO 2 = 82.5%^{ba}, 27.3%^{ab}, 21.2%^{abc} and 11.9%^{abc}; CRIO 3 = 84.3%^{ba}, 15.6%^{bc}, 29.4%^{ab} and 13.7%^{bc}. A gradual and sharp decline of MMP was verified as the semen was submitted to cryopreservation and incubation (P<0.05). MMP differed among cryoresistence levels and it was higher in CRIO 3 compared to CRIO 1 (P<0.05). The MMP behavior in CRIO 2 was practically intermediate compared to the other levels. It was concluded that cryopreservation reduces the mitochondrial membrane potential of ram spermatozoa and differences in this characteristic are evident among group of rams in fresh, cooled, frozen-thawed and incubated semen according to the cryoresistence level of sperm plasmatic membrane.