

INTEGRIDADE ACROSSOMAL DE ESPERMATOZÓIDES OVINOS SUBMETIDOS À CRIOPRESERVAÇÃO: INFLUÊNCIA DA CRIORESISTÊNCIA DA MEMBRANA PLASMÁTICA

Azevedo, H.C.¹; Bicudo, S.D.²; Maia, M.S.³; Sousa, D.B.²; Rodello, L.²; Sicherle, C.C.²

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

Amostras de sêmen de 25 carneiros da raça Santa Inês foram submetidas à refrigeração e congelamento automatizadas (TK 3000® - Uberaba, Brasil), descongelamento a 42°C por 20 segundos e incubação a 37°C por duas horas em meio sintético do oviduto (SOF). Aliquotas foram removidas para avaliação da integridade do acrossomo (IAC) 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 da IAC uma amostra de sêmen foi diluída em 500µL de meio X-Cell® (IMV, França) numa concentração de 4×10^6 espermatozoides/mL, sendo adicionado o 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 a 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 avaliada em microscópio com iluminação epifluorescente (1000x). Para análise dos resultados de IAC levou-se em consideração a crioresistência da membrana plasmática (CRIO), baseada na média da integridade de membrana plasmática (IMP) dos espermatozoides após a descongelamento, mensurada pela combinação da FITC-PSA e PI. 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 entre os níveis de CRIO dentro de cada MOMENTO. Os percentuais médios de IAC foram os seguintes para o S-FR, S-RE, S-CD e S-IN respectivamente: CRIO 1 = 91,2%^{aA}, 70,3%^{bB}, 37,7%^{cC} e 42,0%^{cC}; CRIO 2 = 94,0%^{aA}, 82,4%^{aB}, 53,6%^{bD} e 62,6%^{bC} e; CRIO 3 = 92,5%^{aA}, 80,7%^{aB}, 65,1%^{aC} e 70,8%^{aC}. Foi verificado um gradativo declínio da IAC durante a criopreservação (P<0,05). De forma intrigante, foi observada uma recuperação da integridade da membrana acrossomal entre a descongelamento e a incubação no CRIO 2 (P<0,05). Supostamente a diluição do sêmen em meio SOF durante a incubação e depois no XCell® na avaliação tenha beneficiado a absorção e/ou emissão da fluorescência da FITC-PSA pela remoção de parte do meio diluidor (Thomas et al., 1998 - Biol. Rep., v. 58, p. 786-793). No S-FR nenhuma diferença entre os agrupamentos animais foi observada (P>0,05). Já no S-RE a IAC do CRIO 2 e 3 foi significativamente superior (P<0,05) àquela obtida no CRIO 1. A partir da descongelamento os valores de IAC foram sucessivamente maiores para CRIO 1, 2 e 3. Conclui-se que a criopreservação reduz a integridade do acrossomo de espermatozoides ovinos e que diferenças nesta característica são evidentes entre agrupamentos animais a partir da refrigeração e mais acentuadamente após a descongelamento por influência do nível de crioresistência da membrana plasmática dos espermatozoides.

ACROSOMAL INTEGRITY IN RAM SPERMATOOA 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 acrosomal integrity (ACI) 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 ACI evaluation a semen sample was diluted in 500µL of X-Cell® previously heated at 37°C, keeping the sperm concentration at 4×10^6 spermatozoas/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 ACI 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 = 91.2%^{aA}, 70.3%^{bB}, 37.7%^{cC} e 42.0%^{cC}; CRIO 2 = 94.0%^{aA}, 82.4%^{aB}, 53.6%^{bD} e 62.6%^{bC} e; CRIO 3 = 92.5%^{aA}, 80.7%^{aB}, 65.1%^{aC} e 70.8%^{aC}. A gradual decline of ACI was verified as the semen was submitted to cryopreservation (P<0.05). Unexpectedly, it was observed a recovery in the integrity of acrosomal membrane between the frozen-thawing and incubation in CRIO 2 (P<0.05). The dilution of semen in SOF during incubation and later in XCell® in the evaluation might have benefited the absorption and/or emission of FITC-PSA fluorescence by removing part of semen extender (Thomas et al., 1998 - Biol. Rep., v. 58, p. 786-793). No differences among ram groups were observed in FR-S (P>0.05). In RE-S the ACI verified in CRIO 2 and 3 was significantly higher than in CRIO 1 (P<0.05). From the thawing, the ACI values were successively higher to CRIO 1, 2 and 3. It was concluded that cryopreservation reduces the acrosome integrity of ram spermatozoa and the differences in this characteristic are evident among ram groups beginning with refrigeration and more accentuated after frozen-thawed by influence of cryoresistence level of sperm plasmatic membrane.