

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**PESQUISA DE NOVO MÉTODO DE CONGELAÇÃO PARA SÊMEN DE OVINOS  
SANTA INÊS**

**FÁTIMA RÉVIA GRANJA LIMA**  
Médica Veterinária

**FORTALEZA - CE**

**SETEMBRO DE 2010**

**FÁTIMA RÉVIA GRANJA LIMA**

**PESQUISA DE NOVO MÉTODO DE CONGELAÇÃO PARA SÊMEN  
DE OVINOS SANTA INÊS**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, da Universidade Federal do Ceará, do qual participam a Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Reprodução Animal

**Comitê de Orientação**

Professor Dr. Airton Alencar de Araújo – Orientador

Professor Dr. Diônes Oliveira Santos – Co-orientador

**FORTALEZA – CE  
SETEMBRO DE 2010**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

---

L698p

Lima, Fátima Révia Granja.

Pesquisa de novo método de congelação para sêmen de ovinos Santa Inês/ Fátima Révia Granja  
Lima. – 2010.  
150 f. : il., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Fortaleza, 2010.

Área de Concentração: Reprodução Animal.

Orientação: Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo.

Coorientação: Prof. Dr. Diônes Oliveira Santos.

1. Ovino – Reprodução. 2. Sêmen. 3. Criopreservação. I. Título.

---

CDD 636.08



**FÁTIMA RÉVIA GRANJA LIMA**

**PESQUISA DE NOVO MÉTODO DE CONGELAÇÃO PARA SÊMEN  
DE OVINOS SANTA INÊS**

Comissão Examinadora:

---

Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo  
Universidade Federal do Ceará  
Departamento de Zootecnia/ CCA  
Presidente

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Ângela Maria Xavier Eloy  
Pesquisadora da EMBRAPA / CNPC

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Maria Gorete Flores Salles  
Médica Veterinária

---

Prof. Dr. Maurício Fraga Van Tilburg  
Universidade Federal do Ceará  
Departamento de Zootecnia/ CCA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Emmanuelle Lima de Figueirêdo  
Médica Veterinária  
Professora das Faculdades INTA

**FORTALEZA  
SETEMBRO DE 2010**

Ao meu esposo Cleber,  
meu companheiro com muito amor e gratidão.

À minha filha Nayra,  
maior presente da minha vida.

Aos meus pais José Dilce e Adelina,  
exemplos de vida  
e apoio incondicional aos meus projetos.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, acima de todas as coisas por ter me guiado durante toda minha vida.

A Universidade Federal do Ceará e a Pós-graduação de Zootecnia, pelo oferecimento do curso.

A EMBRAPA Caprinos e Ovinos, pela atenção e liberação do laboratório de Andrologia e Tecnologia do Sêmen e dos animais proporcionando estrutura e materiais necessários para o desenvolvimento do projeto.

Ao orientador Airton Alencar de Araújo por todo ensinamento técnico, colaboração, paciência e confiança para realização desta tese.

Ao co-orientador Diônes Oliveira Santos pelo esforço em disponibilizar tudo o que fosse necessário para realização deste trabalho, pela amizade e confiança.

Ao laboratório de Estudo e Reprodução Animal da UFC por sempre ter me acolhido com carinho.

Ao técnico de laboratório da EMBRAPA, José Nóbrega pela prontidão e pelo auxílio durante a condução de experimento e amizade.

Aos médicos veterinários Fernando Henrique e Eduardo pela ajuda e colaboração na execução deste trabalho.

A minha tia Rosa Granja que me apoiou com a minha filha

Em especial a minha amiga Ana Gláudia, o que não é suficiente para expressar a gratidão por tudo que fizeste por mim.

As colegas das pós-graduação, Gyselle, Katianne, Josy por dividir momentos difíceis e felizes.

Aos colegas, agora, no mestrado Ítalo Cordeiro e Jeane Férrer pela ajuda e contribuição na condução do experimento.

Aos alunos da graduação em Zootecnia da UFC (Marco Antônio) e da UVA (Danilo) que contribuíram em parte do experimento.

Aos meus amigos Alixandre e Talita pelo incentivo e apoio no final.



## SUMÁRIO

<b>Lista de tabelas.....</b>	<b>xii</b>
<b>Resumo Geral.....</b>	<b>xiii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>xv</b>
<b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>3</b>
<b>1 – Célula espermática.....</b>	<b>4</b>
1.1 – Composição do sêmen ovino.....	5
1.2 – Metabolismo da célula espermática congelada.....	6
<b>2 – Diluidores.....</b>	<b>10</b>
2.1 – TRIS.....	11
2.2 – Leite.....	12
2.3 – HEPES.....	13
<b>3 – Crioprotetores.....</b>	<b>13</b>
3.1-Crioprotetores não penetrantes.....	14
3.1.1Gema do ovo.....	14
3.2–Crioprotetores penetrantes.....	16
3.2.1– Glicerol.....	16
<b>4 – Efeito diluidor, concentração espermática e temperatura de descongelção .....</b>	<b>18</b>
4.1 – Temperatura.....	19
4.2 – Concentração espermática na dose certa.....	20
<b>5 – Técnicas de congelção.....</b>	<b>21</b>
5.1 – Sistemas de criopreservação do sêmen.....	21
<b>6 – Técnicas de descongelção.....</b>	<b>22</b>
<b>7 – Análise de sêmen assistida por computador (CASA).....</b>	<b>23</b>
<b>8 – Técnicas de inseminação artificial.....</b>	<b>26</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>31</b>
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>47</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>48</b>

<b>ABSTRACT.....</b>	<b>50</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>53</b>
1 – Local do experimento.....	53
2 – Animais experimentais.....	53
3 – Diluidores.....	53
4 – Colheita de sêmen e processamento.....	54
5 – Avaliação do sêmen.....	55
6 – Morfologia espermática.....	55
7 – Análise estatística.....	56
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>70</b>
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>76</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>77</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>78</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>79</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>81</b>
1 – Local do experimento.....	81
2 – Animais experimentais.....	81
3 – Tratamentos.....	81
4 – Colheita de sêmen e processamento.....	82
5 – Avaliação do sêmen.....	82
6 – Morfologia espermática.....	83
7 – Delineamento experimental.....	83
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>84</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>86</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>91</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>92</b>
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>98</b>

<b>RESUMO.....</b>	<b>99</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>100</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>101</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>104</b>
1 – Local do experimento.....	104
2 – Animais experimentais.....	104
3 – Tratamento hormonal.....	106
4 – Congelação do sêmen.....	106
5 – Inseminação artificial.....	106
6 – Diagnóstico de gestação.....	107
7 – Análise estatística.....	107
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>108</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>110</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>115</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>116</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>121</b>

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

- |          |   |    |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Efeito do tipo de diluidor e da temperatura de congelação sobre os parâmetros de motilidade do sêmen congelado de ovino Santa Inês.                         | 58 |
| Tabela 2 | Efeito da interação diluidor e temperatura de congelação sobre a variável motilidade progressiva do espermatozóide de ovinos da raça Santa Inês.            | 58 |
| Tabela 3 | Efeito da interação diluidor e temperatura de congelação sobre a variável percentagem de espermatozóide com velocidade rápida de ovinos da raça Santa Inês. | 58 |
| Tabela 4 | Efeito do diluidor e da concentração espermática sobre os parâmetros de motilidade do sêmen congelado de ovino Santa Inês.                                  | 60 |
| Tabela 5 | Alterações morfológicas totais (AMT) dos espermatozoides de ovinos, congelados em diferentes protocolos.  | 61 |

### CAPÍTULO 3

- |          |  |    |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Efeito da gema de ovo e sua proporção sobre os parâmetros de motilidade do sêmen ovino congelado.  | 84 |
| Tabela 2 | Médias e desvio padrão das alterações morfológicas dos espermatozoides diluídos no TRIS com 10 e 20% de gema de ovo de galinha e gema de ovo de codorna. | 85 |

### CAPÍTULO 4

- |          |  |     |
|----------|--|-----|
| Tabela 1 | Taxa de prenhez em ovelhas Santa Inês inseminadas por via cervical e laparoscópica em duas fazendas diferentes   | 108 |
| Tabela 2 | Média e desvio padrão do Escore de condição corporal (ECC) e da ordem de parto (OP) das ovelhas inseminadas por via cervical e laparoscópica em cada fazenda | 109 |

## **PESQUISA DE NOVO MÉTODO DE CONGELAÇÃO PARA SÊMEN DE OVINOS SANTA INÊS**

### **RESUMO GERAL**

Foram realizados três experimentos com o objetivo de avaliar a influência de diferentes fatores sobre os parâmetros de motilidade do sêmen e taxas de gestação em ovinos. No primeiro experimento, foi verificado a influência do tipo de diluidor (Leite desnatado, HEPES e TRIS), temperatura de congelação (-79 °C, -90 °C, -120 °C) e concentração final dos espermatozóides ( $600 \times 10^6$ ,  $800 \times 10^6$ ,  $1000 \times 10^6$  espermatozóides por mL) sobre os parâmetros de motilidade do sêmen de ovinos Santa Inês. No segundo experimento, avaliou-se a influência dos tipos de gema de ovo (galinha caipira e codorna) e sua porcentagem (10% e 20%) sobre as características de motilidade do sêmen congelado de ovino. No terceiro experimento, avaliou-se o efeito de duas técnicas de inseminação artificial (via cervical e laparoscópica) sobre a taxa de gestação de ovelhas de duas fazendas. As taxas de gestação foram comparadas dentro e entre as fazendas, sendo verificado também se estas foram influenciadas pela ordem de parto e escore corporal. Os resultados do experimento 1 mostraram que no diluidor Leite, a motilidade e a porcentagem de espermatozóides rápidos diferiram na temperatura de -79 °C em relação às demais temperaturas. No diluidor HEPES, a temperatura de -90 °C foi inferior às demais. No diluidor TRIS, não houve diferença significativa entre as temperaturas de congelação, entretanto a motilidade foi superior aos demais diluidores em todas as temperaturas testadas. A concentração de  $600 \times 10^6$  spz/ mL para as variáveis percentagens de espermatozóides móveis, motilidade progressiva e velocidade rápida mostrou-se superior à de  $800 \times 10^6$  spz/ mL e  $1000 \times 10^6$  spz/ mL. Para a variável velocidade média da trajetória do espermatozóide rápido (VAPR), o diluidor Leite desnatado na temperatura de -79 °C apresentou superioridade às demais temperaturas, sendo o diluidor TRIS (10% de gema de ovo de galinha) superior aos demais. Não foram observadas diferenças estatísticas entre as

concentrações nos demais diluidores. No experimento 2, a percentagem de espermatozóides móveis foi significativamente superior no diluidor TRIS (10% de gema de ovo de galinha). As variáveis motilidade progressiva e motilidade de espermatozóides rápidos apresentaram as melhores taxas no TRIS (10% de gema de ovo de galinha) e não diferiram estatisticamente do TRIS (10% de gema de ovo de codorna). Observou-se maior percentagem de espermatozóides com defeitos de cabeça nos tratamentos com maior percentual de gema de ovo (20%), independente do tipo de gema. Não houve diferença estatística com relação às outras alterações morfológicas espermáticas. No experimento 3, o tipo de inseminação artificial influenciou a taxa de prenhez, mesmo com sêmen congelado, mostrando resultados superiores pela via laparoscópica nas duas fazendas. Não houve efeito da ordem de parto e escore corporal para inseminação cervical em ambas as fazendas. Entretanto, estas variáveis influenciaram a inseminação via laparoscopia na Fazenda 2. Portanto, pode-se concluir que o diluidor TRIS, na temperatura de congelação de  $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$  e concentração final de  $600 \times 10^6$  sptz/ mL, mostrou-se o protocolo de congelação, em equipamento TK 3000, mais apropriado para sêmen de carneiros Santa Inês. A percentagem de 10% de gema de ovo de galinha caipira foi a que melhor preservou os parâmetros de motilidade espermática, no entanto, a gema de ovo de codorna mostrou-se como uma alternativa a ser adicionada no diluidor de sêmen. Apesar da avaliação *in vitro* do sêmen congelado neste experimento ter sido satisfatória, este não foi suficiente para elevar as taxas de gestação das fêmeas inseminadas. Concluiu-se, ainda, que a técnica de laparoscopia é a mais indicada quando se usa sêmen congelado na espécie ovina.

**Palavras-chave:** carneiro, criopreservação, diluidor, fertilidade, inseminação artificial, parâmetros espermáticos.

## SEARCH FOR NEW METHOD FOR FREEZING SEMEN SANTA INES SHEEP

### ABSTRACT

#### GENERAL ABSTRACT

Three experiments were carried out aiming to evaluate the influence of different factors on parameter of post-thawing semen motility and pregnancy index of rams. The first one showed the influence of extender type (skim milk, HEPES and TRIS), freezing temperature (-79°C, -90°C and -120°C) and final concentration of sperm (600 x 10<sup>6</sup>, 800 x 10<sup>6</sup> and 1000 x 10<sup>6</sup> sperm per mL) on semen motility parameters of Santa Ines rams. The second one experiment evaluated the influence of egg yolk types (chicken and quail) and its percentage (10% and 20%) on the characteristics of motility of frozen semen of rams. The last one experiment evaluated the effect of two artificial insemination techniques (cervical and laparoscopic) on pregnancy rate of ewes of two farms. Pregnancy rate were compared within and between farms. Body condition score and parturition order influence on pregnancy rate was also analyzed. The results of experiment 1 showed that using milk extender, motility and speed of sperm were different ( $P < 0.05$  on -79°C temperature) when compared to other temperatures. Considering HEPES extender, the temperature of -90°C was lower compared to the others. Using TRIS extender, there was no difference between freezing temperatures, but the motility was higher when compared to the other extenders, at all temperatures evaluated. Considering sperm percentage, progressive motility and fast speed as variables, the concentration of 600 x 10<sup>6</sup> sperm per mL proved to be higher ( $P < 0.05$ ) than 800 x 10<sup>6</sup> sperm per mL. Considering the mean velocity of rapid sperm trajectory (VAPR), the extender skim milk used at a temperature of -79°C presented a lower percentage when compared to other temperatures. However, TRIS extender was higher ( $P > 0.05$ ) when compare to the others. No difference was detected ( $P > 0.05$ ) between concentrations considering the other extenders. In experiment 2, the percentage of motile sperm was different ( $P < 0.05$ ) using TRIS extender (10% of chicken egg yolk). The variables progressive motility and rapid motility of spermatozoa presented the best rates,

using TRIS (10% of chicken egg yolk) and did not differ ( $P>0.05$ ) from TRIS (10% of quail egg yolk). It was observed a higher percentage ( $P<0.05$ ) of sperm with head defects in the treatments with the highest percentage of egg yolk (20%), independently of the yolk type used. There was no statistical difference ( $P>0.05$ ) in other morphological sperm changes. In experiment 3, artificial insemination type influenced on pregnancy rate, even with frozen semen, showing superior results ( $P<0.05$ ) using laparoscopic via, on both farms. There was no effect ( $P>0.05$ ) of parturition order on insemination techniques, on both farms. However, the body condition score (ECC) influenced the insemination using cervical via, on farm 1. Therefore, it was concluded that TRIS extender, at a freezing temperature of  $-79^{\circ}\text{C}$  and final concentration of  $600 \times 10^6$  sperm per mL, proved to be the freezing protocol more suitable for Santa Ines rams semen, using the TK 3000 equipment. The percentage of 10% of chicken egg yolk was the best to preserve sperm motility parameters, however the egg yolk of quail showed up as an alternative to be added to the semen extender. Despite the in vitro evaluation of frozen semen in this experiment have been satisfactory, it was not enough to increase the pregnancy rates of inseminated females. It was also concluded that laparoscopy technique is the most indicated when frozen semen is used, in ovine species.

**Keywords:** artificial insemination, cryopreservation, extender, fertility, ram, sperm parameters.



## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A aceitação mundial da tecnologia da inseminação artificial impulsionou o desenvolvimento de outras biotécnicas como criopreservação do espermatozóide, sexagem, regulação do ciclo estral, colheita de embriões, transferência e clonagem (FOOTE, 2002). Em muitos países, a inseminação artificial ovina é realizada utilizando sêmen diluído fresco ou resfriado a 4°C ou 15°C. Apesar dos bons índices de fertilidade alcançados, esta técnica tem a desvantagem de não permitir que o sêmen seja utilizado em fazendas distantes do local de colheita, devido ao reduzido tempo de conservação do sêmen, não permitindo a ampla difusão do material genético de animais considerados superiores (CHEMINEAU et al., 1991; SALAMOM e MAXWELL, 2000).

Como alternativa para utilização do sêmen congelado, Killen e Caffery (1982) desenvolveram a técnica da inseminação artificial intra-uterina por laparoscopia que permitiu a obtenção de resultados semelhantes aos alcançados com monta natural ou inseminação com sêmen fresco, utilizando doses com uma menor concentração de espermatozóides. Contudo, esta técnica requer altos investimentos e custos com mão de obra qualificada e equipamentos, sendo economicamente inviável na maioria das propriedades comerciais ovinas (EVANS e MAXWELL, 1987; WINDSOR, 1995)

A utilização de sêmen congelado possibilita uma maior pressão de seleção devido ao fato da utilização de animais comprovadamente com genética superior permitindo adquirir maior impacto sobre os programas de melhoramento animal e, na dependência do estágio tecnológico do rebanho, esta vantagem supera as restrições técnicas impostas à sua utilização (LUZ et al., 2000; BICUDO et al., 2005). O espermatozóide não é adaptado para sobreviver à criopreservação, portanto, eles reagem de forma diferente ao processo de resfriamento e reaquecimento, de acordo com a espécie animal e a variação individual. As injúrias da criopreservação são mais severas no espermatozóide ovino do que no espermatozóide bovino, reduzindo a sua capacidade fecundante (SALAMON e ROBINSON, 1962; WATSON e MARTIN.,1972; SALAMOM e MAXWELL, 1995b; MAXWELL e WATSON, 1996; HOLT, 2000a).

A combinação da temperatura de congelação, composição organica do diluidor, concentração do crioprotetor e controle higiênico na manipulação do sêmen são fatores que afetam o período de vida do espermatozóide. Os recentes avanços na tecnologia da reprodução, bem como na fisiologia reprodutiva, têm aberto uma nova perspectiva na conservação do sêmen (YOSHIDA, 2000)

Além do diluidor e da temperatura, outros fatores como a concentração espermática, e, provavelmente, a interação entre fatores podem influenciar, positiva ou negativamente, a conservação do sêmen ovino congelado (D'ALESSANDRO et al., 2001; BAG et al., 2002; CHENG et al., 2003). É necessário o desenvolvimento de um protocolo de congelação para o sêmen ovino, como também de uma técnica de inseminação artificial que possam ser aplicados em condições de laboratório e de campo em todo o mundo e assim, otimizar a inseminação artificial na espécie ovina (PAULENZ et al, 2004)

O presente estudo teve como objetivo pesquisar um protocolo viável de congelação de sêmen ovino que possibilite uma boa sobrevivência do sêmen pós-descongelação visando sua aplicação na inseminação artificial por via cervical e obtenção de taxas de concepção satisfatórias nas raças de ovinos nativos do Nordeste brasileiro.

## **CAPÍTULO 1**

### **REFERENCIAL TEÓRICO**

**Pesquisa de novo método de congelação para preservação do sêmen de  
ovinos Santa Inês**

## 1. Célula Espermática

Os espermatozoides são células alongadas, altamente especializadas, consistindo de uma cabeça achatada contendo núcleo e de uma cauda que proporciona a motilidade celular, recoberto por uma membrana plasmática. A parte anterior da cabeça está envolta pelo acrossoma, portador de enzimas necessárias ao processo de fertilização. O colo conecta a cabeça do espermatozoide com o flagelo, que é subdividido em peça intermediária, principal, terminal, e responsável pela propulsão dos espermatozoides (EVANS e MAXWELL, 1987; HAFEZ, 2004). Estudos conduzidos por Jones (1973) mostraram que a membrana plasmática dos espermatozoides difere nas suas propriedades físicas entre as espécies de mamíferos. Espermatozoides diluídos em substâncias com baixa concentração de tampão apresentavam inchaço e quebra das estruturas subjacentes, e os espermatozoides de carneiro são mais sensíveis a estes efeitos do que os de suíno e bovino. Os espermatozoides de carneiro, bovino, suíno e cavalos contêm alta relação de ácidos graxos insaturados / saturados, portanto são mais susceptíveis aos danos provocados pelo choque térmico durante a criopreservação (DARIN-BENNETT e WHITE, 1977; PARKS e LYNCH, 1992; WHITE, 1993).

Nas amostras de sêmen dos mamíferos encontram-se populações heterogêneas de espermatozoides. Entretanto, nem todos os espermatozoides de uma mesma população tem o mesmo potencial fecundante, alguns são mais capacitados, enquanto outros nunca adquirem potencial fertilizante, tornando-se inviáveis, para fecundação do oócito (AMAN e HAMMERSTEDT, 1993; MAXWELL e WATSON, 1996). O processo de fecundação requer do espermatozoide, uma combinação de fatores para alcançar o óvulo, entre os quais está o transporte bem sucedido no genital feminino, que depende do local da deposição do sêmen e subsequente envelhecimento das células espermáticas antes de entrar em contato com o oócito, por isso o processo de fertilização é facilitado pela inseminação no útero ou no oviduto (MAXWELL e WATSON, 1996).

A morfologia espermática, em especial a integridade das membranas, é um dos atributos essenciais para um espermatozoide ser fértil. Podem ocorrer lesões do acrossoma durante o processo de congelação e descongelação que não interferem na motilidade

espermática, por isso, a análise desse parâmetro é considerada fundamental para a predição da fertilidade (HEALEY, 1969; WATSON e MARTIN, 1972; LUZ et al., 2000). As características morfológicas dos espermatozóides poderão ser analisadas por esfregaços corados, para determinar a percentagem de espermatozóides anormais. Este parâmetro é influenciado pela época do ano, maturidade sexual, raça e o regime alimentar (MIES FILHO, 1987; BARIL, 1993; CBRA, 1998).

### **1.1 Composição do Sêmen Ovino**

O sêmen é um líquido ou suspensão celular semigelatinosa contendo espermatozóides e plasma seminal, um fluido extracelular, que atua como veículo para transporte da célula espermática. Além disso, funciona como um meio rico em nutrientes que proporciona a sobrevivência dos espermatozóides no genital feminino, composto de secreções das glândulas anexas do aparelho reprodutor masculino. O plasma seminal tem importante função na interação com o útero, protegendo o espermatozóide durante o transporte espermático e prorrogando sua sobrevivência no genital feminino (EVANS e MAXWELL, 1987; KATILA, 2001; HAFEZ, 2004; GÜNDOGAN, 2006).

O ejaculado ovino é caracterizado por um baixo volume e, conseqüentemente, uma alta concentração espermática. O volume é em torno de um a dois mililitros e a concentração varia entre dois e seis bilhões de espermatozóides. Em um carneiro saudável pode-se constatar 80% ou mais de células com movimento retilíneo progressivo (EVANS e MAXWELL, 1987; BICUDO et al., 2005).

O plasma seminal ovino é um líquido opaco e claro e o sêmen é cremoso, de cor esbranquiçada devido à alta concentração de espermatozóides. É normalmente um meio isotônico e neutro. O pH se mantém mais próximo de 7,0 e protege os espermatozóides de mudanças bruscas de pH que prejudicam a sobrevivência das células espermáticas (EVANS e MAXWELL, 1987; 1990). O plasma seminal tem um papel significativo no desenvolvimento da motilidade espermática e na habilidade de congelação (TAHA et al, 2000; GÜNDOGAN, 2006). Existe evidência de que processos como a diluição, incubação, resfriamento, congelação e descongelação alteram a função do espermatozóide, e que

alguns desses efeitos podem ser associados à remoção do plasma seminal (MAXWELL e JOHNSON, 1999).

O sêmen ovino é composto por 5g/100mL de proteína, pH: 5,9-7,3, frutose: 250mg/100mL, sorbitol: 26-170, ácido cítrico: 110-260, inositol: 7-14, glicerilfosforilcolina: 1100- 2100, sódio  $178 \pm 11$ , potássio:  $89 \pm 4$ , cálcio:  $6 \pm 2$ , magnésio  $6 \pm 8$ , cloretos: 86 mg (HAFEZ, 2004). A distribuição dos principais íons (Na, Cl, K, Ca, P) entre a fração do espermatozóide e o plasma seminal poderá fornecer a base para a variação da qualidade do sêmen entre as raças de carneiros e devem ser considerados os efeitos de concentração sobre a qualidade do sêmen e na avaliação da fertilidade de rebanhos ovinos (ABDEL-RAHMAN et al., 2000). Contudo, os níveis bioquímicos dos constituintes do plasma seminal variam extremamente as raças e indivíduos, pois estudos têm demonstrado que há variação na secreção da frutose seminal (MANN, 1946; ASSUMPÇÃO et al., 2005). A frutose é o açúcar mais facilmente metabolizável e proporciona a maior fonte de energia aos espermatozóides do sêmen (MANN, 1946; EVANS e MAXWELL, 1987; WILLIAMS e FORD, 2001).

Gündogan (2006) observou diferenças nas proporções das principais proteínas do plasma seminal (globulina e albumina), o aumento da globulina durante determinada estação do ano, estava associado a uma boa qualidade do sêmen. Taha et al. (2000) trabalhando com carneiros de diferentes raças, em clima temperado, constataram um aumento acentuado de lipídeos totais e de colesterol no início do verão com os valores elevado até o início do outono. A qualidade do sêmen e a eficiência da cobertura são afetados pelas estações do ano (FOOTE, 2002).

## **1.2 Metabolismo da Célula Espermática Congelada**

As variações existentes entre as espécies, na fisiologia da membrana do espermatozóide e na estrutura bioquímica, provavelmente induzem as diferentes respostas no resfriamento e na congelação, influenciando na fertilidade do sêmen. A criopreservação é altamente letal e uma significativa proporção de espermatozóides, aproximadamente 50% de uma amostra de sêmen, sofrem danos letais ou sub-letais, reduzindo a eficiência do

transporte espermático, conseqüentemente, o número de espermatozóides necessário, para realizar uma inseminação artificial com sêmen congelado deve ser superior ao do sêmen fresco (MAXWELL e WATSON, 1996; HOLT, 2000a).

Existe uma variabilidade entre carneiros com relação a aptidão individual para a congelação do sêmen, existindo carneiros com boa aptidão, designados de bons congeladores (WATSON, 2000; CÂMARA et al., 2004). A composição protéica do plasma seminal e da membrana espermática varia entre os indivíduos de uma mesma espécie e entre espécies de animais; estas proteínas são marcadores moleculares de congelabilidade do sêmen (RONCOLHEITA et al., 1999; ZAHN et al., 2006). A eletroforese de extratos da membrana espermática de equinos revelou a presença de 43 bandas protéicas. Existindo variação na presença destas proteínas, nos espermatozóides de animais considerados bons ou maus congeladores; mostrando correlação significativamente positiva entre a congelabilidade e a fertilidade do sêmen, apresentando determinadas bandas protéicas na membrana espermática (ZAHN et al., 2006).

O espermatozóide ovino é sensível ao processo de congelação quando comparado a outras espécies, decorrentes de peculiaridades da membrana espermática. Estudos da ultra-estrutura do espermatozóide bovino mostraram que o processo de congelação provocava alterações mínimas nos espermatozóides, diferindo do ovino, no qual, uma proporção de células espermáticas apresentava acrossoma inchado ou a total remoção das regiões citoplasmáticas (HEALEY, 1969; JONES e MANN, 1977; BICUDO et al., 2007). A ampla distribuição de lipídeos insaturados nas membranas celulares e sua instabilidade na presença de oxigênio têm provocado peroxidação lipídica, que resulta em efeitos deletérios sobre a célula espermática. A membrana plasmática do espermatozóide ovino é particularmente rica em ácidos graxos polinsaturados tornando-o altamente susceptível a peroxidação lipídica, devido à ação das espécies reativas ao oxigênio (ROS), formados pelo estresse oxidativo. Os espermatozóides são altamente susceptíveis a peroxidação de seus fosfolipídeos endógenos (DARIN-BENNETT e WHITE, 1977; JONES e MANN, 1977; MAXWELL e WATSON, 1996; BUCAK et al., 2007).

Independente do diluidor, da taxa de diluição, da temperatura ou das condições de preservação, os espermatozóides sofrem danos com o aumento do tempo de conservação. A

principal mudança ocorrida durante a conservação inclui a redução na motilidade e na integridade morfológica do espermatozóide (SALAMON e MAXWELL, 2000; YOSHIDA, 2000). Estas mudanças podem ocorrer devido ao acúmulo de produtos tóxicos oriundos do metabolismo oxidativo, principalmente os ROS formados na peroxidação lipídica da membrana do espermatozóide. A peroxidação dos lipídeos pode ser revertida pela adição de anti-oxidantes ao meio diluidor. O efeito benéfico dos antioxidantes é retardar a desestabilização da membrana associada com o envelhecimento do espermatozóide. (MAXWELL e WATSON, 1996; BICUDO et al., 2007; BUCAK et al., 2007). Estes eventos acima descritos são acompanhados por declínio do transporte e da sobrevivência do espermatozóide no trato reprodutivo feminino com redução na fertilidade (SALAMON e MAXWELL, 2000).

O intervalo de temperatura no qual o espermatozóide está mais propenso as injúrias do congelamento, situa-se entre  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Estudos indicam que a congelação entre  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  não induz permeabilidade significativa da membrana espermática, entretanto, a congelação abaixo de  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  foi seguida de permeabilidade logo após a descongelação (HOLT e NORTH, 1994; BYRNE et al., 2000). As injúrias provocadas ao espermatozóide pelo processo de congelação podem ser físicas, bioquímicas ou funcionais. Os danos físicos ocorrem na membrana plasmática e acrossomal, na bainha mitocondrial e no axonema. As membranas plasmáticas e acrossomais são mais sensíveis do que o núcleo e o flagelo do espermatozóide. Os danos ultra-estruturais são acompanhados por mudanças bioquímicas e por perdas de substâncias vitais, como enzimas, proteínas, íons e aminoácidos responsáveis pela integridade funcional, sobrevivência *in vivo* e capacidade de fertilização do espermatozóide (HEALEY, 1969; JONES e MANN, 1977; SALAMON e MAXWELL, 1995b).

Uma das causas da crioinjúria seria a alteração nas propriedades estruturais da membrana plasmática dos espermatozóides, que contém lipídeos dos quais 65-70% do total são fosfolipídios. Uma grande proporção destes contém o ácido decohexanóico que confere fluidez e instabilidade a membrana espermática. Para contrapor esses efeitos, a membrana plasmática contém quantidade variável de colesterol. Na temperatura fisiológica, em algumas regiões da membrana espermática coexistem lipídeos na fase de transição fluida e



gel. Os lipídeos da membrana plasmática respondem as mudanças de temperatura, com alterações do seu estado físico. Com a redução da temperatura ocorre transição da fase fluida para a fase de gel favorecendo mudanças na permeabilidade iônica e a atividade enzimática (HOLT, 2000b; BUCAK et al., 2007).

Os efeitos mais contundentes impostos pela congelação sobre os espermatozóides ovinos são caracterizados por modificação da atividade respiratória e da interação com as células do oviduto e, suspeita-se que pode haver pequeno incremento nas taxas de mortalidade de embriões obtidos com espermatozóides criopreservados (BICUDO et al, 2005). As proteínas da membrana plasmática são aglomeradas na separação da fase lipídica, e assim, pode-se esperar alteração funcional, especialmente das proteínas que se submetem a modulação estrutural para sustentar sua função, como as proteínas dos canais de íons (WATSON, 2000). O processamento do sêmen resfriado e congelado altera a maturação das membranas espermáticas, assim, aumentando a proporção de células capacitadas com reação acrossômica, quando comparado com o sêmen fresco (CURRY e WATSON, 1994; MAXWELL e WATSON, 1996). Qualquer alteração espermática ligada ao resfriamento e a congelação tem relação com a transferência de proteínas através da célula, a qual é modulada pela distribuição de lipídeos ao longo da membrana plasmática (PARKES e GRAHAM, 1992), alterando a resposta para indução da capacitação e da reação do acrossoma dos espermatozóides congelados e descongelados durante a fertilização (GUTHRIE e WELCH, 2005).

A absorção do cálcio na célula espermática durante o resfriamento contribui com mudanças na capacitação e nos eventos de fusão, entre a membrana plasmática e a membrana acrossomal (WATSON, 2000). O espermatozóide resfriado a 5 °C e reaquecido demonstra que a sua habilidade de controlar o nível de cálcio intracelular depende da curva de resfriamento. O estresse do choque térmico severo resulta em uma perda irreversível da habilidade do espermatozóide na regulação do cálcio (ROBERTSON e WATSON, 1996).

O processo de criopreservação interfere com a regulação do  $\text{Ca}^{2+}$  no espermatozóide normal, causando um aumento no nível do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular quando comparado com o sêmen fresco e, interrompe a habilidade do espermatozóide para controlar o influxo deste íon. As injúrias provocadas no sistema regulador do  $\text{Ca}^{2+}$  pelo processo podem predispor o

espermatozóide, a uma incorreta regulação da capacitação e da reação do acrossoma, possivelmente contribuindo, para reduzir a capacidade de fertilização do sêmen criopreservado (BAILEY e BUHR, 1993).

Um fator importante durante a criopreservação é o estresse osmótico das células. Durante o processo de congelação as células são expostas a condições hiperosmóticas, com a congelação da água extracelular e de modo inverso durante a descongelação com o gelo derretido. Essas mudanças podem ocorrer gradualmente ou rapidamente, dependendo da curva de resfriamento e do método de adição dos crioprotetores, envolvendo a osmolaridade entre o meio intracelular e extracelular. Diluidores hiperosmóticos podem resultar em remoção parcial da água congelável da célula espermática, antes da congelação e, reduzir o volume do potencial de formação de gelo intracelular, diminuindo os riscos da injúria da congelação (FISER et al., 1981). O mesmo foi observado por Bucak et al. (2007) quando testaram o diluidor TRIS em diferentes osmolaridades e constataram que o diluidor de 400 mOsm foi melhor para congelação do sêmen ovino. Mudanças no pH, em função do aumento de acidez (5,3-6,0), reflete na motilidade espermática. Entretanto, a taxa de variação do pH é controlada pela temperatura do sêmen (MOORE et al., 1940).

O choque térmico pode ser amenizado pela adição de proteínas ao diluidor do sêmen ovino (BICUDO et al., 2007). Azevedo (2006) observou que a adição de  $\alpha$ -lactoalbumina não aumentou a viabilidade, a integridade do acrossomo e o status de capacitação e de reação acrossomal dos espermatozóides ovinos congelados. Com o conhecimento dos eventos provocados pelas injúrias da criopreservação pode-se prevenir, retardar, ou mesmo, reverter mudanças na membrana espermática e melhorar a fertilidade da inseminação artificial em ovinos (MAXWELL e WATSON, 1996).

## **2. Diluidores**

O plasma seminal, somente, não fornece proteção ao espermatozóide contra mudanças de temperatura. Assim, para a conservação do sêmen em baixas temperaturas é necessário um diluidor com propriedades especiais. Geralmente com um pH, capacidade tampão e osmolaridade adequada, conter uma fonte energética, um agente protetor da

membrana celular, como a gema de ovo, durante o resfriamento a 5°C e um crioprotetor, usualmente o glicerol, ideal para proteger o espermatozóide da injúria criogênica (EVANS e MAXWELL, 1987; SALAMON e MAXWELL, 2000).

Os diluidores que demonstram inequívoca eficácia têm em sua composição um sistema tampão (citrato, TRIS, TES, HEPES, MOP, MES); um fator protéico de crioproteção como as proteínas do leite e da gema do ovo, que contém lipoproteínas de baixa densidade para proteger a membrana da célula espermática contra o choque térmico, mantendo a integridade do espermatozóide; diversos açúcares (monossacarídeos como a glicose, a manose e a frutose; dissacarídeos como a sacarose e a lactose) e diversos aditivos a exemplo de antioxidantes e glicina (SALAMON e MAXWELL, 2000).

A escolha, do tipo de substância tampão, da natureza dos crioprotetores, dos aditivos como açúcares, os quelatos de cálcio, os antioxidantes e as proteínas do leite e da gema do ovo, tem revelado influencia profunda na sobrevivência espermática. (HOLT, 2000 a).

## 2.1 TRIS

O TRIS (*hydroxymethyl aminomethane*) foi utilizado primeiramente na espécie bovina, como principal componente do diluidor para congelação do sêmen (DAVIS et al, 1963). Este diluidor possui grande capacidade tampão, atividade osmótica e baixa toxicidade em alta concentração (NAHAS, 1961) Em um estudo utilizando o TRIS como diluidor básico na congelação do sêmen ovino, o espermatozóide tolerou uma variação da osmolaridade de 250 mM para 400 mM e a glicose foi o açúcar mais adequado ao meio TRIS do que a frutose, lactose ou a rafinose. O TRIS apresenta fraca capacidade tampão em pH abaixo de 7,5 (GOOD et al., 1966).

O diluidor TRIS é utilizado para sêmen fresco com uso imediato e no processo de resfriamento e congelação do sêmen ovino (NEVES et al., 1982; EVANS e MAXWELL, 1987; PAULENZ et al., 2002). Estudos, *in vitro*, provaram que o Triladil (a base de TRIS) é um diluidor igual ou superior aos diluidores lactose-gema e sacarose-lactose-gema, e que a adição de 2% de albumina sérica bovina ao Triladil tem efeito protetor na integridade do

acrossoma (SALAMON e MAXWELL, 2000). Sanchez-Partida et al. (1999) relataram que a prolina e a glicina betaina adicionadas ao diluidor TRIS melhoraram as características de motilidade após descongelação do sêmen de carneiro, entretanto não refletiu na fertilidade após inseminação cervical ou laparoscópica.

## **2.2 Leite**

O leite é uma substância isotônica contendo muitos componentes favoráveis à manutenção da viabilidade espermática e foi usado extensivamente na diluição do sêmen bovino (SALAMON e MAXWELL, 1995a). O diluidor leite desnatado foi adaptado para congelação do sêmen ovino, principalmente na forma reconstituída combinado com arabinose, frutose ou gema de ovo (SALAMON e MAXWELL, 2000). É um meio biológico de composição complexa composto de proteínas, sais, glicídios, lipídios, vitaminas, etc. (VIEIRA DE SÁ, 1990). Seja integral, desnatado ou reconstituído, o leite tem sido utilizado por muitos anos como diluidor do sêmen ovino. O pH em torno de 7,0 e a pressão osmótica em torno de 300 mM são próximos aos valores fisiológicos do sêmen (HAFEZ, 2004).

A eficácia do leite como meio de diluição e conservação do sêmen tem sido atribuída a sua fração protéica, principalmente a caseína que parece ter efeito protetor sobre os espermatozóides, reduzindo a ligação das proteínas BSP (Bull Seminal Plasma) com os espermatozóides e a perda de lipídeos. O mecanismo pelo qual o leite protege os espermatozóides envolve a interação das BSP com as micelas de caseína, impedindo assim, sua ligação com o colesterol e fosfolipídeos da membrana espermática evitando a evasão destes constituintes, o que torna o espermatozóide menos susceptível ao choque térmico, preservando a motilidade espermática e a viabilidade durante a estocagem. O sêmen de carneiro fresco ou resfriado tem sido diluído principalmente com leite (MAXWELL e SALAMON, 1993; BERGERON et al., 2007).

Os resultados da fertilidade após inseminação artificial cervical com sêmen congelado no diluidor leite foram diversificados, alguns inferiores (0-23%) e outros moderados (30-45%) (SALAMON e MAXWELL, 2000). Fiser et al. (1981) estudaram o

efeito de diferentes osmolaridades do diluidor leite desnatado e a taxa de descongelação, sobre a crio-sobrevivência dos espermatozóides de carneiros e constataram uma manifestação de efeito benéfico quando congelados no leite desnatado hipertônico.

### **2.3 HEPES**

O HEPES é um tampão orgânico utilizado em cultura de células animais, diluidor de sêmen e meio de cultivo de embriões (GOOD et al, 1966; MONTAGNER et al., 2000). É uma substância semelhante ao TRIS e TES que controla as flutuações de pH do meio diluidor. Na estocagem do espermatozóide ocorre produção de íons hidrogênicos que baixam o pH, necessitando de tampões para manter o nível do pH adequado ([www1. agro-semen tecnologia](http://www1.agro-semen-tecnologia.com.br), acessado em 03/07/2008). O HEPES é o tampão orgânico mais adequado na variação no pH fisiológico de 7,2-7,6. Foi utilizado na composição de diluidores, de sêmen resfriado e congelado de equinos (PADILLA e FOOTE, 1991; SILVA et al. 2008) e do sêmen resfriado de ovinos (ARAÚJO, 2000).

### **3. Crioprotetores**

Os eventos ocorridos durante a criopreservação envolvem os passos: redução da temperatura, desidratação celular, congelação e descongelação (MEDEIROS, 2002). Estes procedimentos ocasionam danos celulares devido a mudança na temperatura, formação de cristais de gelo, injúrias oxidativas, alterações na membrana do espermatozóide, lesões no DNA e estresse osmótico, além da toxicidade dos crioprotetores (MERYMAN, 1971; BALL e VO, 2001; MEDEIROS, 2002). Os crioprotetores devem ser adicionados ao diluidor para evitar a formação de cristais de gelo intracelular protegendo o espermatozóide durante a criopreservação e a descongelação (MEDEIROS, 2002; PURDY, 2006).

A estrutura molecular é um parâmetro importante para determinar a eficiência dos crioprotetores, uma vez que, possuem afinidade pela água. A desidratação celular promovida pelo agente crioprotetor impede a formação de cristais de gelo no interior da célula espermática devido a mudança na osmolaridade do meio intracelular. Estas ligações

alteram a orientação das moléculas de água dos cristais de gelo, criando um ambiente menos prejudicial às células (MERYMAN, 1971; MEDEIROS, 2002).

Apesar de imprescindíveis para a sobrevivência dos espermatozóides no processo de descongelamento, os crioprotetores podem exercer efeitos tóxicos induzindo a desestabilização das membranas espermáticas e, tornando algumas substâncias utilizadas na criopreservação, impróprias para o espermatozóide (MAXWELL e WATSON, 1996; WATSON, 2000).

O tipo do crioprotetor exerce um efeito significativo sobre a motilidade do sêmen pós-descongelamento, assim como, sobre os defeitos de acrossoma, folhas morfológicas totais e a integridade da membrana plasmática dos espermatozóides (SOYLU et al., 2007).

As concentrações de crioprotetores como, a gema de ovo e o glicerol, poderão ser reduzidas, com a adição da prolina ou da glicina betaina nos diluidores, sem afetar as características de motilidade dos espermatozóides de carneiro (SÁNCHEZ-PARTIDA et al, 1998).

Os crioprotetores podem ser classificados como penetrantes que protegem as células das injúrias na congelação lenta; e como não penetrantes que requerem uma taxa de congelação e descongelamento mais rápida, para conferir proteção celular (MERYMAN, 1971; MEDEIROS, 2002).

### **3.1 Crioprotetores não penetrantes**

#### **3.1.1 Gema de Ovo**

Os diluidores usados no sêmen de mamíferos aumentam o volume, contudo podem ocorrer fatores danosos à viabilidade espermática (BOGART e MAYER, 1950). A gema de ovo de galinha é um constituinte comum aos diluidores de sêmen, utilizado rotineiramente nos meios de conservação do esperma de várias espécies, principalmente de bovinos e ovinos. Esta substância apresenta uma ação preservadora sobre o metabolismo, a motilidade e a fertilidade dos espermatozóides conservados a baixas temperaturas (MAYER e LASLEY, 1945; O'SHEA e WALES, 1967; SALAMOM e MAXWELL, 2000;

MARCO-JIMÉNEZ et al., 2004). Aparentemente contribuindo com dois fatores distintos, um fator de resistência que protege as células espermáticas do choque térmico, fator resistência, e, o segundo fator, o fator de conservação, que contribui para manter a sobrevivência do espermatozóide (BOGART e MAYER, 1950). Um diluidor constituído de substância tampão e de gema de ovo não revela com sucesso a conservação do sêmen de carneiro e suíno, quando comparado com o sêmen bovino, devido estas espécies possuírem poucas células espermáticas capazes de adquirir o fator de resistência (MAYER e LASLEY, 1945).

Segundo Watson e Martin (1972), o efeito protetor da gema de ovo parece estar associado com grandes moléculas da fração sobrenadante leve, as quais são provavelmente, proteínas ou lipoproteínas. Os principais componentes das lipoproteínas da gema de ovo são os triglicerídeos, colesterol e ésteres de colesterol (FOULKES, 1977) O complexo de lipoproteína e a fração de baixa densidade da gema de ovo que é composta por 85-90% de lipídeos e 10-15% de proteínas, preserva a motilidade das células espermáticas durante o processo de congelação (PACE e GRAHAM, 1974).

Kampschmidt et al. (1953) e Blackshaw e Salisbury (1957) relatam que as lipoproteínas e os lipídeos da gema de ovo protegem o espermatozóide de bovino e ovino, do choque térmico, contribuindo desta forma, como meio de conservação. A fração de fosfolipídeos das lipoproteínas pode regular a permeabilidade da membrana celular e, ser útil para manter a estrutura citoplasmática, que está sujeita a estresse elevado durante a criopreservação (BIALY et al., 1957).

A gema de ovo é aceita como um agente eficiente na proteção do espermatozóide contra o choque térmico e o efeito de transição da fase lipídica durante a criopreservação, contudo, variação entre os tipos de gema e como potencial para a transmissão de patógenos tem estimulado a pesquisa de substâncias alternativas, com o objetivo de produzir um diluidor de qualidade uniforme e eliminar os riscos de contaminação (FOULKES e STEWART, 1977; MATSUOKA et al., 2006). A adição de componentes de origem animal, gema de ovo e leite, aos diluidores comerciais usados para diluir sêmen representam um risco potencial de contaminação com bactérias e micoplasma (BOUSSEAU et al, 1998) No entanto, Marco-Jiménez et al. (2004) averiguaram o potencial de contaminação da gema de

ovo em pó e da gema de ovo fresca constatando que a contaminação foi similar para ambos os tipos, mas com adição de antibióticos o crescimento bacteriano foi controlado. Matsuoka et al. (2006) indicaram como alternativa, a adição de 10 a 15% de BSA e de trealose ao diluidor, para substituir a gema de ovo de galinha e favorecer a viabilidade espermática do sêmen criopreservado.

Da mesma forma Aboagla e Terada (2004) avaliaram o efeito da adição de gema de ovo no diluidor sobre os espermatozoides de caprinos e, constataram um efeito positivo na percentagem de espermatozoides móveis e na motilidade progressiva, mas os espermatozoides apresentaram significativa perda de acrossoma. Pace e Graham (1974) observaram uma significativa interação entre o nível de glicerol e a adição de gema de ovo aos diluidores, constatando uma maior proporção de espermatozoides móveis de bovinos, quando congelados com 4% de glicerol e 20% de gema de ovo.

Ritar e Ball (1993) testaram três níveis de gema de ovo (1,3%, 4% e 12%) e observaram um declínio excessivo da motilidade espermática do sêmen descongelado de carneiro, após 6h de incubação, diluído em TRIS com adição de 12% de gema. Enquanto que, Marco-Jiménez et al. (2004) compararam três concentrações de gema de ovo (10%, 15% e 20%) e não encontraram diferença entre os parâmetros de motilidade espermática.

Desta forma, além da gema do ovo de galinha, outras, proveniente de diversas espécies aviárias (codorna, pata, pomba, perdiz, gansa) foram testadas em diluidores de sêmen de bovino (Su et al., 2008; Andrabi et al., 2008), caprino (Santiago-Moreno et al., 2008), suíno (Bathgate et al., 2006), equino (Humes e Webb, 2006) e muares (Trimeche et al., 1997) para estabelecer um protocolo de congelação que promovesse a melhor criopreservação do sêmen destas espécies.

## **3.2. Crioprotetores penetrantes**

### **3.2.1 Glicerol**

O glicerol como o metanol, etilenoglicol, propilenoglicol e dimetilsulfóxido pertencem ao grupo dos crioprotetores, que penetram no citoplasma celular e são



importantes para manter a motilidade pós-descongelamento e a integridade funcional da membrana plasmática. No entanto, induzem efeitos tóxicos e osmóticos sobre o espermatozóide, de acordo com a espécie e, dependendo de sua concentração na solução de diluição (HOLT, 2000b; PURDY, 2006; BARBAS e MASCARENHAS, 2007). A descoberta da adição do glicerol como crioprotetor foi de grande importância nos estudos de congelamento do sêmen, pois, até então, este evento não era possível (HOLT, 2000a). O glicerol penetra rapidamente na membrana sendo uma das razões de ser um crioprotetor superior (EL-ALAMY e FOOTE, 2001). Várias substâncias têm sido testadas na ação crioprotetora do espermatozóide de carneiro, mas nenhuma provou ser melhor do que o glicerol (SOYLU et al., 2007; BARBAS e MASCARENHAS, 2007).

O glicerol é o crioprotetor mais utilizado, proporciona a desidratação celular através do seu efeito osmótico, criando um meio hipertônico o qual induz a saída de água das células espermáticas, evitando a formação de gelo intracelular e, aumentando a sobrevivência à criopreservação (MERYMAN, 1971; HOLT, 2000; PURDY, 2006). Uma exposição prolongada ao glicerol pode ser nociva ao espermatozóide e acelerar a reação acrossômica (SLAVIK, 1987; EL-ALAMY e FOOTE, 2001; MORRIER et al., 2002). A reação do acrossoma é acelerada pelo glicerol, o que pode ser uma das causas da baixa taxa de concepção após inseminação com sêmen congelado. As mudanças provocadas durante o processo de capacitação são desencadeadas pelo influxo de cálcio na célula espermática (SINGH et al., 1978; MORRIER et al., 2002; MAXWELL e WATSON, 1996). O efeito negativo do glicerol poderá ser reduzido, quando adicionado a uma temperatura próxima a 0 grau (COLAS, 1975). Entretanto, estudos têm demonstrado que o glicerol pode ser adicionado à temperatura ambiente sem prejudicar a motilidade espermática (FOOTE, 1970a; FOOTE, 1970b; MORRIER et al., 2002; ANEL et al., 2003).

Na formulação do diluidor de sêmen, o glicerol pode ser adicionado inicialmente, após a colheita (método de uma etapa) ou mais tarde em uma fração separada, fração glicerolizada, após refrigeração e antes da congelamento do sêmen (método de duas etapas).

Muitos autores não encontram diferenças de efeito associado com o momento de adição do glicerol (BARBAS e MASCARENHAS, 2007; SALAMON e MAXWELL, 1995a; EVANS e MAXWELL, 1987). Uma única diluição do sêmen com um diluidor

contendo glicerol, pode ser tão efetiva quanto, duas diluições (SALAMON e MAXWELL, 2000). Morrier et al. (2002) quando congelaram sêmen de carneiros em dois diluidores comerciais, não encontraram diferença significativa na qualidade do sêmen após a descongelação, entre os diluidores em que o glicerol foi adicionado em uma única etapa a temperatura de 30°C ou de 5°C.

A concentração de glicerol requerida para máxima criopreservação do espermatozóide é influenciada por vários fatores como a velocidade de congelação, a composição e a osmolaridade do diluidor (EVANS e MAXWELL, 1987). Melhores resultados foram obtidos com 4-6% de glicerol com curva de congelação de 10-100°C/min (BYRNE et al., 2000; ANEL et al., 2003). Fiser e Fairfull, (1984) constataram que a concentração de glicerol, a velocidade de congelação e sua interação tiveram um efeito significativo sobre os parâmetros de espermatozóides móveis e motilidade progressiva do sêmen ovino. Uma concentração de glicerol acima de 8% é tóxica e tem contribuído para um decréscimo progressivo na sobrevivência espermática. A tolerância do espermatozóide ovino varia com o tempo de resfriamento, de acordo com a concentração de glicerol, um aumento na concentração de glicerol resulta em baixa tolerância na variação da curva de congelação. Um aumento na concentração de gema de ovo pode reduzir o nível de glicerol no diluidor. A qualidade do sêmen congelado e descongelado foi melhor com uma concentração 4 a 8 % de glicerol do que com outras concentrações e, a motilidade individual progressiva aos 60 minutos de incubação foi menor com 8% de glicerol quando comparado com 4% de glicerol (FISER e FAIRFULL, 1986).

#### **4. Efeito diluidor, concentração espermática e temperatura de descongelação**

A qualidade do sêmen, congelado descongelado, é afetada por muitos fatores (SALAMON e MAXWELL, 1995a). Estes fatores incluem a qualidade do sêmen usado na criopreservação, a composição dos diluidores, a concentração dos crioprotetores, o tipo de palhetas, a temperatura de congelação, a curva de congelação e a temperatura de descongelação (EL-ALAMY e FOOTE, 2001; D'ALESSANDRO et al., 2001; BAG et al. 1999).

Paulenz et al. (2002) testando os diluidores TRIS, Leite e citrato de sódio no resfriamento do sêmen ovino, observaram que existia interação entre diluidor e temperatura de resfriamento e, que essa afetava a motilidade dos espermatozóides. Barbas et al. (2002) constataram interação entre a época da inseminação e o tipo de diluidor utilizado no resfriamento do sêmen a 15 °C.

#### **4.1. Temperatura**

O espermatozóide está sujeito a grandes mudanças na pressão osmótica durante o processo de criopreservação. O estresse sobre a membrana espermática é dependente do diluidor, da concentração do crioprotetor e da permeabilidade da membrana espermática à água, interagindo com a temperatura de congelação e descongelação (CURRY et al., 1994).

A curva de resfriamento do sêmen é um parâmetro que pode influenciar a sobrevivência e a habilidade do espermatozóide após congelação e descongelação em ampolas, pellets e palhetas de PVC (SALAMON e MAXWELL, 1995a; BYRNE et al., 2000). O espermatozóide de carneiro é sensível à mudança de temperatura extrema durante o processo de congelação, podendo tolerar uma variação de -79 °C a -160 °C (SALAMON e MAXWELL, 1995a). A temperatura inicial de congelação tem efeito significativo sobre a motilidade e velocidade dos espermatozóides após a descongelação (BAG et al., 1999). É de grande importância neste processo a curva de congelamento, na variação da temperatura crítica, definida quando ocorre formação de cristal de gelo e conseqüente desidratação celular. Durante esta variação, aproximadamente -5 a -50 °C a curva de congelação determina se as células permanecem em equilíbrio com o seu ambiente extracelular ou, torna-se progressivamente super congelada, com possibilidade da formação de gelo intracelular (KUMAR et al., 2003). Colas (1975) quando estudou o efeito da temperatura inicial de congelação não detectou nenhuma diferença significativa na qualidade espermática do sêmen congelado em palhetas, no vapor de nitrogênio a temperatura de -75 °C e -125 °C, mas notificou uma significativa redução da qualidade espermática quando o sêmen foi congelado no vapor de nitrogênio a -55 °C.

Bag et al. (1999) concluíram que a temperatura de congelação tem um efeito significativo sobre a integridade do acrossoma pós-descongelação, sendo a congelação a uma temperatura de -125 °C a que melhor preserva este parâmetro, quando comparada às temperaturas de -25 °C ou -75 °C. Paulenz et al. (2007) congelaram sêmen ovino usando congelador de sêmen a uma temperatura -130 °C em palhetas de 0,25 mL e, obtiveram mais de 50% da taxa de não retorno ao estro de ovelhas, após inseminação cervical.

#### **4.2. Concentração Espermática na dose de Sêmen**

O sucesso da congelação depende notavelmente da taxa de diluição do sêmen. A diluição do sêmen tem como função proteger os espermatozóides durante o resfriamento, congelação e descongelação. Outra razão seria aumentar o número de fêmeas inseminadas com um único ejaculado e padronizar o número de espermatozóides viáveis em cada dose de sêmen (SALAMON e MAXWELL, 1995a).

A determinação do número mínimo de espermatozóides móveis, não reduz a fertilidade após inseminação que é importante para a vasta utilização do sêmen de caprinos e ovinos. O volume da dose de sêmen, também influencia na fertilidade. Este deve ser suficiente para permitir com sucesso, a deposição da dose inteira no aparelho reprodutor feminino (RITAR e BALL, 1993).

A influência do número de inseminação artificial cervical sobre os índices de prenhez, está estreitamente relacionada a concentração de espermatozóides na dose inseminante (CÂMARA et al., 2003). No sêmen criopreservado, o número de espermatozóide completamente funcional é reduzido abaixo do necessário para atingir uma alta fertilização (MAXWELL e WATSON, 1996; WATSON, 2000). Somente 20 milhões de espermatozóides na dose de sêmen ovino criopreservado são necessários para se obter, aproximadamente 50% de fertilidade na inseminação por laparoscopia, enquanto que, a inseminação cervical requer dez vezes mais, este valor (WATSON, 2000).

Uma redução na taxa de diluição do sêmen congelado para se obter uma alta concentração de espermatozóide na dose inseminante, produz uma baixa fecundação em ovinos (SALAMON e MAXWELL, 2000). Ritar e Ball (1993) compararam a viabilidade

espermática do sêmen de carneiros diluído no TRIS-gema em três diferentes concentrações 1: 0,5, 1:1, 1:2 (sêmen: diluidor) congelados em palhetas 0,25 mL e pellets; constataram que a viabilidade espermática foi significativamente superior no sêmen congelado em pellets com alta taxa de diluição, do que em outros protocolos.

D'Alessandro et al. (2001) avaliaram a influência de várias concentrações finais antes da congelação do sêmen ovino em palhetas de 0,25mL e observaram que, o aumento da concentração final de 500 para 800 milhões afetava negativamente as características de integridade da membrana e de motilidade espermática, tendo como consequência, a diminuição das taxas de parição de ovelhas inseminadas por laparoscopia com sêmen congelado nos diluentes TRIS-gema e Leite-gema.

## **5. Técnicas de congelação**

Kumar et al. (2003) avaliaram separadamente os parâmetros viabilidade e motilidade espermática em ovinos, suínos e bovinos verificando que, as diferenças entre estes dois parâmetros não são constantes entre os protocolos empregados, ou entre espécies, sugerindo danos em diferentes regiões da célula espermática que são influenciados pelas curvas de congelação enquanto que, a manutenção da motilidade está relacionada a integridade da membrana espermática e a um meio adequado.

### **5.1. Sistemas de Criopreservação do Sêmen**

A maioria do sêmen, manipulado fora dos laboratórios de pesquisa e de centrais de congelação é processado em sistema geladeira e vapor de nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>L). A técnica é viável, porém de difícil padronização das curvas de refrigeração e de congelação, uma vez que diversos fatores contribuem, para induzir as variações como: marca e modelo da geladeira, tipo de caixa de isopor, número de doses a serem congeladas e nível de nitrogênio líquido. O Sistema automatizado TK 3000, equipamento de fabricação nacional utiliza um programa estabelecido pelo fabricante P3.S2 para executar o resfriamento de 0,5 °C / min, iniciando em 32 °C até 5 °C com um tempo total de refrigeração de 90 minutos e

em seguida, submetido à congelação em duas fases: 15 °C/minuto e 10 °C/minuto até atingir -120 °C. O Sistema automatizado TK 3000 tem provado de maneira incontestável ser adequado à criopreservação do sêmen ovino, com qualidade equivalente, àquele processado no sistema geladeira e vapor de nitrogênio líquido (RODELLO et al., 2005).

Kumar et al. (2003) testando duas máquinas de congelação e três curvas de congelação (-1, -30 e -50 °C/min) constataram que não houve divergência entre as máquinas de congelação, mas existiu diferença significativa com relação curva de congelamento -30°C/min, em que, os espermatozóides mostraram a melhor viabilidade espermática e integridade do acrossoma. Buckrell et al. (1994) utilizaram o diluidor TRIS com 6,4% de glicerol, 20% de gema de ovo para congelar o sêmen de ovino a -140 °C em nitrogênio líquido sendo as palhetas de 0,5 mL envasadas com  $150 \times 10^6$  espermatozóides/palheta. Com este protocolo de congelação, obtiveram uma taxa de parição de 60% após inseminação cervical pelo Sistema Canadense Guelph.

## **6. Técnicas de Descongelação**

A variação da temperatura envolvida na congelação e criopreservação do sêmen, reduz a proporção de espermatozóides móveis e causa sérios danos estruturais, bioquímicos e funcionais à célula espermática (SÖDERQUIST et al., 1999). As diferentes formas de envase do sêmen (pellets, palhetas, ampolas), mesmo utilizando idênticos procedimentos de descongelação, influenciam na sobrevivência do espermatozóide (MAXWELL et al., 1995). A proporção do volume/superfície dos tipos de envase tem importante implicação para a taxa de congelação e descongelação. O uso de mini palhetas permite o envase automático do sêmen de ovino em centrais de inseminações, bem como é mais eficiente na estocagem em botijão criogênico (PAULENZ et al, 2004).

O procedimento de descongelação do sêmen é tão importante quanto, a congelação, para a sobrevivência espermática. O espermatozóide que sobreviveu à conservação a -196 °C terá um novo desafio na descongelação, e assim, atravessar a zona de temperatura crítica que vai de -15 °C a -60 °C (SALAMON e MAXWELL, 1995a).

Fiser et al. (1981) compararam dois métodos de descongelamento de palhetas conservadas por sete dias em nitrogênio líquido, e observaram uma alta viabilidade espermática no sêmen descongelado em água à temperatura de 39 °C por 30 segundos, em relação a descongelamento no ar à temperatura de 20 °C por 8 minutos. Assim como, Söderquist et al. (1997) encontraram diferença significativa na motilidade pós-descongelamento de sêmen ovino, bem como, na percentagem de espermatozoides com membrana intacta em palhetas descongeladas a 70 °C comparados a 35 °C, e também, não houve diferença significativa destes parâmetros, quando os resultados da descongelamento a 70°C e 50°C foram comparados. Em consequência, a técnica de descongelamento também afetou a fertilidade e a prolificidade após inseminação artificial em ovinos, onde a descongelamento a 70°C por 5 segundos foi superior a descongelamento a 50°C por 9 segundos (SÖDERQUIST et al., 1999).

Em um estudo, Paulenz et al. (2004) comparando mini-tubos e mini palhetas encontraram uma fertilidade superior para sêmen congelado em mini tubos do que em mini palhetas, independente do procedimento de descongelamento. Enquanto, Paulenz et al. (2007) constataram uma maior prolificidade nas ovelhas inseminadas por via vaginal com mini-palhetas descongeladas à temperatura de 35 °C por 12 segundos, em relação à descongelamento em mini-tubos a 70 °C por 8 segundos ou, mini-palhetas a 50 °C por 9 segundos. Alguns autores recomendam a descongelamento rápida em alta temperatura, este procedimento exige alta acurácia no tempo exato da descongelamento, pois pode provocar efeitos deletérios no espermatozoide, caso não seja bem monitorada (SÖDERQUIST et al., 1997). A descongelamento lenta em baixa temperatura pode facilitar a prática da Inseminação Artificial com sêmen congelado em sistemas extensivos de criação (PAULENZ et al., 2004).

## **7. Análise de sêmen assistida por computador (CASA)**

A motilidade espermática é uma das mais importantes características para avaliação do potencial de fertilidade do espermatozoide ejaculado. O sêmen pode ser analisado pelo método visual (subjetivo) ou computadorizado. Na década de 80, a análise

computadorizada foi introduzida, com a vantagem de ser capaz de determinar a velocidade do espermatozóide e detalhes das características do movimento, não visualizados na avaliação subjetiva. Mas somente, recentemente se definiu o papel da Análise de Sêmen Assistida por Computador (CASA) no laboratório de andrologia clínica e laboratórios de pesquisas, tornando mais precisa a correlação entre a avaliação *in vitro* e a fertilidade *in vivo* (LIU et al., 1991; SIDHU et al., 1998; LARSEN et al., 2000; MORTIMER, 2000).

O CASA é um sistema automatizado para visualizar e digitalizar imagens sucessivas do espermatozóide, processando e analisando a informação com acurácia e precisão do movimento individual da célula espermática e valores médios de suas populações (AMANN e KATZ, 2004). É utilizado na avaliação do sêmen de várias espécies de animais.

Garcia-Herreros et al. (2007) determinaram a morfometria da cabeça e peça intermediária do espermatozóide suíno após o processo de congelamento e descongelamento, verificando os efeitos individuais da criopreservação. Hallap et al. (2004) avaliaram a motilidade espermática e integridade da membrana do sêmen congelado e descongelado de bovinos, parâmetros essenciais para fertilização. Yániz et al. (2008) utilizaram o sistema CASA para comparar a motilidade e integridade da membrana plasmática do espermatozóide no sêmen de ovinos, resfriado à 15°C nos diluidores Citrato, Leite e TRIS, constatando que este método é mais eficiente do que convencional. Enquanto, Suttiyotin et al. (1995) validaram o CASA, comprovando que existe uma correlação positiva entre a distância da penetração espermática e a percentagem de motilidade progressiva. Tardif et al. (1997) verificaram incremento na velocidade média da trajetória do espermatozóide (VAP) e deslocamento lateral da cabeça espermática (ALH) após resfriamento do sêmen de bovinos. O método CASA identificou corretamente os espermatozóides móveis, não móveis e as partículas estáticas da amostra de sêmen (MORTIMER, 2000; VERSTEGEN et al., 2002).

Os parâmetros espermáticos calculados no software são:

VCL (velocidade curvilínea): é a média da distância por unidade de tempo entre posições sucessivas do espermatozóide em micrômetro por segundo.



VAP (velocidade média da trajetória) é a média da velocidade do percurso do espermatozóide sem obstáculo em micrômetro por segundo.

VSL (velocidade linear) a velocidade em linha reta do primeiro ao último ponto da trajetória do espermatozóide, em micrômetros por segundo.

ALH (amplitude do deslocamento lateral da cabeça) em micrômetros. Deslocamento médio da cabeça do espermatozóide em sua trajetória real em relação à trajetória média e linear.

BCF-Hz (Frequência de batimento flagelar cruzado): é o número de vezes que a cabeça do espermatozóide cruza a direção do movimento.

LIN: linearidade é a relação percentual VSL/VCL.

STR: retilinearidade é a relação percentual VSL/VAP.

Vários são os fatores que podem afetar a qualidade da avaliação do movimento espermático. A análise do sêmen em uma temperatura inferior a temperatura corporal; a manipulação, limpeza e remontagem da câmara no aparelho; a natureza e composição da célula espermática de diferentes espécies; a concentração espermática que na avaliação, deve ser entre 20 a 50 X 10<sup>6</sup> milhões de espermatozóides; o tipo de diluidor que pode conter partículas, interferindo na distinção entre espermatozóides imóveis (SIDHU et al., 1998; VERNSTEGEN et al, 2002). Na avaliação do sêmen pelo método CASA, se for verificado partículas comuns em diluidores com gema de ovo; que são similares ao tamanho dos espermatozóides, é necessário desenvolver procedimentos para excluir as imagens destes objetos, que interferem nos resultados da avaliação (TARDIF et al., 1997; VERNSTEGEN et al, 2002).

A análise do sêmen computadorizada favorece a avaliação individual de diferentes características como motilidade, velocidade e morfologia do espermatozóide, com alto nível de precisão e confiabilidade. As desvantagens desta técnica estão relacionadas ao alto custo do equipamento, controle de qualidade, validação, padronização, bem como, exige treinamento para manipulação do aparelho com eficiência (VERNSTEGEN et al, 2002; KUSTER, 2005). O método CASA é superior a outros métodos de avaliação das características espermáticas, no entanto, requer treinamento de técnicos e padronização dos

parâmetros do sistema (KRAUSE e VIETHEN, 1999). É importante conhecer os parâmetros biológicos do aparelho, no contexto de predição do potencial de fertilidade do macho (SIDHU et al., 1998; LARSEN et al., 2000). Além disso, permite a análise de aspectos adicionais da forma em que o espermatozóide se desloca que poderá indicar o seu status de ativação ou sua capacidade de atingir e penetrar em um óvulo (COLENBRANDER et al., 2005).

## **8. Técnicas de inseminação artificial**

A inseminação artificial é uma biotécnica da reprodução que propicia a maior amplitude de resultados nos programas de melhoramento animal. A adequada seleção dos atributos produtivos e reprodutivos de machos e de fêmeas é a base essencial, para a maximização do potencial dessa técnica como ferramenta de melhoramento genético animal (BICUDO et al., 2002). Na espécie ovina a inseminação artificial, que em curto prazo, representa uma enorme possibilidade de incrementar o melhoramento genético, estava restrita a utilização de sêmen fresco ou resfriado, limitando a difusão desta tecnologia. Esta biotecnica obteve um grande impulso, após o desenvolvimento da aplicação intra uterina de sêmen por laparoscopia, permitindo a utilização do sêmen congelado (KILLEEN e CAFFERY, 1982; LUZ et al., 2000).

A inseminação artificial exige requisitos mínimos de manejo reprodutivo. A escolha da modalidade de inseminação depende fundamentalmente da sua adequação, ao nível tecnológico do rebanho (BICUDO et al., 2003). A inseminação artificial, em ovinos, pode ser realizada por meio das técnicas cervical e laparoscópica. Trabalhos utilizando as duas técnicas apresentam variados índices de fertilidade, os quais sofrem influência de diversos fatores, dentre eles, o local de deposição do sêmen, a dose inseminante, o tipo de sincronização, o tempo da inseminação, o processamento do sêmen e as características peculiares às fêmeas (SALAMOM e MAXWELL, 2000; MILCZEWSKI et al., 2000).

Uma das limitações da Inseminação Artificial em ovinos com sêmen congelado é devido a baixa fertilidade com o uso da técnica cervical (YOSHIDA, 2000). Diversas são as causas desta baixa fertilidade, espermatozóide danificado durante a criopreservação, transporte inadequado, redução da habilidade de fecundação no genital feminino, mudanças na membrana espermática afetando a capacitação e mortalidade embrionária (GUSTAFSSON, 1978; MAXWELL e WATSON, 1996; SALAMON e MAXWELL, 2000). Pesquisas revelam que falha no transporte espermático é a principal causa da baixa taxa de concepção dessa técnica (GUSTAFSSON, 1978). A incapacidade do espermatozóide para ultrapassar a cérvix ovina limita a inseminação artificial cervical com sêmen congelado (EVANS e MAXWELL, 1987; NAQVI et al., 2001; KAABI et al., 2006).

A cérvix ovina é tubular, longa, fibrosa, composta predominantemente por tecido conectivo com uma camada externa serosa e um epitélio luminal convoluto e tortuoso, devido a presença de 3 a 7 anéis de tecido conjuntivo de 4 a 7 cm de comprimento, com pequena abertura e dispostos em diferentes planos e posições, dificultando a inseminação artificial (NAQVI et al., 2001; KERSHAW et al., 2005; NAQVI et al., 2005;). Existem diferenças entre fêmeas ovinas com relação ao tamanho e as distâncias entre os anéis cervicais, esta variação é dependente do rebanho e da idade do animal. As ovelhas da raça Ideal e da raça Corriedale apresentam comprimento cervical de 5,9 cm e 5,7cm respectivamente, enquanto que as ovelhas deslanadas, não se tem completo conhecimento acerca dos aspectos anatômicos do conduto cervical (PINHEIRO et al., 2001; SOUZA et al., 1994). Segundo classificação de Kershaw et al. (2005), a cérvix com formato de roseta é mais comum em ovelhas adultas e nas novilhas, predomina o formato de papila, confirmando que tem papel significativo na transposição cervical na Inseminação Artificial (NAQVI et al., 2001; NAQVI et al., 2005; KAABI et al., 2006).

A estrutura e complexidade da cérvix ovina limitam a detutuição do sêmen, mais profundamente, nos anéis cervicais. Cérvix com lúmen pouco convoluto é mais fácil a penetração da pipeta de inseminação artificial convencional. Algumas alternativas, como aplicação de drogas dilatadoras da cérvix, tração cervical e catéter de inseminação trans-cervical tem sido utilizadas para superar a barreira da cérvix em ovelhas e assim, aumentar

a taxa de fertilidade após inseminação artificial com sêmen criopreservado (BUCKRELL et al., 1994; BARBAS et al., 2001; BARBAS et al., 2003; BICUDO et al., 2003; WULSTER-RADCLIFFE et al., 2004; KERSHAW et al., 2005; KAABI et al., 2006).

Diversos são os fatores que influenciam na penetração da cérvix. Dentre eles, ordem de parto observou-se que fêmeas múltíparas apresentam uma maior abertura cervical, enquanto que, fêmeas nulíparas apresentam uma maior resistência a passagem da pipeta, a inseminação de fêmeas no estro natural é superior a das fêmeas em estro sincronizado e a experiência do inseminador, também contribui, para um maior sucesso na inseminação cervical (WINDSOR, 1994; BUCKRELL et al., 1994; MILCZEWSKI et al., 2000).

Wulster-Radcliffe et al. (2004) constataram que não houve alteração do transporte espermático no genital feminino e na taxa de parição das ovelhas, com a deposição de grande quantidade de espermatozoides no útero por via cervical, por meio de um cateter de inseminação artificial, tendo sido verificado o oposto, com uma pequena quantidade de espermatozoides. Contudo, este método pode ser um fator limitante para uma elevada taxa de parição das ovelhas. Souza et al. (1994) compararam a inseminação artificial com sêmen congelado e fresco utilizando o aplicador Cassou (cateter de penetração superficial e profunda na cérvix) e observaram um índice de não retorno ao estro de 55,3% e 64,2% respectivamente, concluindo que a aplicação do sêmen congelado por via cervical com este instrumento apresenta resultados semelhantes aos obtidos com sêmen fresco nas raças Ile-de-France e Suffolk. Enquanto, Buckrell et al. (1994) obtiveram taxa de parição de 60% quando utilizaram o mesmo procedimento, confirmando a viabilidade e o baixo custo desta técnica.

Outra possibilidade para a baixa taxa de prenhez após inseminação cervical com sêmen conservado é a utilização do tratamento com progestágeno mais eCG (Gonadotrofina Coriônica Equina) para indução do estro, que promove um efeito nocivo no transporte, sobrevivência e capacidade de fertilização dos espermatozoides quando comparados com ovelhas inseminadas em estro natural (LUNSTRA e CHRISTENSON, 1981; SALAMON e MAXWELL, 2000). Para elevar a taxa de fertilidade após inseminação artificial por via cervical se faz necessário, a associação de um bom

protocolo de congelamento de sêmen ovino, com uma ótima concentração espermática, por dose inseminante (EVANS e MAXWELL, 1987).

Geralmente, o sêmen, congelado e resfriado, apresentam reduzida fertilidade, após a inseminação cervical quando comparados ao sêmen fresco ou à inseminação por laparoscopia (MAXWELL e WATSON, 1996; GUSTAFSSON, 1978). A deposição do sêmen congelado diretamente no útero, por via laparoscópica eleva os índices de fertilidade. A técnica de inseminação por laparoscopia, no entanto, exige equipamentos caros e mão de obra especializada, sendo economicamente inviável, em rebanhos comerciais de ovinos (MILCZEWSKI et al., 2000; NAQVI et al., 2001).

Os espermatozoides criopreservados apresentam modificações nas membranas, semelhantes aquelas que ocorrem durante a capacitação e a reação do acrossoma, por isso requer menos tempo de capacitação no trato genital feminino e pode fertilizar oócitos prontamente, se depositados próximos ao local de ovulação, como ocorre na fertilização *in vitro*, tubárica ou intra-uterina. (MAXWELL e WATSON, 1996). Alta taxa de fertilização foi obtida com a deposição do sêmen descongelado no útero ou oviduto, demonstrando presumivelmente que o espermatozoide se mantém intacto biologicamente, com sua capacidade de fecundação após congelamento e descongelamento (SALAMON e MAXWELL, 2000).

Foi observado que o tempo ideal para inseminação via laparoscópica com sincronização do estro, varia entre 44 a 64 horas após a remoção das esponjas. Estas variações são atribuídas à precisão do tempo da ovulação devido aos diferentes regimes de superovulação. Observa-se uma tendência a uma taxa de prenhez inferior quando a manifestação do estro ocorreu mais tardiamente, em relação ao término do tratamento hormonal. Isto se deve provavelmente a ocorrência de um período a longo prazo entre a inseminação artificial e a ovulação (SALAMON e MAXWELL, 2000; REBASSA et al., 2007).

As diferenças de fertilidade da inseminação artificial com sêmen congelado, por via laparoscópica, foram observadas em diversas ovelhas e foi correlacionado com o transporte espermático no genital feminino, que pode ser resultante do número de espermatozoide por

dose inseminante, próximo ao local de fertilização. A existência de amostra de sêmen com concentração e motilidade extremamente baixa, resultou em inseminações com doses abaixo de seis milhões de espermatozóides (EPPELSTON e MAXWELL, 1994). Para se obter uma satisfatória fertilidade, após inseminação intra uterina, com sêmen congelado, em estro sincronizado é necessário no mínimo cerca de 10 milhões de espermatozóides móveis (SALAMON e MAXWELL, 1995b; SALAMON e MAXWELL, 2000). As pipetas de inseminação por laparoscopia para pequenos ruminantes foram desenvolvidas com 0,25 mL para uma menor concentração espermática, que é necessária neste tipo de inseminação, diferente da via cervical que pode ser de 0,50 mL (HOLT, 2000).

Diversos resultados de fertilidade foram obtidos com uso das técnicas de inseminação artificial em ovinos com sêmen congelado. Souza et al. (1994) encontraram taxa de prenhez de 44,19% após inseminação artificial com tração da cérvix, 28,9% por inseminação via cervical e 45% por via laparoscópica utilizando sêmen congelado. Da mesma forma, Windsor et al. (1994) compararam o método de inseminação, em ovinos, por laparoscopia com a inseminação por via cervical e a inseminação transcervical pelo sistema Australiano Guelph encontraram taxa de prenhez de 48%, 9% e 32% respectivamente.

Naqvi et al. (1998) obtiveram uma taxa de parição de 22,7% em ovelhas inseminadas por via cervical com sêmen congelado. Enquanto, Correia Neto et al. (2006) conseguiram uma taxa de fertilidade ao parto de 43,16% após inseminação por laparoscopia com sêmen congelado. Rebassa et al., (2007) verificaram a mesma taxa de gestação de 40% após inseminação por laparoscopia e por via cervical com fixação e tração da cérvix, em ovelhas pluríparas da raça Corriedale, após sincronização do estro e inseminação em tempo fixo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOAGLA, E.M., TERADA, T. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v.62, p.1160-1172. 2004.
- AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R. H. In vitro evaluation of sperm quality: opinion. **Journal of Andrology**, v. 14, p. 397-406, 1993
- AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Reflection on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v.25, n3. p.317-324, 2004.
- ANDRABI, S.M.H.; ANSARI, M.S. ; ULLAH, N. ; et al. Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 427-433, 2008
- ARAÚJO, A. A. **Mise au point d'un dilueur de conservation en milieu liquide pour la semence ovine en vue de l'insémination artificielle**, 2000. 81p. Tese (Doutorado em Ciências da Vida) - Université François Rabelais de Tours, Tours.
- ASSUMPÇÃO, T. I.; Torres Júnior, R.A.A.; SOUSA, M.V.; RICART, C.A.O. Correlation between fertility and levels of protein, sugar and free amino acids in seminal plasma of Nelore bulls. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 1, p. 55 – 61, 2005.
- ABDEL-RAHMAN, H. A.; EL-BELEY, M. S.; AL-QARAWI,A.A.; EL-MOUGY, S. A. The relationship between semen quality and mineral composition of semen in various ram breeds. **Small Ruminant Research**, v.38, p.45-49, 2000.
- ANEL, L.; DE PAZ, P.; ÁLVAREZ, M.; CHAMORRO,C.A.; BOIXO, J. C.; MANSO, A.; GONZÁLEZ, M. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram sêmen. **Theriogenology**, v.60, p.1293-1308, 2003.

- AZEVEDO, H.C. **Integridade e funcionalidade dos espermatozoides ovinos submetidos à criopreservação após a incorporação de colesterol, desmosterol, ácido oléico-linoléico e  $\alpha$ -lactoalbumina.** Botucatu, 2006. 195p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- BAG, S.; JOSHI, A.; MATHUR, A. K.; RAWAT, P.S.; MITTAL, J. P. Effect of thawing temperature on motion characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa. **Indian Journal of Animal Science**, V.69, n.1, p.16-18, 1999.
- BAILEY, J. L.; BUHR, M. M. Cryopreservation alters the  $Ca^{2+}$  flux of bovine spermatozoa. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 74, p.45-51, 1993.
- BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effect of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v. 22, p. 1061-1069, 2001
- BARBAS, J.P.; et al. Influência do diluidor, época e exploração, nos resultados da I.A. em ovelhas de raça Saloia. Congresso de Ciências Veterinárias, 2002, **Anais: Resumos.**
- BARBAS, J.P.; MASCARENHAS, R.D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **International Consensus Meeting**, New Horizons in cell and tissue banking. Vale do Santarém, Portugal, maio, 2007.
- BARBAS, J.P.; et al. Efeito da aplicação vaginal de agentes dilatadores do cérvix (misoprostol e sulfato de terbutalina) sobre os resultados da IA em raças ovinas locais. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.98, p. 185-188, 2003.
- BARBAS, J.P.; SOUSA, J.; FERREIRA, G.; BAPTISTA, C. E HORTA, A. Variação anual das características seminais de carneiros Merino Regional e Serra da Estrela em sémen fresco. **Revista Portuguesa de Zootecnia**, v.8, p.312-323, 2001.
- BARIL, G.; LEBOEUF, B. E SAUMANDE, J. Synchronization of estrus in goats: The relationship between time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. **Theriogenology**, v.40, p.621-628, 1993.



BATHGATE, R.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. **Reproduction Domestic Animal**, v. 41, p. 68-73, 2006.

BERGERON, A.; BRINDLE, Y.; BLONDIN, P.; MANJUNATH, P. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. **Biology of Reproduction**, v.77, p.120-126, 2007.

BIALY, G.; et al. Influence of lipoprotein on the freezing of bovine spermatozoa. **Journal of Dairy Science**, v. 40, p. 1189-1192, 1957.

BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H.C.; MAIA, S. M.; GREEN, R. E.; RODELLO, L.; MEIRA, C. Improvement on ram sêmen cryopreservation applied to artificial insemination programs and embryo technology. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35 (Supl. 3), p.793-798, 2007.

BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H. C.; SILVA MAIA, M. S.; SOUSA,D.B.; RODELLO, L. Aspectos peculiares da inseminação artificial em ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, (supl. 1), p. 127-130, 2005.

BICUDO, S.D.; SOUZA, D.B.; TAKADA, L. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado e biotécnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. In: *Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, 15, 2003. Porto Seguro – BA. **Anais...** Belo Horizonte - MG: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2003.

BICUDO, S. D., PAGANINI FILHO, P., SOUZA, M. I. L., SOUSA, D. B. O. Taxa de concepção no estro induzido com CIDR /eCG e no estro natural pós-sincronização em programa de inseminação artificial de ovelhas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p. 171-4, 2002.

BLACKSHAW, A. W.; SALISBURY, G. W. Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa. II. Cold-shock and its prevention. **Journal of Dairy Science**, v.40, n.9, p. 1099-1106, 1957.

BOGART, R.; MAYER, D. T. The effects of egg yolk on the various physical and chemical factors detrimental to spermatozoan viability. **Journal of Dairy Science**, v.9, p.143-152, 1950.

BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J.P. ; MARQUANT-LEGUIENNE, B. ; GUÉRIN,B. ; CAMUS, A. ; LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents.**Theriogenology**, n.50, p.699-706, 1998.

BYRNE, G.P.; LONERGAN, P.; WADE, M.; DUFFY,P. DONOVAN, A.; HANRAHAN,J.P.; BOLAND, M.P. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.265-275, 2000.

BUCAK, M.N.; et al. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. **Theriogenology**, v.67, p.1060-1067, 2007.

BUCKRELL, B.C.; BUSCHBECK, C.; GARTLEY, C. J.; et al. Further development of a transcervical technique for artificial insemination in sheep using previously frozen sêmen. **Theriogenology**, v. 42, p. 601-611, 1994.

CÂMARA, D.R.; SIMPLÍCIO,K.M.M.G.; GUERRA,M.M.P.; , E.W.P.; PADILHA,R.T.; BELLO,D.R.S.M. Influência da variação individual na congelabilidade do sêmenfertilidade in vivo de ovinos deslanados.**Ciência Veterinária Tropical**, v.7, n. 2,3, p.82-89, 2004.

CÂMARA, D. R.; SIMPLÍCIO, K. M. M. G.; GUERRA, M. M. P.; et al. Influência da variação na congelabilidade do sêmen e fertilidade *in vivo* de ovinos deslanados. **Ciência Veterinária Tropical**, v.7, p.82-89, 2003.

CBRA, **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2ª Ed. Belo Horizonte/ MG, p.6-49, 1998.

COLENBRANDER, B.; STOUT,T.A.E.; GADELHA,B.M. Semen quality assessment: A critical view. Reproductive biotechnology for improved animal breeding in southeast asia, p.33-36, 2005. **Proceedings. International Asia Link Symposium**.

CORREIA NETO, J.; COSTA, A. N.; REIS, J. C. Parâmetros reprodutivos de ovelhas Santa Inês e suas cruzas com machos das raças Dorper e Somalis Brasileira, obtidas por inseminação artificial laparoscópica com sêmen congelado. **Ciência Veterinária Tropical**, V.9, n2/3, p.63-73, 2006.

COLAS, G. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. **Journal Reproduction Fertility**, v. 42, p. 85-277, 1975

CURRY, M.R.; WATSON, P.F. Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. **Cryobiology**, v.31, p. 39-46, 1994.

CURRY, M. R.; MILLAR, J.D.; WATSON, P.F. Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical observações. **Biology of Reproduction**, v.51, p.1014-1021, 1994.

DAVIS, I. S.; BRATTON, R. W.; FOOTE, R. H. Livability bovine spermatozoa at 5 graus in Tris-buffered and Citrato-buffered yolk glycerol extenders, **Journal Dairy Science**, v.46, p.57-60, 1963.

DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I. G. Influence of the cholesterol of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. **Cryobiology**, v.14, p.466-470, 1977.

D' ALESSANDRO, A.G.; MARTEMUCCI, G.; COLONNA, M.A.; BELLITTI, A. Post-thaw survival of ram spermatozoa and fertility after insemination as affected by preezing sperm concentration and extender composition. **Theriogenology**, v.55, p. 1159-1170, 2001.

D' ALESSANDRO, A.G. ; MARTEMUCCI, G. Post-thaw survival and acrosome integrity of spermatozoa of Leccese rams frozen in different seasons with a milk-egg yolk extender. **Ital. Journal Animal Science**, v.4, p.139-148, 2005.

EL-ALAMY, M. e FOOTE, R. H. Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 65, p. 245-254, 2001.

EPPLESTON, J.; SALAMON, S.; MOORE, N.W.; EVANS, G. The depth of cervical insemination and site of intrauterine insemination and their relationship to the fertility of frozen-thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 36, p. 211-225, 1994.

EVANS, G.; MAXWELL, W. **Salamon's artificial insemination of sheep and goats**. Butterworth, Sydney, p.194. 1987.

FISER, P.S.; AINSWORTH, L.; LANGFORD, G.A. Effect of osmolality of skim-milk diluents and thawing rate on cryosurvival of ram spermatozoa. **Cryobiology**, v. 18, p. 399-403, 1981.

FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W. The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in Straws. **Cryobiology**, v. 21, p. 542-551, 1986.

FOOTE, R. H. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. **Journal Animal Science**, v.80, p.1-10, 2002.

FOOTE, R.H. Fertility of bull semen at high extender rate in Tris-Buffered extenders. **Journal of Dairy Science**, v.53, n.10, p. 1475-1477, 1970a.

FOOTE, R.H. Influence of extender rate, and glycerolating Technique on fertility of frozen bull semen. **Journal of Dairy Science**, v.53, n.10, p.1478-1482, 1970b.

FOULKES, J. A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v.49, p.277-284, 1977.

FOULKES, J. A.; STEWART, D. L. Fertility of dairy cattle after artificial insemination with semen frozen in a lipoprotein diluent. **Journal Reproduction Fertility**, v.51, p.175-177, 1977.

GARCIA-HERREROS, M.; BÁRON, F. J.; APARICIO, I. M.; SANTOS, A. J.; GARCIA-MÁRIN, L.J.; GIL, M. C. Morphometric changes in boar spermatozoa induced by cryopreservation. **International Journal of Andrology**, p.1-9, 2007.

- GOOD, N.E.; WINGER, G.D.; WINTER, W.; CONNOLLY, T.N.; IZAWA, S.; SINGH, R. M.M. Hydrogen ion buffers for biological research. **Biochemistry**, v.5, n.2, p.467-477, 1966.
- GÜNDOĞAN, M. Some reproductive parameters and seminal plasma constituents in relations to season in akkaraman and awassi rams. **Turk Journal Veterinary Animal Science**. v. 30, p. 95-100, 2006.
- GUSTAFSON, B. K. Aspects of fertility with frozen thawed ram semen. **Criobiology**, v.15, p.358-361, 1978.
- GUTHRIE H. D.; WELCH, G. R. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. **Theriogenology**, v.63, p.396-410, 2005.
- HAFEZ, E. S. E. Anatomia da Reprodução Masculina. In. HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**, 7ª Ed. Editora Manole LTDA, Barueri-SP, p.3-12, 2004.
- HALLAP, T.; et al. Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? **Theriogenology**. v. 62, p. 702-713, 2004.
- HEALEY, P. Effect of freezing on the ultrastructure of the spermatozoon of some domestic animal. **Journal Reproduction Fertility**, v. 18, p. 21-27, 1969.
- HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance species and individual differences. **Theriogenology**, v.53, p.47-58, 2000a.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage semen. **Animal Reproduction Science** , v.62; p.3-22, 2000b.
- HOLT, W. V.; NORTH, R. D. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.51, p.414-424, 1994.
- HUMES, R. e WEBB, G. Use of chicken or chukar egg yolk with two cryoprotectants for preservation of stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 62-63, 2006.

- JONES, R.; MANN, T. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. **Journal Reproduction Fertility**, v. 50, p.261-268, 1977.
- JONES,R.C. The plasma membrane of ram, boar and bull spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v.33, p.179-183, 1973.
- KAABI, M.; et al. Influence of breed and age on morphometry and depth of insemination catheter penetration in the ewe cervix: A postmortem study. **Theriogenology**, v. 66, p. 1876-1883, 2006.
- KAMPSSHIMIDT, R. F.; MAYER, D. T.; HERMAN, H. A. Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. **Journal Dairy Science**, v. 36, p. 733-742, 1953.
- KATILA, T. Sperm-uterine interactions: a review. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 267-272, 2001.
- KERSHAW, C. M.; KHALID, M.; McGOWAN, M.R.; et al. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. **Theriogenology**, v. 64, p. 1225-1235, 2005.
- KILLEEN, I.D.; CAFFERY, G.J. Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. **Australian Veterinary Journal**, v. 59, 1982.
- KRAUSE, W.; VIETHEN. G. Quality assessment computer-assisted semen analysis (CASA), in the andrology laboratory. **Andrologia**, v. 31, p. 125-129, 1999.
- KUMAR,S.; MILLAR, J.D.; WATSON,P.F. The effect of cooling on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. **Cryobiology**, v.46, p.246-253, 2003.
- KUSTER, C. Sperm concentration determination between hemacytometric and CASA systems: Why they can be different. **Theriogenology**, v. 64, p. 614-617, 2005.
- LARSEN,L.; SCHEIKE, T.; JENSEN, T. K.; BONDE, J. P.; ERNEST, E.; HJOLLUND, N. H.; ZHOU, Y.; SKAKKEBAEK, N. E.; GIENERCMAN, A. The Danish first pregnancy planner study team computer-assisted semen analysis parameters as predictors

fertility of men from the general population. **Human Reproduction**, v.15, p.1562-1567, 2000.

LIU, D. Y.; CLARKE, G. N.; BAKER, H. W. G. Relationship between sperm motility assessed with the hamilton-thorn motility analyzer rates *in vitro*. **Journal of Andrology**, v.12, n.4, p.231-238, 1991.

LUNSTRA, D.D.; CHRISTENSON, R.K. Fertilization and embryonic survival in synchronized with exogenous hormones during the anestrous and estrous seasons. **Journal of Animal Science**, v. 53, p. 458-466, 1981.

LUZ, S. L. N.; NEVES, J. P.; GONÇALVES, P. B. D. Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica. **Brazil Journal Veterinary Research Animal Science**, v.37, n.2, p., 2000.

MARCO-JIMÉNEZ, F.; PUCHADES, S.; MOCÉ, E.; VIUDES-DE- CARTRO, M.P.; VICENTE, J.S.; RODRIGUEZ, M. Use of powdered egg yolk vs fresh egg yolk for the cryopreservation of ovine semen. **Reproduction Domestic Animal**, v.39, p.438-441, 2004.

MATSUOKA, T. et al. Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, p. 675-680, 2006.

MAXWELL, W. M. C.; LANDERS, A. J.; EVANS, G. Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets in straws and minitubes. **Theriogenology**, v. 43, p. 1201-1210, 1995.

MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: The influence of seminal plasma. **Theriogenology**, v.52, p.1353-1362, 1999.

MAXWELL, W. M. C., SALAMON, S. Liquid storage of ram semen: a review. **Reproduction Fertility Development**, v. 5, p. 613-38, 1993.

MAXWELL, W. M. C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal reproduction Science**, v.42, p.55-65, 1996.

- MANN, T. Studies on the metabolism of semen: 3. fructose as a normal constituent of seminal plasma site of formation and function of fructose in semen. **Biochemistry Journal**, v. 40, n. 4, p. 481–491, 1946.
- MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, p.327-344, 2002.
- MERYMAN, H.T. Cryoprotective agents. **Cryobiology**, v. 8, p. 173-183, 1971.
- MAYER, D. T.; LASLEY, J.F. The factor in egg yolk affecting the resistance storage potentialities, and fertilizing capacity of mammalian spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v.4, p.261-269, 1945.
- MIES FILHO, A. A tecnologia de sêmen I. **Inseminação Artificial**, v.2, p.404-468, 1987.
- MILCZEWSKI, V.; KOZICKI, L. E.; LUZ, S. L. N.; NEVES, J. P. Inseminação artificial intrauterina e cervical em ovelhas utilizando sêmen refrigerado. **Archives of Veterinary Science**, v.5, p.35-39, 2000.
- MONTAGNER, M. M.; GONÇALVES, P. B. D.; NEVES, J. P.; COSTA, L. F. S.; BORTOLOTO, E. B.; FARIAS, A. M.; STRANIERI, P. Heses na produção de embriões bovinos *in vitro*. **Ciência Rural**, v.30, n.3, p.469-474, 2000.
- MOORE, B. H.; MAYER, D. T.; MACJENZIE, F. F. Factors influencing motility and metabolism in ram semen. **Journal Animal Science**, v.14, p.210-215, 1940.
- MORRIER, A.; CASTONGUARY, F.; BAILEY, J.L. Glycerol addition and conservation of fresh and cryopreserved ram spermatozoa. **Canadian Journal of Animal Science**, v.83, p.347-356, 2002.
- MORTIMER, S. T. CASA-Practical aspects. **Journal of Andrology**, p.515-524, 2000.
- NAHAS, G. In vitro and in vivo effects of amine buffers. Introductory remarks. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 92, n. 2, p.337-340, 1961.
- NAQVI, S. M. K.; JOSHI, A.; BAG, S.; PAREEK, S. R.; MITTAL, J. P. Cervical penetration and transcervical AI of tropical sheep (Malpura) at natural oestrus using frozen-thawed semen. **Small Ruminant Research**, v.29, p. 329-333, 1998.



NAQVI, S. M. K.; JOSHI, A.; DAS, G. K.; MITTAL, J. P. Development and application of ovine reproductive technologies: an Indian experience. **Small Ruminant Research**, v.39, p.199-208, 2001.

NAQVI, S.M.K.; et al. Evaluation of gross anatomical features of cervix of tropical sheep using cervical silicone moulds. **Animal Reproduction Science**, v. 85, p. 337-344, 2005

NEVES, J. P.; IRALA, P. N. D.; GONZALEZ, C. I. M.; DORNELLES, W. M. Utilização do diluente Tris na inseminação artificial em ovinos. **Revista Centro de Ciências Rurais**, v.12, n.(2-3), p.181-187, 1982.

O'SHEA, T.; WALES, R. G. Fixation of carbon dioxide by ram spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, Brief Communication, v.14, p.333-334, 1967.

PACE, M. M. e GRAHAM, E. F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. **Journal Animal Science**, v. 39, p. 1144-1149, 1974.

PADILLA, A. N.; FOOTE, R. H. Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v.69, n.8, p.3308-3313, 1991.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p.209-222, 1992.

PARKS, J.E.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v.29, p.255-266, 1992.

PAULENZ, H.; SÖDERQUIST, L.; PÉREZ-PÉ, R.; BERG, K. A. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 57, p. 823-836, 2002.

PAULENZ, H.; ADNOY, T.; SÖDERQUIST, L. Comparison of fertility results after vaginal insemination using different thawing procedures and packages for frozen ram semen. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.49, n.26, p.1-7, 2007.

PAULENZ, H.; SÖDERQUIST, L.; ADNOY, T.; NORDSTOGA, A.; GULBRANDSEN, B.; BERG, K. A. Fertility results after different thawing procedures for ram semen frozen in minitubes and mini straws. **Theriogenology**, v.61, p.1719-1727, 2004.

PINHEIRO, J. H. T.; DIÓGENES, B. O. P.; MONTEIRO, A. W. U.; NUNES, J. F.; CAMPOS, A. N. C. Fertilidade de fêmeas ovinas deslanadas inseminadas artificialmente quanto ao local de deposição do sêmen no aparelho reprodutor. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.25, n.3, p.336-337, 2001.

PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.63, p.215-225, 2006.

REBASSA, V. R.; TABELÃO, V. C.; PFEIFER, L. F. M.; SCHNEIDER, A.; ZIGUER, E. A.; SCHOSSLER, E.; SEVERO, N. C.; DEL PINO, F. A. B.; CORRÊA, M. N. Efeito das técnicas transcervical e laparoscópica sobre a taxa de prenhez de ovelhas inseminadas em tempo-fixo. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, n.1, p.127-133, 2007.

ROBERTSON, L.; WATSON, P.F. Calcium transport in diluted cooled ram sêmen. **Journal Reproduction Fertility**, v.77, p.177-185, 1996.

RONCOLHEITA, M.; FRACESCHINI, P. H.; LIMA, V. F.M.H.; RODRIGUES, H.; OLIVEIRA, M.A.; SILVA, C. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça gir. **Brazil Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 36, n. 2, p.82-86, 1999.

RONCOLHEITA, M.; et al. Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes, **Animal Reproduction science**, v.91, p. 77-87, 2005.

RODELLO, L.; AZEVEDO, H.C.; BICUDO, S.D.; MAIA, M.S.; SOUSA, D.B.; SICHERLE, C.C. Comparação entre sistemas automatizados e geladeira/vapor de nitrogênio líquido na criopreservação de sêmen ovino. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, v.16, 2005, Goiânia, GO. **Anais: Resumos**.

RITAR, A.J.; BALL, P.D. The effect of freeze-thawing of goat and sheep semen at a high density of spermatozoa on cell viability and fertility after insemination. **Animal Reproduction Science**, v.31, p.249-262, 1993.

SALAMOM, S.;MAXWELL,W.M. Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v.37, p.185-249, 1995a.

SALAMOM, S.;MAXWELL,W.M. Frozen storage of ram semen II Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v.38, p.1-36, 1995b.

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

SÁNCHEZ-PARTIDA, L. G.; WINDSOR, D.; EPPLESTON, J.; SETCHELL, B. P.; MAXWELL, W. M. C. Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. **Journal of Andrology**, v.20, n.2, p. 280-288, 1999.

SANTIAGO-MORENO, J.; COLOMA, M.A.; TOLEDANO-DÍAZ, A.;GOMEZ-BRUNET, A.; PULIDO-PASTOR, A. ZAMORA-SORIA, a.; CARRIZOSA, J.A.; URRUTIA, B. A comparison of the protective action of chicken and quail egg yolk in the cryopreservation of Spanish ibex epididymal spermatozoa. **Cryobiology**, v.57, p.25-29, 2008.

SIDHU, R. S.; SHARMA, R. K.; LEE, JC.; AGARWAL, A. Accuracy of computer-assisted semen analysis in prefreeze and post-thaw specimens with high and low sperm counts and motility. **Urology**, v.51, n.2, p.306-312, 1998.

SILVA, K.M.G.; GAMBOA, S.C.; RODRIGUES, A.S.; SANTOS, J. R.; GUERRA, M.M.P. Adição de piruvato de sódio e trolox ao diluidor utilizado para congelação de sêmen de garanhões férteis e subférteis. **Ciência Rural**, v.38, n.8, 2008.

SINGH, J. P.; BABCOCK, D. F.; LARDY, H. A. Increased calcium-ion influx is a component of capacitation of spermatozoa. **Biochemical Journal**, v.172, p.549-556, 1978.

SLAVIK, T. Effect of glycerol on the penetrating ability of fresh ram spermatozoa with zona-free hamster eggs. **Journal Reproduction Fertility**, v.79, p.99-103, 1987.

SÖDERQUIST, L.; MADRID-BURNY, N. RODRIGUEZ-MARTIZEN, H. Assesment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. **Theriogenology**, v.48, p.1115-1125, 1997.

SÖDERQUIST, L.; LUNDEHEIN, N.; NILSSON, B. Assessment of fertility after using different procedures to thaw ram spermatozoa frozen in mini straws. **Reproduction Domestic Animal**, v.34, p.61-66, 1999.

SOUZA, M. I. L.; LUZ, S. L. N.; GONCALVES, P. B. D.; NEVES, J. P. Inseminação transcervical com sêmen congelado em ovinos. **Ciência rural**, v.24, n.3, p.597-602, 1994.

SOYLU, M. K.; et al. Effects of various cryoprotective agents and extender osmolality on post-thawed ram semen Bull. **Veterinary Institute Pulawy**. v. 51, p. 241-246, 2007.

SU, L.; et al. A comparison of the protective action of added egg yolks from five avian species to the cryopreservation of Bull sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 212-219, 2008.

SUTTIYOTIN, P.; THWAITES, C. J.; SANCHEZ-PARTIDA, L. G.; SETCHELL, B. P. Evaluation of a modified sperm penetration test in ram semen. **Theriogenology**, v.44, p.29-40, 1995.

TAHA, T.A.; ABDEL-GAWAD, E.I.; AYOUB, M.A. Monthly variations in some reproductive parameters of Barki and Awassi rams throughout 1 year under subtropical conditions 2. Biochemical and enzymatic properties of seminal plasma. **Animal Reproduction Science**, v. 71, p. 325-332, 2000.

TARDIF, A.L.; FARREL, P. B.; TROWRN-TREND, V.; FOOTE, R. H. Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5 °C. **Journal Dairy Science**, v. 80, p. 1606-1612, 1997.

TRIMECHE, A.; ANTON, M.; RENARD, P.; GANDEMER, G.; TAINTURIER, D. Quail egg yolk: A novel cryoprotectant for the freeze preservation of poitou. **Cryobiology**, v.34, p.385-393,1997.

- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 59, p. 149-179, 2002.
- VIEIRA DE SA, F. O leite - Noções Gerais. In: **As Vacas Leiteiras**, 7ª ed. Colégio Técnico Agrícola , Lisboa, 1990.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p.481-492, 2000.
- WATSON, P.F.; MARTIN, I. C. A. A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v. 28, p.99-101, 1972.
- WHITE, I.G.Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a Review. **Reproduction Fertility Development**, v.5, p.639-658, 1993.
- WILLIAMS, A.C.; FORD, W.C. The role of glucose in supporting motility and capacitation in human. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 4; p. 680-695, 2001.
- WINDSOR, D.P.; SZÉLL, A. Z.; BUSCHBECK, C.; EDWARD, A. Y.; MILTON, J. T. B.; BUCKRELL, B. C. Transcervical artificial insemination of Australian merino ewes with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, n.42, p.147-157, 1994.
- WULSTER-RADCLIFFE, M. C.; WANG, S.; LEWIS, G. S. Transcervical artificial insemination in sheep: effects of a new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. **Theriogenology**, v.62, p.990-1002, 2004.
- YÁNIZ, J.L.; SANTOLARIA, P.; MARCO-AGUADO, M.A.; LÓPEZ-GUATIUS, F. Use of image analyses to assess the plasma membrane integrity of ram spermatozoa in different diluents. Disponível em: <http://www.cystometry.cz/articles/10188>. Acessado em: 13 de maio de 2008.
- YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.349-355, 2000.

ZAHN, F. S.; PAPA, F. O.; MELO, C. M. Blood serum, seminal plasma and sperm membrane protein profiles in stallions: Are they correlated to sêmen freezability? **Animal Reproduction Science**, v.94, p.64-66, 2006.

## **CAPÍTULO 2**

**Efeito do diluidor, da temperatura de congelação e da concentração  
espermática final sobre os parâmetros de motilidade do sêmen de ovinos  
Santa Inês.**

## RESUMO

O estudo teve como objetivo verificar a influência do tipo de diluidor, da temperatura de congelação e da concentração final dos espermatozóides sobre os parâmetros de motilidade do sêmen de ovinos Santa Inês. Foi coletado o sêmen de cinco carneiros, uma vez por semana, durante seis semanas, feito o pool e avaliado o volume, a motilidade, o vigor e a concentração. O pool de sêmen foi fracionado em nove alíquotas para adição dos diluidores leite desnatado, HEPES e TRIS em três concentrações finais ( $600 \times 10^6$ ,  $800 \times 10^6$ ,  $1000 \times 10^6$  espermatozóides por mL). As amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 mL e congeladas em três temperaturas ( $-79\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $-90\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $-120\text{ }^\circ\text{C}$ ) no equipamento TK 3000. Quando atingida a primeira temperatura, um grupo de palhetas foi transferido para o botijão criogênico, sendo adotado o mesmo procedimento para as demais temperaturas testadas. Após 30 dias, as palhetas foram descongeladas e o sêmen avaliado pelo método Computer Assisted Sêmen Analysis (CASA). Procedeu-se a ANOVA para testar o efeito do diluidor, temperatura de congelação e concentração espermática final sobre os parâmetros de motilidade. No diluidor leite, a motilidade progressiva e a percentagem de espermatozóides rápidos diferiram ( $P < 0,05$ ) para a temperatura de  $-79\text{ }^\circ\text{C}$  em relação às de  $-90\text{ }^\circ\text{C}$  e  $-120\text{ }^\circ\text{C}$ . No diluidor HEPES, a temperatura de  $-90\text{ }^\circ\text{C}$  foi inferior às demais temperaturas. No diluidor TRIS não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre as temperaturas de congelação, entretanto a motilidade foi ( $P < 0,05$ ) das demais diluidores em todas as temperaturas testadas. A concentração de  $600 \times 10^6$  spz/ mL para as variáveis percentagens de espermatozóides móveis, motilidade progressiva e velocidade rápida demonstrou-se superior ( $P < 0,05$ ) à de  $800 \times 10^6$  spz/ mL e  $1000 \times 10^6$  spz/ mL. Para a variável velocidade média da trajetória do espermatozóide rápido (VAPR), somente o diluidor leite desnatado na temperatura de  $-79\text{ }^\circ\text{C}$  apresentou-se superior ( $P < 0,05$ ) às temperaturas de  $-90\text{ }^\circ\text{C}$  e  $-120\text{ }^\circ\text{C}$ . Contudo, não foi observada divergência ( $P > 0,05$ ) entre as concentrações testadas nos demais diluidores. Portanto o diluidor TRIS, na temperatura de congelação de  $-79\text{ }^\circ\text{C}$  e concentração final de  $600 \times 10^6$  spz/ mL, mostrou-se ser o protocolo de congelação, em equipamento TK 3000, mais apropriado para sêmen de



carneiros Santa Inês, entretanto estudos utilizando a inseminação artificial precisam ser conduzidos para validar sua qualidade .

**Palavras-chaves:** carneiro, diluidor, temperatura de congelação, concentração espermática.

## ABSTRACT

The study aimed to verify the influence of extender type, freezing temperature and spermatozoa final concentration on semen motility parameters of Santa Ines rams. Semen was collected from five rams once a week, during six weeks, a pool was performed and volume, motility, vigor and concentration were evaluated. The pool of semen was split into nine aliquots for addition of skim milk, HEPES and TRIS, at three final concentrations ( $600 \times 10^6$ ,  $800 \times 10^6$  and  $1000 \times 10^6$  sperm per mL). The samples were packaged into 0.25 mL straws and frozen at three temperatures ( $-79^\circ\text{C}$ ,  $-90^\circ\text{C}$  and  $-120^\circ\text{C}$ ) in a TK 3000 equipment. When the first temperature was achieved, a group of straws was transferred to cryogenic cylinders, adopting the same procedure for the other temperatures. After 30 days, the straws were thawed and semen evaluated by Computer Assisted Semen Analysis (CASA). ANOVA was performed to test the effect of extender, freezing temperature and sperm final concentration on motility parameters. Using milk as an extender, progressive motility and rapid spermatozoa percentage differed significantly ( $P < 0.05$ ) at temperature of  $-79^\circ\text{C}$ , when compared to  $-90^\circ\text{C}$  and  $-120^\circ\text{C}$ . In HEPES extender, the temperature of  $-90^\circ\text{C}$  was lower than other temperatures. In TRIS extender, there was no significant difference ( $P > 0.05$ ) between freezing temperatures, however motility was significantly higher than the other extenders, at all temperatures tested. The concentration of  $600 \times 10^6$  sperm per mL, considering percentage of motile sperm, progressive motility and fast speed as variables, was higher ( $P < 0.05$ ) than  $800 \times 10^6$  sperm per mL and  $1000 \times 10^6$  sperm per mL. For the mean velocity of rapid sperm trajectory (VAPR), only skim milk extender at a temperature of  $-79^\circ\text{C}$  was higher ( $P < 0.05$ ) than temperatures of  $-90^\circ\text{C}$  and  $-120^\circ\text{C}$ . However, there was no statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) between concentrations tested using the other extenders. It is concluded that TRIS extender at a freezing temperature of  $-79^\circ\text{C}$  and final concentration of  $600 \times 10^6$  sperm per mL proved to be the protocol of freezing more suitable for semen of Santa Ines rams, using TK 3000 equipment. However, more studies using artificial insemination must be conducted to validate its quality.

**Keywords:** extender, freezing temperature, ram, sperm concentration.

## INTRODUÇÃO

Os recentes avanços na tecnologia da reprodução assistida tem aberto uma nova perspectiva na conservação do sêmen (YOSHIDA, 2000). Existe grande interesse em melhorar o processo de preservação do sêmen ovino, visando expandir o uso da inseminação artificial cervical na espécie (SALAMOM e MAXWELL, 1995a; EL-ALAMY e FOOTE, 2001). Características anatômicas da cérvix ovina, alta sensibilidade do sêmen de carneiro ao processo de congelação, associadas a baixa fertilidade, dificultam a utilização da técnica de inseminação artificial transcervical (SOUZA et al., 1994a; SOUZA et al., 1994b; EPPLESTON et al., 1994; SALAMOM e MAXWELL, 1995b, CÂMARA et al., 2003; BICUDO et al., 2005). A inseminação artificial ovina em muitos países é realizada utilizando sêmen diluído fresco e resfriado à 4 °C ou 15 °C. Apesar dos bons índices de fertilidade alcançados, tal método tem a desvantagem de não permitir que o sêmen seja utilizado em locais distantes devido ao reduzido tempo de conservação do mesmo (CHEMINEAU e CAGNIÉ, 1991).

A criopreservação dos espermatozóides tem permitido realizar de conservação de recursos genéticos através da formação de um banco de esperma, garantindo uma constante comercialização de sêmen e colaboração com os programas de melhoramento genético dos rebanhos através da técnica de inseminação artificial. A preservação do sêmen permite a difusão, por meio da inseminação artificial e conservação, das características genéticas de animais de elite ou de rebanhos que estejam em extinção (NAQVI et al., 2001; BUCAK et al., 2007).

O uso do sêmen ovino congelado é limitado, comercialmente, nos programas de inseminação artificial, devido a baixa taxa de parição obtida, após inseminação cervical. Esta baixa fertilidade está associada com a reduzida viabilidade do espermatozóide ovino após o processo de congelação e descongelação (EVANS e MAXWELL, 1987). É evidente a relação entre a proporção de colesterol/fosfolipídios, e a proporção de fosfolipídios poliinsaturados/saturados dos ácidos graxos da membrana espermática do espermatozóide de mamíferos e a sua susceptibilidade ao choque térmico. O baixo conteúdo de colesterol

da membrana espermática do espermatozóide de carneiro, associado com a alta proporção de fosfolípidios insaturados, a torna mais susceptível a peroxidação lipídica, presumivelmente, aumentando sua instabilidade e as injúrias provocadas pelo choque térmico quando comparado a outras espécies. Contudo um alto nível de colesterol resulta em uma membrana espermática mais coesa, rígida e impermeável (DARIN-BENNETT et al., 1976; DARIN-BENNETT e WHITE, 1977; PARKS e LYNCH, 1992; WHITE, 1993; SANOCKA e KURPISZ, 2004).

A dificuldade para estabelecer uma população de espermatozóides viáveis que possam ser transportados pela cérvix e garantir uma boa fecundação tornou-se motivo de várias investigações. (EVANS e MAXWELL, 1987; BUCAK et al., 2007). A combinação da temperatura de congelamento com a taxa de resfriamento e congelamento, composição química do diluidor, concentração espermática, concentração do crioprotetor e controle higiênico na manipulação do sêmen são fatores que afetam o período de vida do espermatozóide de mamíferos (YOSHIDA, 2000). Consequentemente pretende-se obter um protocolo de congelamento com diluidores que previnam a formação de cristais de gelo intracelular e reduza os danos para a célula espermática, durante e após a criopreservação (NAQVI et al., 2001; AMIRAT et al., 2004; BUCAK et al., 2007).

Neste estudo avaliou-se o efeito do tipo de diluidor, da temperatura de congelamento e da concentração espermática final sobre os parâmetros de motilidade do sêmen congelado de ovino da raça Santa Inês para desenvolver um protocolo de congelamento e viabilizar o uso da inseminação via cervical tornando esta tecnologia melhor e mais acessível aos rebanhos comerciais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Local do experimento

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Andrologia, Tecnologia do Sêmen e Inseminação Artificial (LATSIA), da Embrapa Caprinos e Ovinos, localizado na estrada Sobral/Groaíras, Km 04, Sobral, Ceará, a 3° 42' de Latitude Sul e 40° 21' de Longitude Oeste, na zona fisiográfica do Sertão Cearense, em uma altitude de 83 metros ao nível do mar. O clima da região é do tipo AW de savana segundo a classificação climática de KOPPEN.

A temperatura média anual é de 28°C, situando-se a máxima e a mínima, em torno de 35°C e 22°C, respectivamente. A umidade relativa do ar é de 60% (RELATÓRIO TÉCNICO ANUAL DO CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE CAPRINOS, 1989).

### 2. Animais experimentais

Foram utilizados cinco reprodutores ovinos da raça Santa Inês, com faixa etária de 24 a 48 meses, selecionados através de exame andrológico, segundo HENRY e NEVES (1998). Os animais foram mantidos em regime de estabulação, em baias de alvenaria recebendo capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) picado a vontade e 500 g de um concentrado comercial (Ovino Top, da empresa Integral-mix). Sal mineral e água foram disponibilizados à vontade.

### 3. Diluidores

Os diluidores de sêmen foram preparados conforme a descrição a seguir:  
Diluidor 1: 76,5 mL de solução a base de TRIS (3,605 g do TRIS-hidroximetil aminometano, 1,488 g de ácido cítrico e 2,024 g de frutose, dissolvidos em 100 mL de água

bidestilada), adicionada de 20 mL de gema de ovo de galinha, 3,5 mL de glicerol, 100 UI de penicilina, 50mg de estreptomicina, adaptado de Evans e Maxweel (1987).

Diluidor 2: 91,5 mL de solução à base de leite (10 g de leite desnatado em pó da marca Molico, 194 g de glicose dissolvidos em 100 mL de água destilada que foi fervida em banho maria durante 10 minutos). Após resfriar a temperatura ambiente foram adicionados 5,0 mL de gema de ovo de galinha, 3,5 mL de glicerol, 100 UI de penicilina e 50 mg de estreptomicina, adaptado de Colas (1980).

Diluidor 3: 76,5 mL da solução base de HEPES composto de 2.4 g de N-2 hydroxyethyl piperazine- N-2-ethane sulfonic acid, 429 mg de bicarbonato de sódio, 2 g de glicose em 100 mL de água bidestilada, 20 mL de gema de ovo, 3,5 mL de glicerol, 100 UI de penicilina, 50 mg de estreptomicina, adaptado de Araujo (2000).

#### **4. Colheita do sêmen e processamento**

O sêmen foi coletado de cinco animais, uma vez por semana, durante seis semanas, por meio da vagina artificial modelo francês na temperatura de 42°C. Após a colheita foi realizado um *pool* dos ejaculados para eliminar o efeito individual e obter-se volume de sêmen suficiente para serem testados os protocolos de congelação. Em seguida, as amostras foram mantidas em banho-maria a 32°C, mensuradas quanto ao volume e avaliadas quanto a motilidade e ao vigor, por microscopia óptica, e determinada a concentração espermática em espectrofotômetro.

O *pool* de sêmen foi fracionado em nove alíquotas para a adição dos três diluidores, em três concentrações finais diferentes. As amostras contendo o diluidor leite foram envasadas em nove palhetas, sendo três palhetas por concentração  $1000 \times 10^6$ ,  $800 \times 10^6$  e  $600 \times 10^6$  espermatozoides em leite- gema com por mL. O mesmo procedimento foi seguido para os diluidores TRIS e HEPES, totalizando vinte e sete palhetas de 0,25 mL, para serem congeladas em três temperaturas diferentes.

Efetuada a distribuição em três grupos de nove palhetas (leite-gema:  $1000 \times 10^6$ ,  $800 \times 10^6$  e  $600 \times 10^6$  spz/mL; HEPES-gema:  $1000 \times 10^6$ ,  $800 \times 10^6$  e  $600 \times 10^6$  spz/mL e TRIS-gema  $1000 \times 10^6$ ,  $800 \times 10^6$  e  $600 \times 10^6$  spz/mL), procedeu-se a congelação em três

temperaturas diferentes (-79 °C, -90 °C; -120 °C) utilizando o equipamento TK 3000, com programa P3S1 específico para ovinos. O tempo para atingir a temperatura de 5 °C foi de 76 minutos, permanecendo 20 minutos em equilíbrio e levando mais 30 minutos para atingir a temperatura de 120 °C, classificada como congelação lenta. Quando atingida a primeira temperatura de -79 °C, nove palhetas do primeiro grupo foram transferidas para o botijão criogênico, para serem conservadas em nitrogênio líquido a - 196 °C, e assim, respectivamente de forma sucessiva para os demais grupos, quando atingidas as temperaturas de -90 °C e -120 °C, respectivamente.

### **5. Avaliação do sêmen**

As palhetas contendo as amostras de sêmen dos 27 tratamentos permaneceram 30 dias armazenados no botijão criogênico. Depois foram descongeladas a 37 °C por 20 segundos em banho-maria e rediluídas em solução de citrato de sódio e glicose composta por 2,37 g de citrato, 0,80 g de glicose e 100 mL de água destilada (EVANS e MAXWELL,1987), para se obter uma concentração aproximada de  $50 \times 10^6$  espermatozóides. Os parâmetros de motilidade espermática foram avaliados pelo método Computer Assisted Sêmen Analysis (CASA) que consiste de microscópio com contraste de fase acoplado a uma videocâmara adaptada ao Sistema Sperm Class Analyser<sup>R</sup> ( SCA, Microptic S. L., versão 3.2.0). Após 2 minutos de incubação, uma alíquota de 10 microlitros (10 $\mu$ l) de cada amostra foi colocada na câmara de Makle (Sel- Medical instruments) aquecida a 37° C no aparelho e avaliada em cinco campos diferentes. As características incluídas para análise foram percentagem de espermatozóides móveis, motilidade progressiva (rápidos e médios) e velocidade da trajetória média dos espermatozóides rápidos (VAP  $\mu$ m/s ).

### **6. Morfologia espermática**

As alterações espermáticas foram determinadas pelo método do esfregaço corado com azul de bromofenol, segundo a técnica de Medeiros et al. (2006). Os esfregaços foram

preparados após a descongelação do sêmen, com a contagem de 200 células avaliadas em microscopia óptica, em aumento de 1000X. A classificação morfológica de acordo com Colas (1980) inclui espermatozóides normais, defeitos de cabeça, e de peça intermediária, gota citoplasmática proximal, gota citoplasmática distal, defeitos de flagelo e alterações morfológicas totais.

## **7. Análise Estatística**

Os dados foram submetidos ao delineamento de blocos ao acaso com parcelas subdivididas, onde os blocos correspondem aos dias de colheita e as parcelas aos tratamentos arranjados em esquema fatorial 3 diluidores (HEPES, leite e TRIS) x 3 concentrações (600, 800 e 1000 x 10<sup>6</sup> spz/mL) e temperaturas correspondem as sub-parcelas. Para análise da variável motilidade progressiva dos espermatozóides rápidos foi necessário se proceder a transformação radicial, e para análise de velocidade média do percurso dos espermatozóides rápidos (VAPR), procedeu-se a transformação quadrática para atender as pressuposições da análise de variância. A comparação de médias para verificação dos efeitos significativos foi feita pelo teste t-student com 5% de probabilidade de erro. Para a análise dos dados utilizou-se o programa estatístico SAS (versão 1996).



## RESULTADOS

A comparação de médias dos parâmetros de motilidade do sêmen nas diferentes temperaturas de congelação com o mesmo diluidor e entre diluidores nas respectivas temperaturas pode ser observado na Tabela 1. A percentagem de espermatozóides móveis não diferiu ( $P > 0,05$ ) entre dos diluidores, contudo o TRIS foi superior aos outros diluidores, em todas as temperaturas. Em relação à motilidade progressiva do espermatozóide, no leite houve diferença ( $P < 0,05$ ) para temperatura de  $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$  em relação às demais ( $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). O diluidor HEPES na temperatura de  $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$  diferiu significativamente da temperatura de  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ . No TRIS não foi observada variação significativa entre as temperaturas testadas. Entre os diluidores às temperaturas de  $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$  foram constatados os melhores resultados para o TRIS que diferiu ( $P < 0,05$ ) dos demais diluidores estudados. Para esta variável foi observada interação do diluidor com a temperatura (Tabela 2), onde as menores percentagens de motilidade progressiva foram observadas na temperatura de  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$  em todos os diluidores. Na comparação de médias para a variável percentagem de espermatozóides rápidos (Tabela 1), no diluidor leite, a melhor temperatura de congelação foi  $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a qual diferiu ( $P < 0,05$ ) das demais. No HEPES não houve diferença significativa nas temperaturas de  $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ , entretanto, a temperatura de  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$  diferiu significativamente de  $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ . No diluidor TRIS não se observou distinção significativa ( $P < 0,05$ ) entre as temperaturas de congelação testadas. Entre os diluidores às temperaturas de  $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ , o TRIS apresentou-se ( $P < 0,05$ ) superior ao HEPES e ao leite. Foi observada interação do diluidor com a temperatura de congelação do sêmen, para esta variável (Tabela 3). A temperatura de  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$  foi a que revelou a menor percentagem de espermatozóides rápidos entre os diluidores. Quanto à velocidade média do percurso de espermatozóide (VAP), no diluidor leite à temperatura de  $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$  foi superior, diferindo das temperaturas de  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nos diluidores HEPES e TRIS não foram observadas diferenças ( $P < 0,05$ ) entre as temperaturas de congelação. Entre os diluidores, a temperatura de  $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$  apresentou à

maior VAP, mas não diferiu ( $P>0,05$ ). No entanto, as temperaturas de  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$  nos diluidores HEPES e TRIS diferiram ( $P<0,05$ ) em relação ao diluidor leite.

**Tabela 1.** Efeito de diluidor e da temperatura de congelação sobre os parâmetros de motilidade do sêmen congelado de ovinos Santa Inês.

DILUIDOR	TEMP.( $^{\circ}\text{C}$ )	VARIÁVEIS			
		% Móveis	% Progressivo	% Rápidos	VAP (( $\mu\text{m/s}$ ))
LEITE	-79	40,8 $\pm$ 4,3 <sup>ab</sup>	8,0 $\pm$ 1,3 <sup>ab</sup>	9,1 $\pm$ 1,5 <sup>ab</sup>	102,6 $\pm$ 4,3 <sup>aA</sup>
LEITE	-90	30,8 $\pm$ 5,0 <sup>aC</sup>	4,8 $\pm$ 1,8 <sup>bb</sup>	5,9 $\pm$ 2,5 <sup>bc</sup>	90,9 $\pm$ 5,2 <sup>bb</sup>
LEITE	-120	33,8 $\pm$ 5,3 <sup>ab</sup>	5,4 $\pm$ 1,2 <sup>bc</sup>	5,5 $\pm$ 1,1 <sup>bc</sup>	78,2 $\pm$ 6,2 <sup>bb</sup>
HEPES	-79	52,4 $\pm$ 4,6 <sup>ab</sup>	9,6 $\pm$ 1,4 <sup>ab</sup>	11,4 $\pm$ 2,0 <sup>ab</sup>	110,4 $\pm$ 3,5 <sup>aA</sup>
HEPES	-90	44,7 $\pm$ 5,0 <sup>bb</sup>	8,1 $\pm$ 1,2 <sup>bb</sup>	9,6 $\pm$ 1,6 <sup>bb</sup>	106,1 $\pm$ 4,3 <sup>aA</sup>
HEPES	-120	56,0 $\pm$ 4,4 <sup>aA</sup>	11,2 $\pm$ 1,6 <sup>ab</sup>	13,4 $\pm$ 2,3 <sup>ab</sup>	108,0 $\pm$ 4,1 <sup>aA</sup>
TRIS	-79	66,8 $\pm$ 4,8 <sup>aA</sup>	15,5 $\pm$ 1,7 <sup>aA</sup>	22,5 $\pm$ 3,6 <sup>aA</sup>	111,4 $\pm$ 3,6 <sup>aA</sup>
TRIS	-90	62,7 $\pm$ 4,2 <sup>aA</sup>	13,2 $\pm$ 1,3 <sup>aA</sup>	17,3 $\pm$ 2,1 <sup>aA</sup>	109,1 $\pm$ 2,8 <sup>aA</sup>
TRIS	-120	62,5 $\pm$ 4,3 <sup>aA</sup>	13,6 $\pm$ 1,3 <sup>aA</sup>	16,9 $\pm$ 2,1 <sup>aA</sup>	99,6 $\pm$ 6,3 <sup>aA</sup>

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna, mesmo diluidor em diferentes temperaturas, diferem estatisticamente pelo teste t-student ( $P<0,05$ )

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna, mesma temperatura em diferentes diluidores, diferem estatisticamente pelo teste t-student ( $P<0,05$ )

**Tabela 2.** Efeito diluidor e temperatura de congelação sobre a variável motilidade progressiva dos espermatozóides de ovinos da raça Santa Inês.

DILUIDOR	TEMPERATURA		
	-79 $^{\circ}\text{C}$	-90 $^{\circ}\text{C}$	-120 $^{\circ}\text{C}$
LEITE	8,0 $\pm$ 1,3 <sup>ab</sup>	4,8 $\pm$ 1,8 <sup>bc</sup>	5,4 $\pm$ 1,2 <sup>bc</sup>
HEPES	9,6 $\pm$ 1,4 <sup>abB</sup>	8,1 $\pm$ 1,2 <sup>bb</sup>	11,2 $\pm$ 1,6 <sup>ab</sup>
TRIS	15,5 $\pm$ 1,7 <sup>aA</sup>	13,2 $\pm$ 1,3 <sup>aA</sup>	13,6 $\pm$ 1,3 <sup>aA</sup>

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste t ( $P<0,05$ )

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste t ( $P<0,05$ )

**Tabela 3.** Efeito da interação diluidor e temperatura de congelação sobre a variável percentagem de espermatozóides com velocidade rápida de ovinos da raça Santa Inês.

DILUIDOR	TEMPERATURA		
	-79 $^{\circ}\text{C}$	-90 $^{\circ}\text{C}$	-120 $^{\circ}\text{C}$
LEITE	9,1 $\pm$ 1,5 <sup>ab</sup>	5,9 $\pm$ 2,5 <sup>bc</sup>	5,5 $\pm$ 1,1 <sup>bc</sup>
HEPES	11,4 $\pm$ 2,0 <sup>abB</sup>	9,6 $\pm$ 1,6 <sup>bb</sup>	13,4 $\pm$ 2,3 <sup>ab</sup>
TRIS	22,5 $\pm$ 3,6 <sup>aA</sup>	17,3 $\pm$ 2,1 <sup>aA</sup>	16,9 $\pm$ 2,1 <sup>aA</sup>

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste t ( $P<0,05$ )

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste t ( $P < 0,05$ )

Na Tabela 4 observa-se a comparação de médias para as variáveis, percentagem de espermatozóides móveis, velocidade progressiva, percentagem de espermatozóides rápidos e velocidade média do percurso do espermatozóide em função da concentração espermática final. A concentração espermática de  $600 \times 10^6$  spz/mL e  $800 \times 10^6$  spz/mL no diluidor leite, para a percentagem de espermatozóides móveis, mostraram-se melhor, diferindo ( $P < 0,05$ ) da concentração de  $1000 \times 10^6$  spz/mL. No diluidor HEPES e no diluidor TRIS, a concentração de  $600 \times 10^6$  spz/mL foi superior, mas não diferiu ( $P < 0,05$ ) da concentração de  $800 \times 10^6$  spz/mL. Entretanto, a concentração de  $1000 \times 10^6$  spz/mL apresentou a menor percentagem de espermatozóides móveis. Quando se compara, as concentrações espermáticas entre os diluidores, o TRIS na concentração de  $600 \times 10^6$  spz/mL diferiu ( $P < 0,05$ ) das demais concentrações testadas. Na comparação da média para a variável motilidade progressiva do espermatozóide nos diluidores leite e TRIS, com concentração de  $600 \times 10^6$  spz/mL, foi observada variação significativa em relação as demais concentrações avaliadas. No HEPES, a concentração de  $600 \times 10^6$  spz/mL também foi superior, mas não diferiu da concentração de  $800 \times 10^6$  spz/mL. A avaliação das concentrações entre diluidores mostrou que o TRIS com  $600 \times 10^6$  spz/mL também foi ( $P < 0,05$ ) superior em relação aos demais. Quanto ao percentual de espermatozóides rápidos, a concentração de  $600 \times 10^6$  spz/mL foi superior em todos diluidores estudados, todavia, no leite e no HEPES não diferir estatisticamente da concentração de  $800 \times 10^6$  spz/mL. No que se refere a variável VAP não foi verificada diferença ( $P > 0,05$ ) entre as concentrações nos diluidores estudados. A maior VAP observada foi na concentração de  $600 \times 10^6$  spz/mL, com exceção no diluidor TRIS, apesar de que, não se observou diferença estatística entre diluidores.

**Tabela 4.** Efeito do diluidor e da concentração espermática sobre os parâmetros de motilidade do sêmen congelado de ovinos Santa Inês.

DILUIDOR	CONCENT	VARIÁVEIS			
		% Móveis	% Progressivo	% Rápidos	VAP (( $\mu\text{m/s}$ ))
LEITE	600x10 <sup>6</sup>	44,0±5,0 <sup>aC</sup>	9,5±1,9 <sup>aB</sup>	10,5±2,5 <sup>aB</sup>	98,5±6,0 <sup>aA</sup>
LEITE	800x10 <sup>6</sup>	36,0±4,8 <sup>aC</sup>	5,9±1,2 <sup>bC</sup>	6,5±1,4 <sup>abB</sup>	88,4±5,7 <sup>aB</sup>
LEITE	1000x10 <sup>6</sup>	25,3±4,1 <sup>bB</sup>	2,9±0,6 <sup>bC</sup>	3,5±0,8 <sup>bC</sup>	84,8±5,2 <sup>aB</sup>
HEPES	600x10 <sup>6</sup>	61,3±4,1 <sup>aB</sup>	12,7±1,6 <sup>aB</sup>	15,9±2,5 <sup>aB</sup>	111,5±2,9 <sup>aA</sup>
HEPES	800x10 <sup>6</sup>	49,8±5,0 <sup>abB</sup>	9,1±1,4 <sup>abBC</sup>	10,8±1,8 <sup>abB</sup>	106,3±4,3 <sup>aA</sup>
HEPES	1000x10 <sup>6</sup>	42,0±4,0 <sup>bA</sup>	7,1±0,8 <sup>bA</sup>	7,7±0,9 <sup>bB</sup>	106,0±4,6 <sup>aA</sup>
TRIS	600x10 <sup>6</sup>	79,0±2,0 <sup>aA</sup>	18,4±1,4 <sup>aA</sup>	26,5±2,7 <sup>aA</sup>	104,0±6,4 <sup>aA</sup>
TRIS	800x10 <sup>6</sup>	63,7±4,6 <sup>aA</sup>	13,8±1,3 <sup>bA</sup>	18,5±2,3 <sup>bA</sup>	108,4±3,7 <sup>aA</sup>
TRIS	1000x10 <sup>6</sup>	50,4±3,2 <sup>bA</sup>	10,4±1,0 <sup>bA</sup>	12,3±1,3 <sup>bcA</sup>	107,8±3,0 <sup>aA</sup>

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna, mesmo diluidor em diferentes concentrações, diferem estatisticamente pelo teste t-student(P<0,05)

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna, mesma concentração em diferentes diluidores, diferem estatisticamente pelo teste t-student(P<0,05)

Com relação as alterações morfológicas totais (AMT), a Tabela 5 mostra que o diluidor leite na concentração espermática final de 800 x 10<sup>6</sup> espermatozóides/ mL e temperatura de congelação de -90 °C apresentou a maior média (P<0,05) de AMT em relação às outras temperaturas. Com relação aos diferentes diluidores na mesma concentração e temperatura, observou-se que o diluidor leite na temperatura de -120 °C mostrou a (P<0,05) menor média de AMT. Não houve diferença (P>0,05) entre os valores da AMT nas temperaturas de congelação e concentrações espermáticas finais nos diluidor HEPES.

Quando comparadas as médias da AMT na concentração 1000 x 10<sup>6</sup> spz/mL constatou-se no diluidor TRIS diferença (P<0,05) na temperatura de congelação de -79 °C, com a menor média de AMT.

**Tabela 5.** Alterações morfológicas totais (AMT) de espermatozoides ovinos, submetidos à diferentes protocolos de congelamento.

DILUID	CONCENTRAÇÃO								
	600 x 10 <sup>6</sup>			800 x 10 <sup>6</sup>			1000 x 10 <sup>6</sup>		
	TEMP (°C)			TEMP (°C)			TEMP (°C)		
	-79	-90	-120	-79	-90	-120	-79	-90	-120
LEITE	21,9±4,2	19,4±4,0	19,2±6,0	18,7±5,4	22,1±3,4a	17,6±3,6b	18,7±4,9	16,6±3,6	19,0 ±4,0
HEPES	20,3±2,9	18,5±3,7	20,4±5,1	17,6±4,6	20,0±5,3	19,6±3,3	16,1±4,1	19,0±5,0	18,3±3,5
TRIS	22,8±7,3	20,2±5,1	18,5±2,7	19,3±2,0	20,4±5,2	21,3±5,0	17,9±4,9a	22,4±5,3a	18,8±4,1ab

Letra minúscula comparação entre temperaturas na mesma concentração e diluidor

Letra maiúscula comparação entre diluidores na mesma concentração e temperatura

## DISCUSSÃO

A utilização do sêmen congelado veio para otimizar a inseminação artificial na espécie ovina, possibilitando uma maior pressão de seleção e, conseqüentemente, aumentando a eficiência produtiva do rebanho e superando as restrições impostas à sua utilização (BICUDO et al., 2005). Entretanto, vários autores verificaram que no processo de criopreservação ocorrem interações entre o diluidor e a temperatura de congelação podendo influenciar, de forma positiva ou negativa, a conservação do sêmen ovino congelado, salientando ainda, que a taxa de diluição do sêmen interfere na qualidade espermática após congelação (D'ALESSANDRO et al., 2001; BAG et al., 2002a). D'Alessandro et al. (2001) observaram que a percentagem de espermatozóides vivos após descongelação foi influenciada pela diluição espermática e interação da concentração espermática com o diluidor. Outro fator observado foi os protocolos de congelação de sêmen com taxa de resfriamento controlada que proporcionam uma completa automação no processo de criopreservação, protegendo os espermatozóides contra vários efeitos adversos causados pela menor flutuação na temperatura e assim favorecendo positivamente a motilidade espermática e a integridade acrossomal após descongelação (JOSHI et al., 2008). Quanto o conhecimento dos eventos provocados pelas injúrias da criopreservação sobre os espermatozóides poderá prevenir, retardar ou até mesmo reverter as mudanças na membrana espermática e, assim, melhorar a eficiência da inseminação artificial em ovinos (MAXWELL e WATSON, 1996).

Neste estudo, a percentagem de espermatozóides móveis no diluidor TRIS na temperatura de congelação de  $-79^{\circ}\text{C}$  foi 66,8% superior ao diluidor leite com 40,8% e ao do diluidor HEPES com 52,4%. Estes resultados concordam com as observações de Carvalho et al. (2008) no qual o diluidor TRIS-gema demonstrou desempenho superior ao diluidor leite no que se refere à recuperação da motilidade após a descongelação. Contudo, os dados estudados diferem dos resultados de Gil et al. (2003) onde constatou-se que o sêmen de carneiro, congelado em leite desnatado com 5% de gema de ovo e 7% de glicerol apresentou uma maior percentagem de espermatozóides móveis (67%), quando comparado

com o diluidor comercial Bioexcell com 3,2% de glicerol que apresentou apenas 28% de espermatozóides móveis. Da mesma forma, D'Alessandro e Martemucci (2005) constataram uma taxa média de 41% de espermatozóides móveis quando congelaram sêmen de carneiro da raça Leccese no diluidor leite com 20% de gema de ovo e 5% de glicerol em temperatura de -75 °C. Usualmente nas espécies domésticas, o número de células móveis no sêmen congelado e descongelado corresponde a cerca de 50% daquele encontrado em amostras do sêmen fresco (WATSON, 2000). Entretanto, o número de espermatozóides móveis por dose inseminante oscila entre as espécies. No carneiro, o sêmen congelado-descongelado pode ter uma alta proporção (40-60%) de células móveis, embora somente 20-30% permaneça biologicamente funcional (SALAMOM e MAXWELL, 2000).

A motilidade e a estrutura do espermatozóide são afetadas, em diferentes graus, e ainda não há conhecimento, se as mudanças ocorrem simultaneamente, ou são causadas em diferentes estágios do procedimento de congelação e descongelação (SALAMOM e MAXWELL, 1995b). Uma célula espermática pode ser móvel, apesar de, possuir danos que reduzam sua fertilidade. Existem alterações que podem não afetar a motilidade, mas reduzir o tempo de vida, a habilidade para interagir com o sistema reprodutivo feminino e a fertilidade espermática (MEDEIROS et al., 2002). A análise do sêmen *in vitro* é bastante utilizada para estimar o potencial de fertilização do espermatozóide. Contudo, nenhum experimento encontrou resultados comprovados que sejam consistentes e correlacionados com a fertilidade. Esta lacuna deve-se, em parte, a complexidade própria do espermatozóide e aos fatores relacionados ao controle das análises do sêmen (SÁNCHEZ-PARTIDA et al., 1999; GRAHAM e MOCÉ, 2005; O'MEARA et al., 2008).

A variável velocidade progressiva do espermatozóide no diluidor à base de leite diferiu significativamente à temperatura de -79 °C em relação às de -90 °C e -120 °C. Esses dados são semelhantes aos obtidos por Colas (1975) que observou a influência da temperatura de congelação na sobrevivência dos espermatozóides após descongelação e uma melhor sobrevivência espermática com a temperatura de -75 °C quando comparadas às de -55 °C, -90 °C, -105 °C, -125 °C. No diluidor HEPES, a temperatura de -120 °C apresentou a melhor percentagem com 11,2% de espermatozóides apresentando motilidade

progressiva, mas não diferiu estatisticamente da temperatura  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$  com 9,6 %. Entre as temperaturas de congelação no diluidor TRIS, a de  $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$  apresentou 15,5% de espermatozóides com motilidade progressiva, portanto superior a todos os valores encontrados nos demais diluidores. Resultados diferentes foram observados por D' Alessandro et al. (2001) onde o diluidor leite desnatado apresentou a melhor avaliação *in vitro* comparado ao diluidor TRIS. O mesmo foi constatado por Gil et al. (2000), em um experimento no qual o diluidor leite desnatado foi superior ao TRIS nos parâmetros de espermatozóides móveis e velocidade progressiva, mas não diferiu na integridade da membrana espermática. Provavelmente como o principal constituinte protetor do leite são as micelas de caseínas, estas podem interagir com as proteínas BSP evitando os efeitos danosos da perda de lipídios da membrana espermática (BERGERON e MANJUNATH, 2006). As micelas de caseínas do leite apresentam funções semelhantes às LDL da gema do ovo, o que justificaria a superioridade do diluidor TRIS, porque além do seu efeito tampão teria uma maior quantidade de gema de ovo favorecendo a conservação dos espermatozóides. Molinia et al. (1996) em um estudo comparativo entre os diluidores TRIS e HEPES não observaram diferença na fertilidade entre os mesmos, apesar do diluidor HEPES ter apresentado superioridade na motilidade após descongelação e velocidade progressiva do sêmen congelado.

A percentagem de espermatozóides rápidos com o diluidor leite, à temperatura de  $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$ , foi significativa em relação as demais temperaturas, no entanto, as temperaturas de  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$  não diferiram entre si. Diferentemente dos resultados encontrados por Bag et al. (2002a) em que a temperatura de congelação de  $-125\text{ }^{\circ}\text{C}$  comparada à de  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$  conferiu uma melhor qualidade de criopreservação para o sêmen de ovino congelado no diluidor Tes-gema, com ótima percentagem de células móveis e espermatozóides normais.

O diluidor HEPES revelou a melhor percentagem de espermatozóides rápidos na temperatura de  $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Contudo, Anel et al. (2003) trabalhando com diluidor (Tes, TRIS, frutose, 10% de gema de ovo e 4% de glicerol) para congelação de sêmen de ovinos à temperatura de  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , encontraram uma motilidade superior a deste estudo. Entretanto, não foram verificadas diferenças significativas entre as temperaturas de congelação no diluidor TRIS. Neste experimento, somente as variáveis percentagem de motilidade



progressiva e de espermatozoides rápidos foram influenciadas pela interação diluidor e temperatura sendo que os melhores resultados foram obtidos com o TRIS. Possivelmente esta influência deve ser resultante dos efeitos danosos das diferentes taxas em que o sêmen é congelado e da ação dos componentes químicos dos diluidores para prevenir tais efeitos.

As excelentes taxas de resfriamento, congelação e descongelação, ótimas, podem diferir com a pressão osmótica, a composição química do diluidor utilizado com a diluição do sêmen (EL-ALAMY e FOOTE, 2001). Fiser e Fairfull (1984) constataram interação da concentração do glicerol adicionada ao diluidor com a taxa de congelação do sêmen, cuja motilidade espermática após descongelação foi superior com o nível de glicerol entre 4 a 6% e a taxa de congelação de 10 para 100 °C/ min. El-Alamy e Foote (2001) observaram que o diluidor TRIS-gema foi superior aos outros diluidores, exceto ao diluidor leite na proteção da célula espermática durante o processo de criopreservação. Resultados diferentes foram observados neste estudo com relação ao diluente leite.

Na temperatura de -79 °C, o diluidor leite apresentou a maior velocidade média do percurso do espermatozoide (VAP) de 102,6 µl/s. Todavia, nos diluidores HEPES e TRIS não foram observadas diferenças na VAP entre as temperaturas de congelação. Gil et al. (2003) comprovaram uma VAP de 126 µm/s na avaliação *in vitro* do sêmen de carneiro congelado no leite desnatado e uma VAP de 123 µm/s no sêmen congelado no diluidor comercial Bioexcell. Entretanto, Anel et al. (2003) verificaram uma VAP de 85,2 µm/s do espermatozoide congelado em diluidor com Tes e TRIS. Vale salientar que a motilidade é somente um dos aspectos da capacidade de fertilização do espermatozoide e, está relacionada com a integridade da mitocôndria (BAG et al., 2002b). No entanto, se reconhece que podem existir lesões celulares, que mesmo não afetando a motilidade, comprometem o processo de fecundação (ANEL et al., 2003).

A determinação da concentração de espermatozoides móveis na palheta sem reduzir a fertilidade, influencia o número de inseminações cervicais e os índices de prenhez após inseminação artificial (RITAR e BALL, 1993). Neste estudo, o diluidor leite, na concentração espermática de  $600 \times 10^6$  sptz/mL apresentou a maior percentagem de espermatozoides móveis, apesar de não diferir da concentração de  $800 \times 10^6$  sptz/mL. Langford e Marcus (1982) concluíram que inseminações de ovelhas por via cervical com

dose inseminante de  $200 \times 10^6$  espermatozóides com sêmen resfriado e diluído em leite desnatado foram superiores as inseminações com dose de  $400 \times 10^6$  espermatozóides.

A concentração final de  $600 \times 10^6$  spz/mL mostrou uma maior percentagem de espermatozóides móveis nos diluidores HEPES e TRIS. Resultados similares foram constatados por D' Alessandro et al. (2001) em que o aumento da concentração final de espermatozóides de 500 para  $800 \times 10^6$  spz/mL afetou negativamente as características de integridade da membrana e motilidade espermática, reduzindo as taxas de partições de ovelhas inseminadas com sêmen congelado. Molínia et al. (1994) também verificaram que a melhor motilidade espermática foi encontrada no sêmen com maior taxa de diluição, entre seis e dezoito vezes o volume do ejaculado, enquanto que a integridade do acrossoma dos espermatozóides foi melhor com a menor taxa de diluição, em três vezes o volume do ejaculado, constatando que uma alta taxa de diluição diminui linearmente a integridade do acrossoma. Uma redução na taxa de diluição do sêmen congelado para se obter uma alta concentração de espermatozóide na dose inseminante produziu uma baixa fecundação em ovinos (SALAMOM e MAXWELL, 2000). Ritar e Ball (1993) observaram uma baixa fertilidade do sêmen diluído na proporção 1mL de sêmen para 0,5 mL de diluidor e atribuíram a reduzida motilidade após a descongelação, ao efeito de interações negativas entre espermatozóide, plasma seminal, componentes do diluidor e alta densidade espermática. Entretanto, o oposto foi constatado por Amir et al. (1973) ao proceder a diluição do sêmen na proporção de 1:10 verificando severa queda na fertilidade comparada com uma taxa de diluição de 1:1, mostrando que a concentração espermática tem importância significativa sobre a concepção das ovelhas após inseminação artificial.

No que se refere as variáveis percentagem de espermatozóides com motilidade progressiva e percentagem de espermatozóides rápidos, a concentração de  $600 \times 10^6$  spz/mL mostrou-se superior em todos os diluidores, com o TRIS se destacando em relação aos demais. Molínia et al., (1996) não verificaram diferença na fertilidade após inseminação cervical de ovelhas com sêmen congelado, nas concentrações de  $80 \times 10^6$  spz móveis/ pellet e  $240 \times 10^6$  spz móveis/ pellet ou entre os diluidores TRIS-gema e tampões (HEPES-NaOH, Pipes-NaOH), apesar da superioridade da motilidade espermática e integridade do acrossoma do sêmen congelado nos diluidores tampões comparados ao

TRIS-gema. Em estudo anterior, Molinia et al. (1994) comprovaram que os diluidores tampões (Tes, Pipes, HEPES, TRIS-Tes) foram superiores em termo de motilidade e integridade de acrossoma ao diluidor TRIS-citrato, contudo, comparando-os quanto a uma maior taxa de diluição do sêmen, o TRIS-citrato foi melhor do que estes diluidores.

A variável velocidade média da trajetória do espermatozóide rápido (VAP) não apresentou diferença entre as concentrações nos diluidores testados, entretanto, o diluidor HEPES na concentração de  $600 \times 10^6$  spz/mL apresentou a maior VAP com 111,5  $\mu\text{m/s}$ . Estes resultados diferiram dos resultados verificados por Amirat et al.(2005) que testaram três diluidores no qual o sêmen diluído no TRIS com 8% de LDL apresentou uma VAP 44,4  $\mu\text{m/s}$ , superior a dos diluidores Triladyl (39,4 $\mu\text{m/s}$ ) e Biophos (38,0 $\mu\text{m/s}$ ). Da mesma forma, Bag et al. (2002a) quando avaliaram sêmen de carneiro congelado no diluidor Tes-gema-glicerol na concentração de  $1000 \times 10^6$  spz/mL em diferentes temperaturas encontraram uma VAP de 71,7  $\mu\text{m/s}$ , valor inferior aos encontrados neste estudo. Esta característica influencia positivamente na passagem do espermatozóide pela cérvix, aumentando as chances de fecundação. A relação entre as características de motilidade dos espermatozoides humano, bovino e suíno mensuradas pelo sistema computadorizado de avaliação do sêmen (CASA), e a fertilidade *in vitro* e *in vivo* nestas espécies foram confirmadas por alguns autores (SÁNCHEZ-PARTIDA et al., 1999).

No sêmen congelado e descongelado, a motilidade da célula espermática é melhor preservada do que sua integridade morfológica (SALOMAM E MAXWELL,1995b). Healey (1969) avaliou o efeito da congelação sobre a estrutura do espermatozóide de alguns animais domésticos e constataram, após a observação em microscópio eletrônico, que as amostras de sêmen de bovino apresentaram pouca alteração da ultra-estrutura após congelação. Entretanto, os espermatozoides de carneiro e de coelho revelaram danos consistentes no complexo da membrana externa e acrossomal. Da mesma forma, Watson e Martin (1972) concluíram que os espermatozoides de carneiros apresentavam danos mais severos no acrossoma do que os espermatozoides de bovinos após congelação. Comparando as duas espécies, 48,5% dos espermatozoides de carneiros apresentaram acrossoma separado da cabeça, enquanto apenas 27,7% dos espermatozoides de bovino detectaram esta alteração.

Constatou-se neste estudo que o sêmen congelado nos diluidores leite e HEPES na concentração espermática final de  $1000 \times 10^6$  spz/mL com temperaturas de congelação de  $-79^\circ\text{C}$  e  $-90^\circ\text{C}$  apresentaram as menores médias ( $16,6 \pm 3,6$  e  $16,1 \pm 4,1$ ) respectivamente, das alterações morfológicas totais. Todos os valores encontrados neste estudo não ultrapassaram o limite de anormalidade total permitidos de 10 a 15% para o sêmen ovino fresco (MIES FILHO, 1986). Carvalho et al. (2008) verificaram que o sêmen de carneiros Santa Inês congelados no diluidor leite-gema apresentou uma maior integridade de membrana espermática em relação ao sêmen congelado no diluidor TRIS-gema. Estando de acordo com o constatado neste experimento. D' Alessandro et al. (2001) confirmaram que os espermatozoides diluídos em leite desnatado na concentração de  $500 \times 10^6$  espermatozoides/ mL apresentavam 71,5% de acrossoma intacto quando comparado com 35,5 % na concentração de  $800 \times 10^6$  spz/mL e com alta incidência (15,6%) de perda de acrossoma. Por outro lado, Bag et al. (2002b) concluíram que a congelação do sêmen na temperatura de  $-125^\circ\text{C}$  manteve uma grande proporção de espermatozoides com acrossoma normal.

## CONCLUSÃO

Conclui-se que o protocolo de sêmen constituído pelo diluidor TRIS, na temperatura de congelação de  $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$  e concentração final de  $600 \times 10^6$  sptz/ mL proporcionou uma melhor criopreservação dos parâmetros de motilidade do sêmen de ovinos da raça Santa Inês congelado em equipamento TK 3000. Entretanto, estudos utilizando a inseminação artificial por via cervical e laparoscópica precisam ser conduzidos para validar seu efeito sobre a fecundação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIR, D.; SCHINDLER, H.; EYAL, E.; LEHRER, A. R.; KEMPENICH-PINTO, O. The effect of the ratio of dilution of ram semen in different diluents on the conception rate. **Annals Biologic Animal Biochemical Biophys**, v.13, p.1-5, 1973.

AMIRAT, L.; ANTON, M.; TAINTURIER, D.; CHATAGNON, G.; BATTUT, I.; COURTENS, J. L. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and triladyl, before, during and after freezing and thawing. **Reproduction**, v.129, p. 535-543, 2005.

AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GÉRARD, O.; COURTENS, J. L. ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, v.61, p. 895-907, 2004.

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

ARAÚJO, A. A. **Mise au point d'un dilueur de conservation en milieu liquide pour la semence ovine en vue de l'insémination artificielle**. 2000. 81p. Tese (Doutorado em Ciências da Vida) - Université François Rabelais de Tours, Tours.

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

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

- BERGERON, A. & MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.1338-1344, 2006.
- BICUDO, S.D. ; AZEVEDO, H. C.; SILVA MAIA, M. S.; SOUSA,D.B.; RODELLO, L. Aspectos peculiares da inseminação artificial em ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, supl. 1, p. 127-130, 2005.
- BUCAK, M. N.; ATESSAHIN, A.; VARISH, Ö.; YÜCE, A.; TEKIN, N. AKÇAY, A. The influence of trahalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen microscopic and oxidate stress parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**, v.67, p.1060-1067, 2007.
- CÂMARA, D. R.; SIMPLÍCIO, K. M. M. G.; GUERRA, M. M. P.; et al. Influência da variação na congelabilidade do sêmen e fertilidade *in vivo* de ovinos deslanados. **Ciência Veterinária Tropical**, v.7, p.82-89, 2003.
- CARVALHO, F. P.; SILVA, J.F.S.; SOUZA,G. V.;QUIRINO, C.R.; CARVALHO,C.S.P. Diferentes diluentes sobre a motilidade e integridade de membrana plasmática após o congelamento e descongelamento de sêmen ovino. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.3, p.612-620, 2008.
- CHEMINEAU, P.; CAGNIÉ, Y. **Training manual on artificial insemination in sheep and goats**, FAO Animal Production and Health Paper 83, Roma, 1991
- COLAS, G.; Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. **Journal Reproduction Fertility**, v.42, p.277-285, 1975.
- COLAS, G.; Variations saisonnieres de la qualité du sperme chez le belier ile de France I. Etude de La morphologie cellulaire et de La motilité massale. **Reproduction Nutrition Development**, Jovy-em-josas, v.20, n.6, p.1789-1799, 1980.
- D' ALESSANDRO, A.G.; MARTEMUCCI, G.; COLONNA, M.A.; BELLITTI,A. Post-thaw survival of ram spermatozoa and fertility after insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender composition. **Theriogenology**, v.55,p. 1159-1170, 2001.

D' ALESSANDRO, A.G. ; MARTEMUCCI, G. Post-thaw survival and acrosome integrity of spermatozoa of Leccese rams frozen in different seasons with a milk-egg yolk extender. *Ital. Journal Animal Science*, v.4, p.139-148, 2005.

DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I. G. Influence of the cholesterol of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, v.14, p.466-470, 1977.

DARIN-BENNETT, A.; POULOS, A.; WHITE, I. G. The fatty acid composition of the major phosphoglycerides of ram and human spermatozoa. *Andrologia*, v.8 (1), p.37-45, 1976.

EL-ALAMY, M.A., FOOTE, R.H. Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. *Animal Reproduction Science*, v.65, p.245-254, 2001.

EPPLESTON, J.; SALAMOM, S. MOORE, N.W.; EVANS, G. The depth of cervical insemination and site of intrauterine insemination and their relationship to the fertility of frozen-thawed ram semen. *Animal Reproduction Science*, v.36, p.211-225, 1994.

EVANS, G.; MAXWELL, W. **Salamon's artificial insemination of sheep and goats**, Butterworth, Sydney, p.194. 1987.

FISER, P. S.; FAIRFULL, R. W. The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. *Cryobiology*, v.21, p.542-551, 1984.

GIL, J.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology*, v.54, p.93-108, 2000.

GIL, J.; LUNDEHEIM, N.; SÖDERQUIST, L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Influence of extender, temperature, and addition, of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*, v.59, p.1241-1255, 2003.

GRAHAM, J. K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, v.64, p.492-504, 2005.

HEALEY, P. Effect of freezing on the ultrastructure of the spermatozoon of some domestic animals. *Journal Reproduction Fertility*, v.18, p.21-27, 1969.



HENRY, M. ; NEVES, J.P. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**, Belo Horizonte, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998.

JOSHI, A.; KUMAR, D.; NAQVI, S.M.K.; MAURYA,V.P. Effect of controlled and uncontrolled rate of cooling, prior to controlled rate of freezing, on motion characteristics and acrosomal integrity of cryopreserved ram spermatozoa. **Biopreservation and Biobanking**, v.6, p.277-284, 2008.

LANFFORD, G. A.; MARCUS, G. J. Influence of sperm number and seminal plasma on fertility of progestagen-treated sheep in confinement. **Journal Reproduction Fertility**, v.65, p.325-329, 1982.

MAXWELL, W. M. C.; WATSON, P. F. Recent progress in the preservation of ram semem. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.55-65, 1996.

MEDEIROS, A. A.; ARAUJO, A. A.; RODRIGURS, L.F.S. Utilização do azul de bromofenol conservado a 4<sup>o</sup> C e 29<sup>o</sup> C, como método de coloração vital para avaliação do espermatozóide ovino. **Revista de Ciências Agrárias**, v.1, p.287-297, 2006.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES,J.L. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, p.327-344, 2002

MIES FILHO, A. A tecnologia de sêmen I. **Inseminação Artificial**, v.2, p.404-468, 1986.

MOLINIA, F. C.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. *In vitro* evaluation of zwitterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. **Reproduction Nutrition Development**, v.34, p.491-500, 1994.

MOLINIA, F. C.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Fertility of ram spermatozoa pellet-frozen in zwitterion-buffered diluents. **Reproduction Nutrition Development**, v.36, p.21-29, 1996.

NAQVI, S. M. K.; JOSHI, A.; DAS, G. K.; MITTAL,J.P. Development and application of ovine reproductive technologies: an Indian experience. **Small Ruminant Research**, v.39, p. 199-208, 2001.

O'MEARA, C. M.; HANRAHAN, J. P.; PRATHALINGAM, N. S.; OWEN, J. S.; DONOVAN, A.; FAIR, S.; WARD, F.; WADE, M.; EVANS, A. C. O.; LONERGAN, P. Relationship between *in vitro* fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v.69, p.513-522, 2008.

PARKS, J.E.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v.29, p.255-266, 1992.

RELATÓRIO TÉCNICO ANUAL DO CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE CAPRINO 1982-1986. Sobral: EMBRAPA-CNPC, 1989. 284p

RITAR, A.J.; BALL, P.D. The effect of freeze-thawing of goat and sheep semen at a high density of spermatozoa on cell viability and fertility after insemination. **Animal Reproduction Science**, v.31, p.249-262, 1993.

SALAMOM, S.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v.37, p. 185-249, 1995a.

SALAMOM, S.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v.38, p. 1-36, 1995b.

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

SÁNCHEZ-PARTIDA, L. G.; WINDSOR, D.; EPPLESTON, J.; SETCHELL, B. P.; MAXWELL, W. M. C. Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. **Journal of Andrology**, v.20, n.2, p. 280-288, 1999.

SOUZA, M. I. L.; LUZ, S. L. N; GONÇALVES, P. B. D.; NEVES, J. P. Características morfológicas e penetrabilidade cervical usando a inseminação em ovinos. **Ciência Rural**, v.24, p.591-595, 1994a.

SOUZA, M. I. L.; LUZ, S. L. N; GONÇALVES, P. B. D.; NEVES, J. P. Inseminação transcervical com sêmen congelado em ovinos. **Ciência Rural**, v.24, 597-602, 1994b.

, v.2, n.12. 2004.

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

WATSON, P.F.; MARTIN, I. C. A. A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v. 28, p.99-101, 1972.

WHITE, I.G.Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a Review . **Reproduction Nutrition Development**, v.5, p.639-658, 1993.

YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.349-355, 2000.

## **CAPÍTULO 3**

**Influência do tipo de gema de ovo e a taxa de adição sobre os parâmetros de motilidade do sêmen congelado de ovino da raça Santa Inês**

## RESUMO

Neste estudo pretende-se verificar a influência dos tipos de gema de ovo (galinha caipira e codorna) e sua porcentagem (10% e 20%) sobre as características de motilidade do sêmen congelado de ovino. Foram coletados cinco ejaculados de três carneiros Santa Inês, uma vez por semana, por cinco semanas, feito um *pool* de sêmen e avaliados o volume, a motilidade, o vigor e a concentração espermática. Em seguida o *pool* foi fracionado em alíquotas para testar diferentes diluidores: TRIS com (10% e 20% de gema de ovo de galinha) e Tris com (10% e 20% de gema de ovo de codorna). As amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 mL e congeladas na temperatura de -79 °C no equipamento TK 3000. Após trinta dias, foram descongeladas e o sêmen avaliado pelo método CASA. Procedeu-se a ANOVA para testar o efeito do tipo de gema de ovo e a porcentagem dos espermatozóides. A porcentagem de espermatozóides móveis foi ( $P < 0,05$ ) superior no diluidor TRIS com 10% de gema de ovo de galinha. As variáveis, motilidade progressiva e motilidade de espermatozóides ( $P < 0,05$ ) rápidos apresentaram as melhores taxas no TRIS com 10% de gema de ovo de galinha, mas não diferiram ( $P > 0,05$ ) do TRIS com 10% de gema de ovo de codorna. A VAPR foi superior ( $P < 0,05$ ) no TRIS com 20% de gema de ovo de galinha. Observou-se uma maior porcentagem ( $P < 0,05$ ) de espermatozóides com defeitos de cabeça nos tratamentos com maior percentual de gema de ovo (20%) independente do tipo de gema. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) com relação às outras alterações morfológicas espermáticas. Conclui-se que a porcentagem de 10% de gema de ovo de galinha caipira foi a que melhor preservou os parâmetros de motilidade espermática, sendo que a gema de ovo de codorna na mesma proporção poderá ser uma alternativa a ser adicionada no diluidor de sêmen, mas necessita-se no entanto de mais estudos *in vivo*.

**Palavras-chaves:** carneiro, congelação, diluidor, tipo de gema de ovo.

## ABSTRACT

This study aimed to investigate the influence of egg yolk types (chicken and quail) and its percentage (10% and 20%) on characteristics of frozen semen motility of rams. Five ejaculates were collected from three Santa Ines rams, once a week, a pool was performed and volume, motility, vigor and sperm concentration were evaluated. Then, the pool was split into aliquots to test different extenders: TRIS (10% and 20% of chicken egg yolk) and with TRIS (10% and 20% of quail egg yolk). Samples were packaged into 0.25 mL straws and frozen at a temperature of  $-79^{\circ}\text{C}$ , using TK 3000 equipment. After 30 days, the straws were thawed and semen evaluated by CASA method. ANOVA was performed to test the effect of egg yolk type and sperm percentage. The percentage of motile sperm was significantly higher ( $P<0.05$ ) using TRIS extender with 10% of chicken egg yolk. The variables progressive motility and sperm motility showed the best rates ( $P<0.05$ ) using TRIS with 10% of egg yolk of hens, but did not differ statistically ( $P>0.05$ ) from TRIS with 10% of egg yolk of quail. VAPR was significantly higher ( $P<0.05$ ) using TRIS with 20% of chicken egg yolk. It was observed a higher percentage ( $P<0.05$ ) of sperm with head defects in the treatments with the highest percentage of egg yolk (20%), independently of the yolk type used. There was no statistical difference ( $P>0.05$ ) in other morphological sperm changes. It was concluded that the percentage of 10% of chicken egg yolk was the best to preserve sperm motility parameters. Egg yolk of quail may be an alternative to be added to semen extender, but further in vivo studies must be done.

**Keyword:** ram, extender, egg yolk, freezing.

## INTRODUÇÃO

A prática da inseminação artificial nos rebanhos tem apresentado algumas limitações devido à fatores de manutenção da viabilidade e da capacidade de fertilização dos espermatozóides, armazenados por um longo período em baixas temperaturas. No intervalo entre a colheita do sêmen até a inseminação, os espermatozóides estão sujeitos as condições ambientais adversas e, como consequência do resfriamento rápido, pode ocorrer choque térmico devido as alterações na temperatura e na osmolaridade do meio, que provocam mudanças morfológicas na organização e composição dos lipídios das membranas espermáticas, como também, acúmulo de produtos metabólicos que em grande concentração, podem matar os espermatozóides. Estudos indicam que cerca de 90% dos espermatozóides epididimários de algumas espécies sobrevivem às condições ambientais, entretanto, os espermatozóides podem perder esta habilidade durante o percurso no sistema genital masculino, permanecendo resistentes menos de 15% no sêmen fresco. A adição de gema de ovo de galinha pode proporcionar um aumento de 30% desta habilidade nas células espermáticas (LASLEY e MAYER, 1944; LASLEY e BOGART, 1944; MAYER e LASLEY, 1945; BOGART e MAYER, 1950).

A gema de ovo de diversas espécies aviárias é comumente encontrada nos diluidores de sêmen para preservação dos espermatozóides de mamíferos, contra o choque térmico durante o processo de resfriamento de congelação e descongelação (TRIMECHE et al., 1997; MOUSSA et al., 2002; HUMES e WEBB, 2006; BATHGATE et al., 2006; SANTIAGO-MORENO et al., 2008; ANDRABI et al., 2008; SU et al., 2008). Os fosfolipídios protegem os espermatozóides do choque térmico, entretanto, alguns componentes da gema de ovo de galinha têm ação antagônica ao efeito crioprotetor das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (BIALY et al., 1957; MOUSSA et al., 2002).

A resistência adquirida pelos espermatozóides, proporcionada pela gema de ovo é promovida por fatores distintos, os quais capacitam a célula espermática a sobreviver em baixa temperatura. A ação protetora é atribuída à LDL, cujos fosfolipídios e colesterol são incorporados na membrana celular, bem como há associação das LDL com proteínas do

plasma seminal, evitando que estas sequestram fosfolipídios e colesterol da membrana espermática aumentando a sua estabilidade e protegendo o espermatozóide do choque térmico (LASLEY e MAYER, 1944; BOGART e MAYER, 1950; BERGERON et al., 2004).

Foi comprovado que a associação das LDL à membrana espermática protege o espermatozóide do choque térmico (BERGERON et al., 2004). Seu mecanismo de ação é promover a adesão de fosfolipídios e colesterol à membrana celular e, a formação de um complexo com as proteínas do plasma seminal, desta forma impedindo, que as proteínas fiquem disponíveis para atuarem na membrana celular, evitando assim o efluxo de fosfolipídios e colesterol da membrana espermática (BERGERON et al., 2004). Durante a congelação e descongelação ocorre ruptura das LDL liberando triglicerídeos, fosfolipídios e apoproteínas em forma de gel para o meio, que se ajustam e envolvem a membrana espermática, possivelmente, criando uma película protetora contra os cristais de gelo formados durante este processo (PACE e GRAHAM, 1974; WATSON e MARTIN, 1975; MOUSSA et al., 2002; ANTON et al., 2003).

As gemas de ovo das aves variam em sua composição química quanto ao conteúdo de colesterol, ácidos graxos e fosfolipídios. Os componentes básicos da gema de ovo são similares, mas a proporção de ácidos graxos e tipos de fosfolipídios são diferentes (BAIR e MARION, 1978; BATHGATE et al., 2006) e, estas variações podem influenciar na proteção que proporcionam durante o resfriamento, congelação e descongelação (SANTIAGO MORENO et al., 2008). Fernandez-Santos et al. (2006) observaram que a qualidade do sêmen foi influenciada pela combinação de efeitos da concentração da gema de ovo e pelo procedimento de resfriamento.

Neste contexto objetivou-se avaliar o efeito do tipo de gema de ovo: galinha (*Gallus gallus*) e codorna (*Conturnix coturnix*), bem como a taxa de adição (10% e 20%) ao diluidor TRIS sobre as características de motilidade do sêmen congelado de ovinos da raça Santa Inês.



## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Local do experimento

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Andrologia, Tecnologia do Sêmen e Inseminação Artificial (LATSIA), da Embrapa Caprinos e Ovinos, localizado na estrada Sobral/Groaíras, km 04, Ceará, a 3° 42' de Latitude Sul e 40° 21' de Longitude Oeste, na zona fisiográfica do Sertão Cearense, em uma altitude de 83 metros. O clima da região é do tipo AW de savana segundo a classificação climática de KOPPEN. A temperatura média anual é de 28°C, situando-se a máxima e a mínima, em torno de 35°C e 22°C, respectivamente. A umidade relativa do ar é de 60% (RELATÓRIO TÉCNICO ANUAL DO CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE CAPRINOS, 1989).

### 2. Animais experimentais

Foram utilizados três reprodutores ovinos da raça Santa Inês, com faixa etária de 24 a 36 meses e submetidos ao exame andrológico, segundo Henry e Neves (1998). Os animais foram mantidos em regime de estabulação, em baias de alvenaria recebendo uma dieta composta de capim elefante (*Pennisetum purpureum*) picado, 500g de um concentrado comercial (OVINOTOP) oferecido em duas refeições diárias, manhã e tarde, a base de sal mineral e água a vontade.

### 3. Tratamentos

No experimento foram utilizados quatro tratamentos com o diluidor TRIS composto (3,605 g do TRIS-hidroximetil aminometano, 1,488 g de ácido cítrico e 2,024 g frutose, dissolvido em 100 mL de água bidestilada) adicionado de gema de ovo de galinha caipira (*Gallus gallus*) e gema de ovo de codorna (*Coturnix coturnix*) em duas proporções (10% e 20%), 3,5 mL de glicerol, 100 UI de penicilina, 50mg de estreptomicina (adaptado de

EVANS E MAXWELL, 1987). Os diluidores foram preparados no dia anterior a congelação e os ovos utilizados foram adquiridos entre um a três dias após a postura.

#### **4. Colheita do sêmen e processamento**

O sêmen foi colheitado de três animais, uma vez por semana, durante cinco semanas consecutivas usando vagina artificial do modelo francês (IMV). Após a colheita foi feito um *pool* de ejaculados, para suprimir o efeito individual e para obtenção de um volume de sêmen suficiente a fim de serem testados em quatro tratamentos com diluidor TRIS. As amostras foram mantidas em banho-maria à 32°C e avaliadas quanto, ao volume através do copo coletor graduado; a motilidade e o vigor pela avaliação subjetiva no microscópio óptico e a concentração espermática no espectrofotômetro.

Após a mensuração da concentração espermática do *pool* de sêmen, este foi fracionado em alíquotas para ser diluído no TRIS adicionado de gema de ovo de galinha caipira e de codorna em duas proporções (10% e 20%), respectivamente, constituindo assim, quatro tratamentos do sêmen com concentração final de  $600 \times 10^6$ . Em seguida, foram envasadas cinco palhetas de 0,25 mL de cada tratamento e congeladas a temperatura de -79°C, no equipamento TK 3000, com programa P3S1, específico para ovinos. Quando atingida a temperatura de -79 °C, vinte palhetas foram transferidas para o botijão criogênico e conservadas em nitrogênio líquido a -196 °C.

#### **5. Avaliação do sêmen**

A motilidade espermática foi analisada em microscópio de contraste de fase, acoplado a uma videocâmara adaptada ao Sistema Sperm Class Analyser<sup>R</sup> (SCA, Microptic S. L versão 3.2.0).

Decorridos 30 dias, as palhetas foram descongeladas à 37°C por 20 segundos em banho-maria e rediluídas em solução de citrato de sódio e glicose (2,37g de citrato, 0,80g de glicose e 100mL de água destilada), para obter uma concentração aproximada de  $50 \times 10^6$  espermatozóides. Após dois minutos de incubação em banho-maria, uma alíquota 10

microlitros de cada amostra foi colocada na câmara de Makler (Sel-Medical instruments) aquecida a 37°C no aparelho e avaliada em cinco campos diferentes. As características incluídas na análise foram percentagem de células espermáticas móveis, motilidade progressiva dos espermatozóides rápidos e velocidade média da trajetória do espermatozóide (VAP um/s).

## **6. Morfologia espermática**

As alterações espermáticas foram determinadas pelo método do esfregaço corado com azul de bromofenol, segundo a técnica de Medeiros (2006). Os esfregaços foram realizados após a descongelação do sêmen, contando-se de 200 células avaliadas em microscopia óptica, em aumento de 1000 X. A classificação morfológica foi realizada de acordo com Colas, (1980) que inclui espermatozóides normais, defeitos de cabeça, defeito de peça intermediária, gota citoplasmática proximal, gota citoplasmática distal e defeitos de flagelo.

## **7. Delineamento experimental**

Os dados foram submetidos ao delineamento inteiramente casualizado com arranjo fatorial 2x2. Os parâmetros de motilidade e vigor espermático foram avaliados por ANOVA utilizando o modelo GLM (General Linear Model). A comparação de médias, para os efeitos significativos foi realizado o teste de Tukey com 5% de probabilidade de erro. Para a análise utilizou-se o programa estatístico SYSTAT, versão 12, ano 2007.

## RESULTADOS

O sêmen congelado (Tabela 1) no diluidor TRIS com 10% de gema de ovo de galinha caipira (TGG/10%) apresentou uma percentagem de espermatozóides móveis de 54,4% ( $P<0,05$ ), superior aos demais tratamentos. No TRIS com 10% de gema de ovo de codorna (TGC/10%) e com 20% (TGC/20%) a percentagem de espermatozóides móveis foi de 44,3 e 43,6% respectivamente, não diferindo significativamente entre si ( $P>0,05$ ), assim como no TRIS com 20%, quando foi utilizada a gema de ovo de galinha caipira (TGG/20%). Foram visualizados os melhores valores ( $P<0,05$ ) do percentual de espermatozóides com motilidade progressiva nos tratamentos com TGG/10% (21,8%) e TGC/10% (20,2%). Para o percentual de espermatozóides com motilidade rápida, o TGG/10% apontou o melhor índice de (26,2%) mas não diferiu ( $P>0,05$ ) do TGC/10%, no entanto, foi mais elevado em relação aos demais. A variável velocidade média do percurso dos espermatozóides rápidos (VAPR) de 141,3  $\mu\text{l/s}$  teve o melhor resultado ( $P<0,05$ ) quando comparadas ao TGG/10% e TGC/10%, porém o TGC/20% diferiu ( $P<0,05$ ) dos demais.

**Tabela 1.** Efeito da gema de ovo e sua proporção a cerca dos parâmetros de motilidade do sêmen ovino congelado.

Tratamento	Proporção de Gema	Espermat. Móveis (%)	Motilidade Progressiva (%)	Motilidade de Espermat. Rápidos (%)	VAPR* ( $\mu\text{l/s}$ )
Galinha	10%	54,4 $\pm$ 3,9 <sup>a</sup>	21,8 $\pm$ 1,6 <sup>a</sup>	26,2 $\pm$ 2,5 <sup>a</sup>	138,5 $\pm$ 2,9 <sup>b</sup>
	20%	40,5 $\pm$ 3,6 <sup>b</sup>	17,4 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>	19,5 $\pm$ 1,8 <sup>b</sup>	141,3 $\pm$ 2,0 <sup>a</sup>
Codorna	10%	44,3 $\pm$ 3,0 <sup>b</sup>	20,2 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	22,5 $\pm$ 1,9 <sup>ab</sup>	138,0 $\pm$ 2,1 <sup>b</sup>
	20%	43,6 $\pm$ 4,5 <sup>b</sup>	18,7 $\pm$ 2,0 <sup>b</sup>	21,0 $\pm$ 2,7 <sup>b</sup>	135,6 $\pm$ 3,6 <sup>c</sup>

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste t ( $P<0,05$ ).

\*Velocidade média do percurso dos espermatozóides rápidos

Em relação aos tratamentos adotados e ao percentual de gema de ovo utilizado (Tabela 2) não foi observado efeito significativo ( $P>0,05$ ) sobre as alterações morfológicas dos espermatozoides no tocante aos defeitos de peça intermediária, defeito de cauda, gota distal e alterações morfológicas totais. Examinou-se uma maior ( $P<0,05$ ) percentagem de espermatozoides com defeitos de cabeça nos tratamentos com maior percentual de gema de ovo (20%) independente do tipo de gema. No que se refere a gota citoplasmática distal verificou-se que o tratamento com gema de ovo de galinha caipira não apresentou esta alteração morfológica, sendo superior ( $P<0,05$ ) ao tratamento com gema de ovo de codorna.

**Tabela 2.** Médias e desvio padrão das alterações morfológicas dos espermatozoides diluídos no TRIS com 10 e 20% de gema de ovo de galinha e gema de ovo de codorna.

TRATAM.	TAXA DE ADIÇÃO	DEF. DE CABEÇA	DEF. DE PI	DEF. DE CAUDA	DEF. DE GCP	DEF. GCD	AMT
GALINHA	10%	9,0±3,5 <sup>a</sup>	12,1±3,8 <sup>a</sup>	14,0±5,4 <sup>a</sup>	0,0 <sup>b</sup>	1,4±1,6 <sup>a</sup>	36,6±1,5 <sup>a</sup>
	20%	11,3±5,5 <sup>b</sup>	12,8±4,5 <sup>a</sup>	13,4±5,9 <sup>a</sup>	0,0 <sup>b</sup>	0,96±1,0 <sup>a</sup>	38,6±11,8 <sup>a</sup>
CODORNA	10%	8,4±3,8 <sup>a</sup>	11,2±6,0 <sup>a</sup>	15,0±6,2 <sup>a</sup>	0,5±1,2 <sup>a</sup>	1,2±1,3 <sup>a</sup>	36,5±10,4 <sup>a</sup>
	20%	10,0±3,6 <sup>b</sup>	11,6±8,1 <sup>a</sup>	14,2±9,0 <sup>a</sup>	0,1±0,3 <sup>a</sup>	1,1±1,2 <sup>a</sup>	37,2±14,8 <sup>a</sup>

## DISCUSSÃO

Desde a descoberta da gema de ovo como constituinte essencial para preservação do sêmen de várias espécies, ela vem sendo utilizada nos diluidores empregados para congelação de espermatozóides. Contudo, o mecanismo preciso pelo qual esta substância age para proteger a célula espermática, somente há pouco tempo foi esclarecido (FOULKES e STEWART, 1977; WATSON, 1981; HOLT, 2000; MOUSSA et al., 2002; BERGERON et al., 2004; AMIRAT et al., 2004; BERGERON e MANJUNATH, 2006) O uso da gema de ovo de galinha foi primeiramente pesquisado como componente de diluidor, de efeito benéfico sobre a conservação do sêmen de bovinos em baixa temperatura. Esta substância promove uma excelente proteção para os espermatozóides de bovinos contra o choque térmico e é largamente utilizada em diluidores comerciais (LARDY e PHILLIPS, 1939; AMIRAT et al., 2004).

No presente estudo, a percentagem de espermatozóides móveis, com motilidade progressiva e percentagem de espermatozóides rápidos foram melhores no tratamento TRIS com 10% de gema de ovo de galinha (TGG/10%). Os resultados neste experimento foram semelhantes aos de Ritar e Ball (1993) que constataram um declínio da motilidade espermática de carneiro no diluidor TRIS com 12% de gema de ovo de galinha.

Possivelmente, a ação de substâncias de efeitos deletérios sobre os espermatozóides deve-se a maior percentagem da gema de ovo no diluidor. Muitos constituintes da gema de ovo têm efeitos antagônicos aos da LDL (MOUSSA et al., 2002). A presença destas substâncias na gema de ovo podem inibir a respiração espermática e diminuir sua motilidade (KAMPSHMIDT et al., 1953; PACE e GRAHAM, 1974; WATSON e MARTIN, 1975; MOUSSA et al., 2002; AMIRAT et al., 2005). Demianowicz e Strzezek (1996) separaram duas lipoproteínas da gema de ovo de galinha: a lipoproteína de baixa densidade e a lipoproteína de alta densidade e observaram que a HDL reduzia significativamente a motilidade dos espermatozóides de suíno, ocasionando efeito danoso sobre as propriedades crioprotetoras.

Bialy et al. (1957) constataram que a adição de 5% de lipoproteínas da gema de ovo de galinha ao diluidor é benéfica sobre a qualidade espermática, com incremento na percentagem de células vivas. Entretanto, Moussa et al. (2002) obtiveram melhores resultados em termos de motilidade e característica de movimento quando substituíram a gema de ovo por 8% de um preparado de LDL. As LDL possuem marcadamente propriedades crioprotetoras no processo de congelação e descongelação do espermatozóide de bovino, podendo substituir a gema de ovo nos diluidores comerciais. Uma alta percentagem de espermatozoides móveis e uma melhor característica de movimento foram observadas no sêmen diluído com adição de LDL, quando comparado com a utilização da gema de ovo (FOULKES, 1977; MOUSSA et al., 2002). No entanto, Bianchi et al. (2006) trabalhando com sêmen congelado de suíno concluíram que, o uso de LDL não teve efeito sobre a viabilidade espermática quando comparado com a gema de ovo. O mesmo foi observado por Silva et al. (2008) afirmou que a lipoproteína de baixa densidade nas proporções de 5%, 10% e 20% não foram eficientes para substituir a gema de ovo no resfriamento do sêmen de ovinos. Amirat et al. (2004) avaliaram o efeito da LDL sobre a fertilidade do sêmen de bovinos, sendo encontrada uma taxa de clivagem significativamente superior após fertilização com sêmen congelado com LDL (63%), comparado com Optidyl (54,8%) que é um diluidor comercial contendo gema de ovo. O diluidor com LDL preservou a qualidade do sêmen de bovino, bem como a habilidade de fertilização.

O tratamento TRIS utilizando 10% de gema de ovo de galinha (TGG/10%) apresentou a melhor percentagem de espermatozoides com motilidade rápida, mas não diferiu ( $P>0,05$ ) do TRIS com 10% de gema de ovo de codorna (TGC/10%). A semelhança encontrada pode ser atribuída a quantidade de colesterol equivalente, pois algumas pesquisas constataram conteúdo de colesterol similar entre a gema de ovo dessas espécies, que contem 12,0 mg/g na galinha caipira e 12,1 mg/g na codorna (BRAGAGNOLO e RODRIGUEZ-AMAYA, 2003). A diferente composição dos tipos de gema de ovo, particularmente na quantidade de colesterol, ácidos graxos e fosfolípidos foi considerada como um dos principais fatores responsáveis pelo nível de proteção do espermatozóide contra as injúrias da congelação e descongelação (BATHGATE et al., 2006). A quantidade

de colesterol por unidade de peso de gema de ovo é influenciada pela espécie de ave, linhagem, idade e alimentação (BAIR e MARION, 1978). O colesterol beneficia o espermatozóide reduzindo os efeitos do resfriamento, no qual os lipídeos da membrana plasmática suportam a fase de transição do estado fluido para o estado gel (AMORIM et al., 2009).

A proporção de ácidos graxos insaturados, saturados e de colesterol das membranas espermáticas é diretamente responsável pela diferença na susceptibilidade do espermatozóide, aos danos provocados pelo choque térmico observados entre as diversas espécies (DARIN-BENNETT et al., 1976; DARIN-BENNETT e WHITE, 1977; WHITE, 1993; HOLT, 2000). O espermatozóide do coelho, cachorro e do homem apresentam baixa proporção de ácidos graxos insaturados/saturados, portanto são mais resistentes aos danos provocados pelo choque térmico do que os espermatozóides de ovino, bovino, suíno e equino que contém alta proporção de ácidos graxos insaturados/saturados (DARIN-BENNETT e WHITE, 1977; PARKS e LYNCH, 1992; WHITE, 1993). A quantidade de colesterol presente no espermatozóide de carneiro e touro situa-se entre 280-346mg /10<sup>9</sup> espermatozóides, enquanto que, os espermatozóides de coelho e humano possuem entre 545-556 µg/10<sup>9</sup> espermatozóides (DARIN-BENNETT e WHITE, 1977). As variações na composição dos lipídeos, que formam as membranas espermáticas dos animais, podem ser responsáveis pela diferença dos resultados encontrados na literatura sobre o comportamento do espermatozóide de mamíferos, em diluidores contendo diferentes taxas de adição de gema de ovo. O tratamento da célula espermática com colesterol, antes da congelação, previne a capacitação prematura e aumenta a longevidade da célula criopreservada (AMORIM et al., 2009). O colesterol exógeno, possivelmente ocupa locais na superfície da membrana espermática prevenindo as injúrias da congelação, então o efeito protetor dos fosfolipídios da gema de ovo contra o choque térmico no espermatozóide é proporcionado pela interação das estruturas lipídicas com a membrana plasmática das células (BLACKSHAW e SALISBURY, 1957; QUINN et al., 1980). Outra hipótese da proteção da gema de ovo de galinha é evitar que as BSP sequestram os fosfolipídios e o colesterol da membrana celular, prevenindo o fluxo dos lipídeos da membrana espermática e, conseqüentemente, retardando a capacitação espermática (BERGERON et al., 2004).



Os resultados neste experimento foram diferentes dos achados de Su et al. (2008) no qual o sêmen bovino congelado no TRIS, com 20% de gema de ovo de galinha apresentou viabilidade espermática superior ao sêmen congelado no TRIS com 20% de gema de ovo de codorna. Entretanto, Marco-Jimenez et al. (2004) não encontraram diferenças nos parâmetros da motilidade espermática após congelação do sêmen ovino em TRIS com adição de 10%, 15% e 20% de gema de ovo de galinha, ou seja, a percentagem de espermatozoides móveis foi similar para as diferentes concentrações de gema de ovo no diluidor. Da mesma forma, Smith et al. (1979) concluíram que o uso de 1 a 2% de gema de ovo de galinha para processar sêmen de bovino, deprime a motilidade espermática, enquanto 16 a 32% reduzem a percentagem de acrossoma intacto.

No que se refere a variável velocidade média do percurso do espermatozoide rápidos (VAP), foi observado que o sêmen diluído no TRIS com 20% de gema de ovo de galinha (TGG/ 20%) apresentou VAP de 141,3  $\mu\text{m/s}$ , superior ( $P < 0,05$ ) aos demais tratamentos. Este resultado diferiu do encontrado por Marco-Jimenez et al. (2004) que verificaram uma VAP de 82,0  $\mu\text{m/s}$  do espermatozoide de carneiro diluído no TRIS com 20% de gema de ovo de galinha, inferior ao encontrado neste trabalho. O ideal na avaliação do sêmen é que este apresente uma grande percentagem de células espermáticas com velocidade progressiva e um alto valor na velocidade média do percurso dos espermatozoides, beneficiando o deslocamento do espermatozoide no trato genital feminino e, conseqüente fecundação do óvulo. Contudo, estes resultados foram similares aos de Santiago-Moreno et al. (2008) ao relatarem que o TRIS com 20% de gema de ovo de galinha resguardou melhor a integridade da membrana e viabilidade do espermatozoide epididimário de caprino. O mesmo foi encontrado por Bathgate et al. (2006) com sêmen suíno, no qual a gema de ovo de galinha proporcionou uma melhor proteção ao espermatozoide do que a gema de ovo de codorna. Diferentemente, Trimeche et al. (1997) trabalhando com sêmen de jumento descobriram uma VAP de 55,6  $\mu\text{m/s}$  do espermatozoide no diluidor INRA com 10% de gema de codorna, indicando um efeito benéfico sobre o sêmen quando comparada com o diluidor adicionado de gema de galinha.

Entretanto, apesar do sêmen ovino congelado com 10% de gema (galinha ou codorna) ter apresentado uma VAP inferior que a observada a 20% de gema de galinha,

vale salientar que, as médias foram altas, e quando associadas a percentagem de móveis, motilidade progressiva e percentagem de espermatozóides rápidos, observa-se que os resultados são satisfatórios.

Neste estudo não foi observada diferença significativa em relação a defeitos de peça intermediária, de cauda, gota citoplasmática distal e alterações morfológicas totais nos diferentes tipos de gema de ovo (galinha e codorna) e na proporção da gema (10 e 20%), demonstrando uma boa capacidade de preservação da integridade espermática. Estes resultados estão de acordo com Jonas e Martin (1973) que constataram uma redução na frequência de defeitos de cabeça e peça intermediária com a inclusão de 3% de gema no diluente para resfriamento de sêmen de carneiro. Verificou-se uma maior percentagem de espermatozóides com defeitos de cabeça nos tratamentos com maior percentual de gema de ovo (20%), independente do tipo de gema. Amirat et al. (2005) concluíram que os espermatozóides bovinos diluídos no Triladyl com 20% de gema de ovo apresentaram 18% de rompimento da membrana espermática e 36% dos acrossomas sofreram reação. Em relação a gota citoplasmática distal observou-se que o tratamento com gema de ovo de galinha caipira não apresentou esta alteração morfológica, sendo superior ( $P < 0,05$ ) ao tratamento com gema de ovo de codorna. Santiago-Moreno et al. (2008) comparando a morfologia de espermatozóides epididimários de caprinos, no diluidor TRIS com 6% de gema de codorna e TRIS com 6% de gema de galinha, concluíram que não houve diferença na morfologia espermática entre os dois tratamentos.

## CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo indicam que a gema de ovo de galinha na proporção de 10% condicionou a melhor ação crioprotetora para os espermatozoides de ovinos entre as duas espécies aviárias testadas durante os processos de congelação e descongelação, em termo de viabilidade e motilidade progressiva dos espermatozoides. Por outro lado, apesar da gema de ovo de codorna ter apresentado resultados inferiores aos observados com gema de galinha caipira, os mesmos foram satisfatórios, assim podendo através de mais estudos *in vitro* e avaliações *in vivo*, serem uma possível substituta da gema de ovo de galinha.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMIRAT, L.; ANTON, M.; TAINTURIER, D.; CHATAGNON, G. ; BATTUT, I.; COURTENS, J. L. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and triladyl, before, during and after freezing and thawing. **Reproduction**, v.129, p. 535-543, 2005.
- AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C. ; GÉRARD, O.; COURTENS, J. L. ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, v.61, p. 895-907, 2004.
- AMORIM, E.A.M.; GRAHAM,J.K.;SPIZZIRI,B.; MEYERS,M.; TORRES,C.A.A. Effect of cholesterol or cholesteryl conjugates on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, v.58, p.210-214, 2009.
- ANDRABI, S.M.H.; ANSARI, M.S.; ULLAH, N.; ANWAR, M.; MEHMOOD, A. AKHTER, S. Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.427-433, 2008.
- ANTON, M.; MARTINET, V.; DALGALARRONDO, M.; BEAUMAL, V.; DAVID-BRIAND, E.; RABESONA, H. Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. **Food Chemistry**,v.83, p.175-183, 2003.
- BAIR, C. W.; MARION, W. W. Yolk cholesterol in eggs from various avian species. **Poultry Science**, v.57, p.1260-1265, 1978.
- BATHGATE, R.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, p.68-73, 2006.
- BERGERON, A.; CRÊTE, M. H.; BRINDLE, Y. ; MANJUNATH. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of

bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v. 70, p.708-717, 2004.

BLACKSHAW, A. W.; SALISBURY, G. W. Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa. II. Cold-shock and its prevention. **Journal Dairy Science**, v.40, n.9, p. 1099-1106, 1957.

BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.1338-1344, 2006.

BRAGAGNOLO, N.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Comparison of the cholesterol content of Brazilian chicken and quail eggs. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.16, p.147-153, 2003.

BIALY, G.; LUDWICK, T. M.; HESS, E. A.; ELY, F. Influence of lipoprotein on the freezing of bovine spermatozoa. **Journal Dairy Science**, v.40, n.9, p.1189-1192, 1957.

BIANCHI, I.; MASCHIO, E. F. CALDERAM, K. ; MADEIRA, E. M.; CORRÊA, E. K.; ULGUIM, R. R.; COLARES, T.; CORRÊA, M. N. Comparação de crioprotetores extracelulares na criopreservação de sêmen suíno. XV CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. Universidade Federal de Pelotas. Anais. 2006.

BOGART, R.; MAYER, D. T. The effects of egg yolk on the various physical and chemical factors detrimental to spermatozoan viability. **Journal of Animal**, v.9, p.143-152, 1950.

COLAS, G.; Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le belier ile de France I. Etude de La morphologie cellulaire et de La motilité massale. **Reproduction Nutrition Development**, Jovy-em-josas, v.20, n.6, p.1789-1799, 1980.

DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I. G. Influence of the cholesterol of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. **Cryobiology**, v.14, p.466-470,1977.

DARIN-BENNETT, A.; POULOS, A. ; WHITE, I. G. The fatty acid composition of the major phosphoglycerides of ram and human spermatozoa. **Andrologia**, v.8 (1), p.37-45, 1976.

DEMIANOWICZ, W.; STRZEZEK, J. The effect of lipoprotein fraction from egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. **Reproduction in Domestic Animal**, v.31(1), p.279-280,1996.

EVANS, G.; MAXWELL,W. **Salamon's artificial insemination of sheep and goats**, Butterworth, Sydney, p.194. 1987.

FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; ESTESO, M.C.;SOLER, A.J.; MONTORO, V.; GARDE, J. J. Effects of egg and cooling rate on the survival of refrigerad Red Deer(*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, 114-118, 2006.

FOULKES,J. A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v.49, p.277-284, 1977.

FOULKES, J. A.; STEWART, D. L. Fertility of dairy cattle after artificial insemination with semen frozen in a lipoprotein diluent. **Journal Reproduction Fertility**, v.51, p.175-177, 1977.

HENRY, M.; NEVES, J.P. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**, Belo Horizonte, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3-22, 2000

HUMES, R.; WEBB,G. Use of chicken or chukar egg yolk with two cryoprotectants for preservation of stallion semen. **Animal Reproduction Science**,v.94, p.62-63, 2006.

JONES, R.; MANN, T. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. **Journal Reproduction Fertility**, v. 50, p.261-268, 1977.

JONES, R. C.; MARTIN, I. C. A. The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5° C on the ultrastructure of ram spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v.35, p.311-320, 1973.

LARDY, H. A.; PHILLIPS, P. H. Preservation of spermatozoa. **Journal of Animal**, v.1, p. 219-221, 1939.

LASLEY, J. F.; MAYER, D. T. A variable physiological factor necessary for the survival of bull spermatozoa. A variable physiological factor necessary for the survival of bull spermatozoa. **Journal of Animal**, v.3, p. 129-135, 1944.

LASLEY, J. F.; BOGART, R. A Comparative study of epididymal and ejaculated spermatozoa of the boar. **Journal of Animal**, v.3, p. 360-370, 1944.

MAYER, D. T.; LASLEY, J.F. The factor in egg yolk affecting the resistance storage potentialities, and fertilizing capacity of mammalian spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v.4, p.261-269, 1945.

MARCO-JIMÉNEZ, F.; PUCHADES, S.; MOCÉ, E.; VIUDES-DE- CARTRO, M.P.; VICENTE, J.S.; RODRIGUEZ, M. Use of powdered egg yolk vs fresh egg yolk for the cryopreservation of ovine semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.39, p.438-441, 2004.

MEDEIROS, A. A.; ARAUJO, A. A.; RODRIGURS, L.F.S. Utilização do azul de bromofenol conservado a 4<sup>o</sup> C e 29<sup>o</sup> C, como método de coloração vital para avaliação do espermatozóide ovino. **Revista de Ciências Agrárias**, v.1, p.287-297, 2006.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D. ; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method ; cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.57, p.1695-1706, 2002.

PARKS, J.E.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v.29, p.255-266, 1992.

PACE, M. M.; GRAHAM, E. F. ; Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. **Journal of Animal**, v.39, p.1144-1149, 1974.

QUINN, P.J.; CHOW, P.Y.W.; WHITE, I.G. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. **Journal Reproduction Fertility**, v.60, p.403-407, 1980.

KAMPSCHMIDT, R. F.; MAYER, D. T.; HERMAN, H. A. Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. **Journal Dairy Science**, v.36, p.733-742, 1953.

RELATÓRIO TÉCNICO ANUAL DO CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE CAPRINO 1982-1986. Sobral: EMBRAPA-CNPC, 1989. 284p

RITAR, A.J.; BALL, P.D. The effect of freeze-thawing of goat and sheep semen at a high density of spermatozoa on cell viability and fertility after insemination. **Animal Reproduction Science**, v.31, p.249-262, 1993.

SANTIAGO-MORENO, J.; COLOMA, M.A.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; GOMEZ-BRUNET, A.; PULIDO-PASTOR, A. ZAMORA-SORIA, a.; CARRIZOSA, J.A.; URRUTIA, B. A comparison of the protective action of chicken and quail egg yolk in the cryopreservation of Spanish ibex epididymal spermatozoa. **Cryobiology**, v.57, p.25-29, 2008.

SILVA, M. C.; SNOECK, P. P. N.; SILVA, S.C.B.; ÁLVARES, C.T.G.; FUJII, J. B.; NEVES, M.M.; HENRY, M. Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre a viabilidade de espermatozóides ovinos resfriados. [www. Sovergs. Com.br/ conbravet 2008/anais/cd/resumos/R1251-1 pdf](http://www.Sovergs.Com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R1251-1.pdf). Acessado 20 de abril de 2008.

SMITH, R.L.; BERNDTSON, W.E.; UNAL, M. B.; PICKETT, B.W. Influence of percent egg yolk during cooling and freezing on survival of bovine spermatozoa. **Journal Dairy Science**, v.62, p.1297-1303, 1979.

SU, L.; XILONG, L.; QUAN, J.; YANG, S.; LI, Y. ; HE, X. ; TANG, X. A comparison of the protective action of added egg yolks from five avian species to the cryopreservation of bull sperm. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.212-219, 2008.

TRIMECHE, A.; ANTON, M.; RENARD, P.; GANDEMER, G.; TAINTURIER, D. Quail egg yolk: A novel cryoprotectant for the freeze preservation of poitou. **Cryobiology**, v.34, p.385-393, 1997.



WATSON, P. F, MARTIN, C. A, The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5°C. **Australian Journal of Biological Science**, v.28, p.145-52, 1975.

WATSON, P. F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. **Journal Reproduction Fertility**, v.62, p.483-492, 1981.

WHITE, I.G.Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a Review. **Reproduction Fertility Development**, v.5, p.639-658, 1993.

## **CAPÍTULO 4**

**Comparação de duas técnicas de inseminação artificial com sêmen  
congelado em ovinos Santa Inês**

## RESUMO

Objetivou-se comparar duas técnicas de inseminação artificial em fêmeas ovinas exploradas em duas fazendas do Norte do Ceará. Foram utilizadas 61 ovelhas mestiças de Santa Inês na fazenda 1 e 51 ovelhas Santa Inês na fazenda 2. Os animais eram explorados na caatinga em sistema semi-intensivo com suplementação de milho e sorgo e concentrado. Todas as fêmeas foram sincronizadas com esponjas vaginais impregnadas com 60 mg de Acetato de Medroxi Progesterona (MAP) por um período de 14 dias e aplicação de 300 UI de Gonadotrofina Coriônica Equina (ECG), por via intra-muscular, no dia da retirada da esponja. Na fazenda 1, 31 animais foram inseminados por via cervical e 30 por via laparoscópica. Na Fazenda 2, 26 animais foram inseminados por via cervical e 25 por via laparoscópica. As inseminações foram feitas em tempo fixo, entre 54 e 58 horas após a retirada da esponja sem observação de estro. O sêmen foi diluído em TRIS com 10% de gema de galinha caipira e congelado na máquina TK 3000 a temperatura de  $-79^{\circ}\text{C}$ . As doses inseminantes de 0,25 mL continham  $150 \times 10^6$  espermatozóides. As taxas de gestação foram comparadas dentro e entre as fazendas pelo teste qui-quadrado adotando-se o nível de significância de 5%. Para verificar o efeito das variáveis ordens de parto e escore corporal, foi realizada a análise de variância com aplicação do teste t, utilizando-se o programa SYSTAT. A inseminação artificial influenciou a taxa de prenhez mesmo com sêmen congelado, revelando resultados superiores ( $P < 0,05$ ) pela via laparoscópica independente da fazenda. Não houve efeito ( $P > 0,05$ ) da ordem de parto e escore corporal para inseminação cervical em ambas as fazendas. Entretanto, estas variáveis influenciaram a ( $P < 0,05$ ) inseminação por laparoscopia na fazenda 2, percebe-se que, apesar da avaliação *in vitro* do sêmen congelado neste experimento ter sido satisfatória, esta não foi suficiente para elevar as taxas de gestação das fêmeas inseminada, levando-se a supor que outros fatores devem estar envolvidos no processo de fecundação. Constatou-se que a técnica de laparoscopia é a mais indicada quando utiliza sêmen congelado na espécie ovina.

**Palavras-chaves:** inseminação artificial, ovelhas, sêmen congelado.

## ABSTRACT

The aim of this study was to compare two techniques of artificial insemination in ewes of two different farms located at the north of Ceara State. It were used 61 crossbreed Santa Ines ewes from farm 1 and 51 Santa Ines ewes from farm 2. The animals were raised in a semi-intensive systemat caatinga and supplemented with corn, sorghum and concentrated. All females were synchronized using vaginal sponge impregnated with 60 mg of medroxy acetate progesterone (MAP), during a period of 14 days and application of 300 IU of equine chorionic gonadotropin (ECG) intramuscularly, on the day of sponge removal. In farm 1, 31 ewes were inseminated by cervical via and 30 ewes by laparoscopic via. In Farm 2, 26 animals were inseminated by cervical via and 25 ewes by laparoscopic via. Donors were inseminated at fixed time, between 54 and 58 hours after sponge removal without observation of estrus. The semen was diluted in TRIS with 10% of yolk chicken and frozen at a temperature of  $-79^{\circ}\text{C}$ , using TK 3000 equipment. Inseminate doses of 0.25 mL contained  $150 \times 10^6$  sperm. Pregnancy rates were compared within and between farms by the chi-square test, adopting 5% of significance. To verify the effect of parturit yorder and body condition score variables, it was performed the variance analysis and t test, using SYSTAT program. Artificial insemination influenced the pregnancy rate even using frozen semen, showing superior results ( $P < 0.05$ ) by laparoscopy via, independently of the farm. There was no effect ( $P > 0.05$ ) of parturity order or body condition score considering cervical insemination on both farms. However, these two factors influenced ( $P < 0.05$ ) insemination by laparoscopy via on farm 2. It was concluded that despite the in vitro evaluation of frozen semen in this experiment have been satisfactory, it was not enough to increase the pregnancy rates of inseminated females. Then, it was assumed that other factors must be involved on the process of fecundation. It was also concluded that laparoscopy technique is the most indicated when frozen semen is used, in ovine species.

**Keyword:** artificial insemination, frozen semen, sheep.

## INTRODUÇÃO

A partir da descoberta do glicerol como crioprotetor, as pesquisas a cerca da congelamento de sêmen tiveram um grande avanço. Porém na espécie ovina, o sêmen congelado utilizado pela via cervical não proporciona resultados satisfatórios devido às alterações bioquímicas e moleculares espermáticas ocorridas durante o processo de congelamento e descongelamento, reduzindo o tempo de sobrevivência do espermatozóide, promovendo falha do transporte espermático no genital da ovelha (GUSTAFSSON, 1978; SALAMOM e MAXWELL, 1995b; MORAES, et al., 1998).

A exploração de ovinos ainda não tem sido capaz de utilizar algumas tecnologias de reprodução assistida, como a inseminação artificial, quando comparada com outras espécies de animais, devido as limitações na manipulação, congelamento e inseminação com sêmen congelado de carneiros. Embora vários estudos a cerca da criopreservação do sêmen terem sido realizados nos últimos anos, ainda existe a necessidade de aperfeiçoar os protocolos de congelamento do sêmen nesta espécie animal (PURDY et al., 2010).

A inseminação artificial cervical superficial em ovinos é uma técnica mais acessível aos produtores e pode apresentar índices reprodutivos elevados, quando utilizada com sêmen fresco. Na França, mais de um milhão de fêmeas são inseminadas anualmente com sêmen fresco diluído em leite desnatado para uso no período por no máximo 6 horas depois de diluído (ARAUJO, 2000). Contudo, esta técnica apresenta algumas limitações em razão da passagem do aplicador pela cérvix que é o principal obstáculo em ovelhas (SANTOS et al., 2009).

A inseminação artificial com sêmen congelado por via cervical é uma biotécnica reprodutiva pouco utilizada na espécie ovina. Um dos fatores demarcados é a baixa resistência do espermatozóide ovino ao processo de criopreservação, provocando uma redução na qualidade espermática após este procedimento (RABASSA et al., 2007), além da reduzida capacidade para ultrapassar a cérvix ovina. (EVANS e MAXWELL, 1987; NAQVI et al., 2001; KAABI et al., 2006).

A cérvix ovina é tubular, longa, fibrosa, composta predominantemente por tecido conectivo com uma camada externa serosa e um epitélio luminal convoluto e tortuoso, devido à presença de três a sete anéis de tecido conjuntivo de quatro a sete cm de comprimento, com pequena abertura e dispostos em diferentes planos e posições, dificultando a inseminação artificial (NAQVI et al., 2001; KERSHAW et al., 2005; NAQVI et al., 2005).

Para vencer a barreira cervical e viabilizar a utilização de sêmen congelado, obtendo uma maior taxa de fecundação na fêmea ovina, foi desenvolvida a técnica de inseminação artificial por laparoscopia (KILLEN & CAFFERY, 1982) e a técnica de inseminação artificial trans/cervical pelo sistema Guelph (HALBERT et al., 1990) com tração cervical, a qual teria maior aplicabilidade por ser um método não cirúrgico. Entretanto, a pipeta de inseminação e a utilização de pinça para efetuar o tracionamento da cérvix podem provocar lesões, tornando-se um dos principais fatores limitantes desta técnica (HALBERT et al., 1990; REBASSA et al., 2007).

A inseminação artificial tem importante contribuição para a produção animal na atualidade. Um ejaculado de um reprodutor geneticamente superior pode ser utilizado para fertilizar várias fêmeas e maximizar a distribuição dos genes favoráveis. O sucesso da criopreservação do sêmen aumenta as vantagens da inseminação artificial em relação à monta natural, além disso, a conservação do sêmen por longo período facilita o transporte para locais mais distantes, permitindo assim o uso de germoplasma superior, mesmo após a morte do reprodutor. Contudo, em muitos mamíferos a eficiência na criopreservação do sêmen não se torna realidade devido ao grande número de espermatozoides que sofrem injúrias durante o processo de congelamento e descongelamento (BAILEY et al., 2000).

O aperfeiçoamento de um protocolo de congelamento de sêmen pode tornar mais eficiente a estabilização da membrana plasmática do espermatozoide durante o processo de criopreservação, favorecendo a manutenção das várias funções espermáticas e, conseqüentemente, viabilizando o uso da inseminação cervical com sêmen congelado na espécie ovina. (SÁNCHEZ-PARTIDA et al., 1999).

Este estudo teve como objetivo avaliar a eficiência de um protocolo de congelamento de sêmen ovino, por meio das técnicas de inseminação cervical e laparoscópica em duas propriedades no Norte do Estado do Ceará.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Local do Experimento

O experimento foi realizado em duas propriedades da região Norte do Estado do Ceará. A fazenda 1, pertencente à Embrapa Caprinos e Ovinos, fica localizada na estrada Sobral/Groaíras, Km 04, situada sob as coordenadas, 3° 42' de Latitude Sul e 40° 21' de Longitude Oeste, na zona fisiográfica do sertão cearense, em uma altitude de 83 metros ao nível do mar. O clima característico daquela região é do tipo AW de savana segundo a classificação climática de Koppen. A temperatura média anual é de 28 °C, situando-se a máxima e a mínima, em torno de 35°C e 22°C, respectivamente. A umidade relativa do ar é de 60% (RELATÓRIO TÉCNICO ANUAL DO CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE CAPRINOS, 1989). A fazenda 2 está localizada no município de Santa Quitéria na região Centro-Norte do Estado do Ceará, situada sob a Latitude 04° 19' Sul, Longitude. 40° 09' Oeste. O clima da região é classificado como semiárido, com temperatura anual média variando de 21 °C a 32 °C. A pluviometria média anual é de 804 mm (WIKIMAPIA, 2010).

### 2. Animais experimentais

Na fazenda 1 foram utilizadas 61 ovelhas mestiças de Santa Inês, com idade variando de 1 ano e meio a 5 anos, os animais foram distribuídos em 2 lotes, levando em consideração a ordem de parto e a condição corporal. Ao longo do período experimental, foram mantidos em caatinga nativa, suplementados com 2 kg de silagem mista de sorgo e milho e 300g concentrado energético/animal/dia (*flushing*), sal mineral e água a vontade, por um período de três semanas antes de serem realizadas as inseminações.

Composição da suplementação (*flushing*): 20% de farelo de soja, 77% de milho em grão triturado, 2% de sal mineral e 1% de calcário calcítico.



Na fazenda 2 foram utilizadas 51 fêmeas da raça Santa Inês, com 1 a 9 anos de idade, dividida em 2 lotes, também, de acordo com a ordem de parto e condição corporal, para formar grupos homogêneos. Durante o período experimental, foram mantidas em caatinga nativa, suplementada com 1 kg silagem de sorgo e 400 g de concentrado energético/animal/dia (*flushing*), sal mineral e água a vontade, por um período de três semanas antes e outras três semanas após as inseminações.

Composição da suplementação (*flushing*): o concentrado apresentava a seguinte composição: 72% de milho, 23% de farelo de soja, 3% de óleo de soja, 1,5% de calcário, 0,5% de sal mineral.

### **3. Tratamento Hormonal**

Para a sincronização de estro foram utilizadas esponjas vaginais impregnadas com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona- MAP (Progespon, Tecnopec, São Paulo) por um período de 14 dias e aplicação de 300UI de gonadotrofina coriônica equina- eCG (Folligon 5000 UI, Intervet, Holanda), via intra-muscular, no mesmo dia da retirada da esponja.

### **4. Congelação do sêmen**

Foram coletados três ejaculados de um reprodutor Santa Inês através de vagina artificial do modelo francês (IMV). Após a coleta foi feito um *pool* de ejaculados para a obtenção de um volume de sêmen suficiente para obter-se números de doses congeladas necessárias para inseminação artificial. As amostras foram mantidas em banho-maria à 32°C e avaliadas quanto ao volume, no copo coletor graduado; à motilidade e o vigor, pela avaliação subjetiva no microscópio óptico e à concentração espermática no espectrofotômetro.

Após a mensuração da concentração espermática do *pool* de sêmen, este foi diluído em 86,5 mL da solução base de TRIS ( 3,605 g do TRIS-hidroximetil aminometano, 1,488 g de ácido cítrico e 2,024 g frutose dissolvidas em 100 mL de água bidestilada) adicionada

de 10 mL de gema de ovo de galinha, 3,5 mL de glicerol, 100 UI de penicilina, 50mg de estreptomicina), adaptado de Evans e Maxweel (1987) usando-se uma concentração final de  $600 \times 10^6$  espermatozoides por mL. Em seguida, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL e congeladas a temperatura de  $-79^\circ\text{C}$ , no equipamento TK 3000, com programa P3S1, específico para ovinos. Quando atingida a temperatura de  $-79^\circ\text{C}$ , as palhetas foram transferidas para o botijão criogênico.

## **5. Inseminação artificial**

As inseminações foram feitas em tempo fixo, sem acompanhamento das manifestações de estro. Na fazenda 1, no mês de novembro de 2008, durante quatro dias, tendo sido inseminados aproximadamente 15 a 16 animais/dia, 31 animais por via cervical e 31 por via laparoscópica; Na fazenda 2, no mês de julho as inseminações foram realizadas em dois dias, sendo inseminados 26 animais por via cervical e 25 por via laparoscópica. O sêmen utilizado para os procedimentos foi proveniente de um único reprodutor e todos os grupos foram inseminados com três partidas diferentes de sêmen congelado. As inseminações foram concretizadas, em tempo fixo, entre 54 a 58 horas após a retirada da esponja. As doses inseminantes de 0,25 mL continham aproximadamente 150 milhões de espermatozóide e para serem utilizadas, as mesmas foram descongeladas em um recipiente contendo água a uma temperatura de  $37^\circ\text{C}$  por 20 segundos.

Para a inseminação por via cervical, os animais foram suspensos e contidos pelos membros pélvicos e, após a higienização da vulva, introduziu-se o espécúlo vaginal, para localização da cérvix e depositou-se a dose de sêmen nos anéis cervicais. Na inseminação por via laparoscópica, as fêmeas foram submetidas a um jejum hídrico e alimentar por um período de 24 horas antes do início do procedimento nos animais da fazenda 1 e 48 horas nos animais da fazenda 2. As ovelhas foram expostas em decúbito dorsal e contidas em uma maca em um ângulo de  $45$  a  $60^\circ\text{C}$  de cabeça para baixo, com as extremidades amarradas. Em cada animal foi aplicado um tranquilizante (Acepran), em seguida, procedeu-se a tricotomia na região abdominal, e seguida de autoasepsia onde foi

aplicado um anestésico local. Com o uso de um trocar foram feitas duas perfurações paralelas no ventre, uma para introduzir primeiramente a lente do laparoscópio e a outra para introdução da pinça e da pipeta de inseminação. Após a localização do útero procedeu-se a inseminação no corno uterino com a dose inseminante já especificada acima. Em seguida os animais foram conduzidos tranquilamente para as baias.

## **6. Diagnóstico de Gestação**

Após 75 dias da realização das inseminações nas duas fazendas foram consolidados os diagnósticos por ecografia transabdominal, utilizando o aparelho SALCOVET com probe 3.5/ R40.

## **7. Análise Estatística**

Após serem realizadas as análises descritivas, as taxas de gestação foram comparadas dentro e entre fazendas pelo teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) adotando-se o nível de significância de 5%. Para verificar o efeito das variáveis, ordem de parto e escore corporal sobre o tipo de inseminação artificial em cada fazenda foi realizada análise de variância, com aplicação do teste t de student, onde os efeitos foram avaliados pelo procedimento GLM do Pacote Estatístico do Programa Systat versão 7.0 (USA)

## RESULTADOS

Para ambas as técnicas de inseminação artificial com sêmen congelado, avaliadas neste estudo, o maior número de resultados positivos após o diagnóstico de gestação aos 75 dias foi observado quando se empregou a técnica de inseminação artificial por via laparoscópica, como pode ser observado na Tabela 1.

Não houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) quanto a técnica de inseminação artificial utilizada entre as fazendas experimentais. No entanto, a inseminação realizada por laparoscopia apresentou resultados de fertilidade superiores ( $P < 0,05$ ) aos obtidos por via cervical. A percentagem de ovelhas paridas se manteve de acordo com o diagnóstico de gestação aos 75 dias.

**Tabela 1.** Taxa de prenhez em ovelhas Santa Inês inseminadas por via cervical e laparoscópica em duas fazendas diferentes

FAZENDA	TÉCNICA	N	DIAG. GEST. N°(%)	PARTO
1	CERVICAL	30	3 (10) <sup>a</sup>	3 (10) <sup>a</sup>
	LAPAROSCOPIA	31	15 (48) <sup>b</sup>	15 (48) <sup>b</sup>
2	CERVICAL	26	1 (3,8) <sup>a</sup>	1 (3,8) <sup>a</sup>
	LAPAROSCOPIA	25	11 (44) <sup>b</sup>	11 (44) <sup>b</sup>
		<b>112</b>	<b>7,5 (26,4%)</b>	<b>7,5 (26,4%)</b>

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ( $P < 0,05$ )

Na tabela 2 estão as médias e os desvios padrões da ordem de parto(OP) e escore de condição corporal (ECC) das ovelhas inseminadas pertencentes ao rebanho de duas propriedades em função do tipo de inseminação artificial. As análises mostram que não houve efeito da OP e ECC para inseminação artificial cervical em ambas as fazendas. Porém, na fazenda 2, a técnica de laparoscopia sofreu influência da OP e do ECC ( $P < 0,05$ ).

De fato verificou-se que as fêmeas que emprenharam por laparoscopia apresentavam em média melhores escores corporais, fato este que não aconteceu na IA cervical. Houve interação significativa ( $P < 0,05$ ) entre o tipo de IA e a OP, bem como o tipo de IA e o EC na fazenda 2.

**Tabela 2.** Média e desvio padrão do escore de condição corporal e da ordem de parto (OP) das ovelhas inseminadas por via cervical e laparoscópica em cada fazenda.

FAZENDA	TÉCNICA DE IA N°	VARIÁVEIS	MÉDIAS ± DP	PROBABILIDADE
1	CERVICAL 30	OP	3,2 ± 1,5 <sup>a</sup>	0,906
		ECC	2,1 ± 0,36 <sup>a</sup>	0,626
	LAPAROSCOPIA 31	OP	2,8±1,7 <sup>a</sup>	0,628
		ECC	2,4±0,63 <sup>a</sup>	0,125
2	CERVICAL 26	OP	2,6±2,1 <sup>a</sup>	0,788
		ECC	2,5±0,49 <sup>a</sup>	0,345
	LAPAROSCOPIA 25	OP	2,7±2,5 <sup>b</sup>	0,031
		ECC	2,3±0,49 <sup>b</sup>	0,021

N: Número de animais em cada técnica de inseminação artificial

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste t de student (P<0,05)

## DISCUSSÃO

A biotécnica de inseminação artificial com sêmen congelado não foi adotada devido amplamente a baixa taxa de fertilidade geralmente, resultante da inseminação cervical e o alto custo da inseminação laparoscópica (SANCHÉZ-PARTIDA et al., 1999).

O presente estudo procurou comparar a taxa de gestação de ovelhas Santa Inês utilizando duas técnicas de inseminação artificial com sêmen congelado a uma temperatura de -79 °C no diluidor TRIS com 10% de gema de galinha caipira em duas fazendas no Norte do estado do Ceará.

Neste trabalho a taxa de gestação após a inseminação cervical com sêmen congelado na fazenda 1 foi de 10% e na fazenda 2 de 3,8% sendo consideravelmente ( $P < 0,05$ ) inferior às inseminações por laparoscopia que apresentaram taxa de gestação de 48% e 44% na fazenda 1 e 2, respectivamente. Hiwasa et al. (2009) testando três métodos de inseminação artificial em ovelhas obtiveram uma percentagem de fertilidade de 25,5% com inseminação cervical usando sêmen fresco, 3,5% com sêmen congelado e 81% com inseminação por laparoscopia com sêmen congelado.

Estes autores utilizaram dose de sêmen com  $100 \times 10^6$  espermatozóides, enquanto que no estudo atual foram utilizadas doses de  $150 \times 10^6$  espermatozóides. Hiwasa et al. (2009) sugerem uma concentração espermática mais elevada, especialmente com sêmen congelado por ser necessário um grande número de espermatozóides para penetrar o canal cervical e atingir o local de fertilização no oviduto. Estudos revelam que o processo de criopreservação do sêmen reduz a qualidade espermática dificultando sua passagem pela cérvix e seu transporte pelo sistema reprodutor da fêmea (GUSTAFSSON, 1978; BAILEY ET AL., 2000; SALAMON E MAXWELL, 2000; KAABI et al., 2006; REBASSA et al., 2007). No entanto D' Alessandro, et al. (2001) constataram que o incremento da dose inseminante para  $160 \times 10^6$  espermatozóides no diluidor leite desnatado reduziu a taxa de parição de ovelhas inseminadas por laparoscopia. Doses de sêmen com 20 a  $40 \times 10^6$  de espermatozóides seriam mais aplicáveis quando usados em

inseminação laparoscópica. Sánchez-partida et al. (1999) trabalhando com ovelhas Merino, obtiveram uma fertilidade de 11,3 % após inseminação com dose inseminante de  $180 \times 10^6$  espermatozóides por via cervical. Emsen et al. (2008) sugere que a inseminação artificial com alta concentração espermática ou a utilização de duas inseminações podem elevar a taxa de parição e aumentar a prolificidade em ovinos.

Diversos são os fatores que influenciam na penetração da cérvix. Dentre eles podemos citar a ordem de parto, pois fêmeas múltiparas apresentam uma maior abertura cervical, enquanto que, fêmeas nulíparas apresentam uma maior resistência à passagem da pipeta (WINDOR, 1994; BUCKRELL ET AL., 1994). Neste experimento não foi constatado efeito da ordem de parto nas inseminações cervicais em nenhuma das fazendas.

Alguns estudos mostram que inseminação de fêmeas no estro natural é superior à das fêmeas em estro sincronizado (MILCZEWSKI et al 2000). Entretanto Danovan et al. (2004) não constaram esta diferença e sim que a experiência do inseminador contribuiria mais para um maior sucesso na inseminação cervical.

O uso da técnica da inseminação é justificado quando se utiliza sêmen de reprodutores superiores para melhorar a produtividade de um rebanho. Dziuk et al., (1972) compararam a fertilidade após monta natural, inseminação artificial com sêmen fresco e com sêmen congelado e obtiveram uma taxa de parição de 69% com monta natural, 48% após inseminação com sêmen fresco e apenas 13% com sêmen congelado reafirmando que a inseminação com sêmen fresco é superior a inseminação com sêmen congelado. O mesmo foi constatado por Santos et al. (2009) utilizando a técnica de inseminação artificial transcervical com sêmen fresco que alcançaram uma taxa de gestação de 75% em ovelhas Santa Inês enquanto, Rojero et al. (2009) obtiveram uma fertilidade de 50% em ovelhas Pelibuey com sêmen resfriado à 5 °C. Da mesma forma, Machado et al. (2006) obtiveram uma taxa de prenhez de 48% com sêmen resfriado no diluidor ACP-102, confirmando mais uma vez que a inseminação com sêmen ovino congelado apresenta limitação quando utilizado por via cervical. Donovan et al. (2004) também encontraram uma taxa de prenhez de 82 % após inseminação cervical com sêmen fresco e apenas 34% com sêmen congelado.

A inseminação artificial por laparoscopia neste experimento foi realizada entre 54 e 58 horas após o tratamento hormonal sem observação do estro. Gilberti et al. (2008) trabalhando com ovelhas Santa Inês inseminadas por laparoscopia com sêmen congelado encontraram a melhor taxa de gestação (57,1 %) com inseminações realizadas no intervalo de 48 a 60 horas, confirmando a redução da fertilidade após este intervalo.

Neste estudo a taxa de gestação nas ovelhas Santa Inês após inseminação por laparoscopia com sêmen congelado foi de 48% na fazenda 1 e 44% na fazenda 2 semelhante aos observadas por outros autores. Souza et al. (1994) encontraram taxa de gestação após inseminação por laparoscopia com sêmen congelado de 45%. Da mesma forma, Windsor et al. (1994) 48%. Obtiveram, entretanto, Correia Neto et al. (2006) conseguiram fertilidade ao parto de 43,16% e Rebassa et al. (2007) obtiveram 40% de taxa de gestação.

Na fazenda 2 a técnica de laparoscopia foi influenciada pelas diversificadas ordens de parto e escore corporal. Havendo, portanto, houve efeito fazenda quando foram comparados as técnicas de inseminação artificial. Provavelmente devido aos animais apresentarem ordem de parto e escore corporal com maior variação de valores, o que não foi observado na fazenda 1, refletindo nos resultados da inseminação por laparoscopia.

Animais com maior ordem de parto apresentam geralmente uma maior idade o que pode influenciar na fertilidade da fêmea ovina. Esta afirmação foi detectada em um estudo realizado por Purdy et al. (2010) onde constataram uma taxa de fertilidade maior em ovelhas com até 3 anos (50,7%) de idade quando comparadas com ovelhas entre 3 a 6 anos (9,6%) após inseminação artificial por laparoscopia com sêmen congelado no diluidor TRIS com 15% de gema de ovo. O mesmo foi ratificado por Dickerson e Glimp (1975) o qual demonstraram que o pico de fertilidade nas ovelhas foi influenciado principalmente pela, genética; existindo diferenças entre raças e idade, constatando que animais entre 3 a 4 anos apresentavam uma maior taxa de fertilidade. A fertilidade em ovelhas após inseminação artificial pode ser influenciada por vários fatores como raça, rebanho, idade, ordem de parto e escore corporal entre outros (HIWASA et al., 2009; PURDY et al., 2010). Por outro lado a qualidade do sêmen criopreservado pode ser afetada por fatores como a composição dos diluidores, a temperatura de congelamento e a



concentração espermática final (SALAMON e MAXWELL, 1995a; EL-ALAMY e FOOTE, 2001; D’ALESSANDRO et al., 2001; BAG et al., 2002). Sánchez-partida et al. (1999) verificaram que inseminações em ovelhas com sêmen congelado no diluidor TRIS por laparoscopia apresentava menor perda de embriões quando comparados aos diluidores TRIS e HEPES adicionados de aminoácidos.

Em condições extensivas, um baixo nível nutricional favorece as perdas reprodutivas que se devem a uma baixa taxa de prenhez e uma alta mortalidade perinatal de cordeiros (RIBEIRO et al., 2003). O uso do escore de condição corporal, como uma ferramenta tecnológica para monitorar o estado do nutricional dos animais, permite uma melhoria significativa na eficiência reprodutiva e produtiva, através do ajuste no manejo alimentar, pois o mesmo é específico em cada fase do ciclo reprodutivo-produtivo. Em adição, a função reprodutiva é uma das primeiras a sofrer com as situações de desequilíbrio nutricional, resultante de uma falha no ajuste do balanço entre a disponibilidade de nutrientes e seus requerimentos nutricionais pelos animais em reprodução (CEZAR e SOUZA, 2006).

Neste estudo a condição corporal influenciou os resultados da inseminação por laparoscopia na fazenda 2. A média do escore corporal nesta situação foi  $2,3 \pm 0,49$  inferior ao indicado por Ribeiro et al., (2003) que recomenda um escore de no mínimo 2,5 para se obter taxas de ovulações aceitáveis e que ovelhas com escore corporal de 3,0 a 4,0 apresentam os valores máximos de fertilidade. Milczewski et al. (2000) obtiveram 77,27% de taxa de prenhez em ovelhas com escore de condição corporal entre 3 e 4, inseminadas por via laparoscópica com sêmen refrigerado. A maioria das fêmeas inseminadas neste experimento exibiram escore de condição corporal entre 2 e 2,5, inferior aos trabalhos citados, e as inseminações foram feitas com sêmen congelado contribuindo com a menor fertilidade, devido aos danos espermáticos provocados durante o processamento do sêmen ovino, quando comparado com sêmen fresco e resfriado. O mesmo foi confirmado por Vinõles (2003) que constatou que ovelhas com baixa condição corporal não desenvolviam três ondas foliculares e apresentavam baixa concentração de FSH quando comparado com animais de alta condição corporal.

Estudo realizado na Austrália com uso da laparoscopia em 28447 ovelhas mostra resultados de prenhez de 75% em média (Hill et al.,1998), bem superiores aos obtidos no Brasil, contudo as condições de manejo sanitário e nutricional neste país são adequadas para obtenção de bons resultados.

## CONCLUSÕES

Os resultados encontrados neste estudo estão de acordo com as diversas pesquisas realizadas para incrementar a inseminação artificial na espécie ovina. Apesar da avaliação *in vitro* do sêmen congelado utilizado neste experimento ter sido satisfatória, esta não foi suficiente para elevar as taxas de gestação das fêmeas inseminadas por via cervical e laparoscópica. Fatores como a variação do escore corporal, idade dos animais inseminados, a região e a época em que foi realizada a pesquisa podem ter influenciado, negativamente os resultados, levando-se em consideração que estes animais eram explorados na caatinga em sistema semintensivo no Norte do Ceará. Há portanto necessidade, de melhorar as condições de alimentação, ambiente e manejo animal para obtenção de resultados satisfatórios.

Neste estudo demonstrou-se que a deposição do sêmen congelado mais próximo do local de fecundação, isto é, dentro do útero, possibilita melhores taxas de prenhez, mostrando claramente um efeito da técnica de laparoscopia quando se usa o sêmen congelado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, A. A. **Mise au point d'un dilueur de conservation en milieu liquide pour la semence ovine en vue de l'insémination artificielle.** 2000. 81p. Tese (Doutorado em Ciências da Vida) - Université François Rabelais de Tours, Tours.
- BAG,S.; JOSHI, A.; RAWAT, P. S.; MITTAL, J.P. Effect of initial freezing temperature on the semen characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa in a semi-arid tropical environment. **Small Rumin Research**, v.43, p.23-29, 2002.
- BAILEY,J.L.; BILODEAU,J-F.;CORMIER,N. Sêmen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomeneon. **Journal of Andrology**, v.21,n.1, 2000
- BUCKRELL, B.C.; BUSCHBECK, C.; GARTLEY, C. J.; et al. Further development of a transcervical technique for artificial insemination in sheep using previously frozen sêmen. **Theriogenology**, v. 42, p. 601-611, 1994
- CEZAR, M. F; SOUSA, W. H Avaliação e utilização da condição corporal como ferramenta de melhoria da reprodução e produção de ovinos e caprinos de corte. In: **43ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. Produção Animal em Biomas Tropicais. Anais dos Simpósios. Suplemento Especial da Revista Brasileira de Zootecnia. João Pessoa/ Paraíba, v.35, 2006.
- CORREIA NETO, J.; COSTA, A. N.; REIS, J. C. Parâmetros reprodutivos de ovelhas Santa Inês e suas cruzas com machos das raças dorper e somalis brasileira, obtidas por inseminação artificial laparoscópica com sêmen congelado. **Ciência veterinary tropical**, v.9, n<sup>os</sup>.2/3, p.63-73, 2006.
- D' ALESSANDRO, A.G. D.; MARTEMUCCI, G.; COLONNA, M.A.; BELLITTI,A. Post-thaw survival of ram spermatozoa and fertility after insemination as affected by preezing sperm concentration and extender composition. **Theriogenology**, v.55,p. 1159-1170, 2001.

- DICKERSON, G. E.; GLIMP, H. A. Breed and age effects on lamb production of ewes. **Journal of Animal Science**, v.40, p.397-408, 1975.
- DONOVAN, A.; HANRAHANA, J. P.; KUMMENB, E.; DUFFYC, P.; BOLAND, M. P. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen thawed semen at a natural or synchronized oestrus. **Animal Reproduction Science**, v.84, n<sup>os</sup>.3/4, p.359-368, 2004.
- DZIUK, J. P.; LEWIS, J. M.; GRAHAM, E. K.; MOYER, R. H. Comparison between natural service and artificial insemination with fresh or frozen sperm at an appointed time in the ewe. **Journal of Animal Science**, v.35, p.572-575, 1972.
- EL-ALAMY, M. e FOOTE, R. H. Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 65, p. 245-254, 2001.
- EMSEN, E.; GEMENEZ DIAZ, C. A.; YAPRAK, M.; KOYCEGIZ, F.; KUTLUCA, M.; ASLAN, F. A. Factors affecting reproductive performance of fat-tailed ewes inseminated with laparoscopy in the late breeding season. **Animal Reproduction Science**, v.5, n.1/2, p.30-33, 2008.
- EVANS, G.; MAXWELL, W. **Salamon's artificial insemination of sheep and goats**. Butterworth, Sydney, p.194. 1987.
- GILBERTI, M.; MONREAL, A. C. D. Identificação do intervalo de tempo fixo para o emprego da inseminação artificial laparoscópica com sêmen congelado em ovelhas Santa Inês. **Agrarian**, v.1, n.2, p.123-132, 2008.
- GUSTAFSON, B. K. Asoects of fertility with frozen thawed ram semen. **Criobiology**, v.15, p.358-361, 1978.
- HALBERT, G. W.; DOBSON, H.; WALTON, J. S.; BUCKRELL, B. C. A technique for transcervical intrauterine insemination ewes. **Theriogenology**, v.33, n.5, p995-1010, 1990.

- HILL, J. R.; THOMPSON, J. R.; PERKINS, N. R. Factors affecting pregnancy rates following laparoscopic insemination of 28, 447 Merino ewes under commercial conditions. **Theriogenology**, v.48, p.697-709, 1998.
- HIWASA, M.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; OKABE, K.; FUKUI, Y. Fertility after different artificial insemination methods using a synthetic semen extender in sheep. **Journal of Reproduction and Development**, v.55, n.1, 2009.
- KAABI, M.; et al. Influence of breed and age on morphometry and depth of insemination catheter penetration in the ewe cervix: A postmortem study. **Theriogenology**, v. 66, p. 1876-1883, 2006
- KERSHAW, C. M.; KHALID, M.; MCGOWAN, M.R.; et al. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. **Theriogenology**, v. 64, p. 1225-1235, 2005
- KILLEEN, I.D.; CAFFERY, G.J. Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. **Australian Veterinary Journal**, v. 59, 1982
- MACHADO, V. P.; NUNES, J. F.; ARAÚJO, A. A.; FERNANDÈZ, D. R. P.; CORDEIRO, M. A.; MEDEIROS, C. H. N.; MEDEIROS, A. L. N.; MONTEIRO, A. W. U. Fertilidade após a inseminação artificial intracervical ou laparoscópica intra-uterina de ovelhas utilizando diluidores à base de água de coco. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p. 43-49, 2006.
- MILCZEWSKI, V.; KOZICKI, L. E.; LUZ, S. L. N.; NEVES, J. P. Inseminação artificial intrauterina e cervical em ovelhas utilizando sêmen refrigerado. **Archives of Veterinary Science**, v.5, p.35-39, 2000.
- MORAES, C. N., et al. Criopreservação do sêmen ovino em *pellets* com etileno glicol. **Ciência Rural**, v. 28, n. 2, 1998.
- NAQVI, S.M.K.; et al. Evaluation of gross anatomical features of cervix of tropical sheep using cervical silicone moulds. **Animal Reproduction Science**, v. 85, p. 337-344, 2005.

NAQVI, S. M. K.; JOSHI, A.; DAS, G. K.; MITTAL, J. P. Development and application of ovine reproductive technologies: an Indian experience. **Small Ruminant Research**, v.39, p.199-208, 2001.

PURDY, P. H.; MOCÉ, E.; STOBART, R.; MURDOCH, W. J.; MOSS, G. E.; LARSON, B.; RAMSEY, S.; GRAHAM, J. K.; BLACKBURN, H. D. The fertility of ram sperm held for 24 h at 5 prior to cryopreservation. **Animal reproduction Science**, v.118, p. 231-235, 2010.

RABASSA, V. R.; TABELÃO, V. C.; PFEIFER, L. F. M.; SCHNEIDER, A.; ZIGUER, E. A.; SCHOSSLER, E.; SEVERO, N. C.; DEL PINO, F. A. B.; CORRÊA, M. N. Efeito das técnicas transcervical e laparoscópica sobre a taxa de prenhez de ovelhas inseminadas em tempo-fixo. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, n.1, p. 127-133, 2007.

RELATÓRIO TÉCNICO ANUAL DO CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE CAPRINO 1982-1986. Sobral: EMBRAPA-CNPC, 1989. 284p.

RIBEIRO, L. A. O.; FONTANA, C. S.; WALD, V. B.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Relação entre a condição corporal e a idade das ovelhas no encarneamento com a prenhez. **Ciência Rural**, v.33, n.2, p.357-361, 2003.

ROJERO, R. D. M.; REYNA-SANTAMARIA, L.; MICHEL-ACEVES, A. C.; MASTACHE-LAGUNAS, A. A.; HERNANDEZ-IGNACIO, J.; ROJAS-MAYA, S. Cervical or intrauterine artificial insemination in Pelibuey ewes, with chilled semen. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, n.8, v.12, p. 2621-2625, 2009.

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

SALAMOM, S.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v.37, p. 185-249, 1995a.

SALAMOM, S.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v.38, p. 1-36, 1995b.

SÁNCHEZ-PARTIDA, L. G.; WINDSOR, D.; EPPLESTON, J.; SETCHELL, B. P.; MAXWELL, W. M. C. Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. **Journal of Andrology**, v.20, n.2, p. 280-288, 1999.

SANTOS, A. D. F.; SANTOS, D. C.; CONCEIÇÃO, J. C.; CARVALHO, A. L. C.; LISBOA, M. L. O. Taxa da gestação em fêmeas Santa Inês inseminadas pela via transcervical com semen fresco associada ou não à anestesia epidural. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, v.10, n.1, p.224-230, 2009.

SOUZA, M. I. L.; LUZ, S. L. N.; GONCALVES, P. B. D.; NEVES, J. P. Inseminação transcervical com sêmen congelado em ovinos. **Ciência rural**, v.24, n.3, p.597-602, 1994.

WIKIMAPIA, disponível org/6027859/pt/ Sant- Quit. Acessado em 29 de julho de 2010.

WINDSOR, D. P.; SZÉLL, A. Z.; BUSCHBECK, C.; EDWARD, A. Y.; MILTON, J. T. B.; BUCKRELL, B. C. Transcervical artificial insemination of Australian merino ewes with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, n.42, p.147-157, 1994.

VINÔLES, C. **Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe**. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 2003. 56. Tese (Doutorado). Swedish University of Agricultural Sciences, 2003.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo apontam o protocolo de sêmen constituído pelo diluidor TRIS, na temperatura de congelação de  $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$  e concentração final de  $600 \times 10^6$  espermatozóides/mL foi o que melhor proporcionou criopreservação dos parâmetros de motilidade do sêmen ovino da raça Santa Inês congelado em equipamento TK 3000.

Com relação a utilização da gema de ovo das duas espécies aviárias testadas e sua taxa de adição (10 e 20%) ao diluidor TRIS, a gema de ovo de galinha na proporção de 10% proporcionou melhor ação crioprotetora para os espermatozóides de ovinos durante os processos de congelação e descongelação, em termo de viabilidade e motilidade progressiva. Por outro lado, apesar da gema de ovo de codorna ter apresentado resultados inferiores aos observados com gema de galinha caipira, os mesmos foram satisfatórios, podendo através de mais estudos *in vitro* e avaliações *in vivo*, esta ser uma possível substituta da gema de ovo de galinha.

Apesar da avaliação *in vitro* do sêmen congelado utilizado neste experimento ter sido satisfatória, esta não foi suficiente para elevar as taxas de gestação das fêmeas inseminadas por via cervical e laparoscópica. Provavelmente fatores como a variação do escore corporal, idade dos animais inseminados, a região e a época em que foi realizada a pesquisa influenciaram negativamente os resultados, já que, estes animais eram explorados na caatinga em sistema semintensivo no Norte do Ceará. Há necessidade, portanto, de se melhorar as condições de alimentação, ambiente e manejo animal para obtenção de melhores resultados.

Provavelmente mais estudos sejam necessários sobre a membrana plasmática do espermatozóide de ovinos para que seja possível testar outras substâncias no diluidor de sêmen visando a melhoria da estabilidade da célula espermática criopreservada. Da mesma forma, a seleção de fêmeas saudáveis, com escore corporal satisfatórios (entre 3 e 4), que estejam na faixa etária de 2 a 3 anos e exploradas em um sistema de produção favorável é imprescindível para a obtenção de elevadas taxas de fertilidade com a inseminação artificial utilizando sêmen congelado na espécie ovina.