



EFEITO DO DILUIDOR E DA TEMPERATURA DE CONGELAÇÃO SOBRE O SÊMEN CONGELADO DE OVINO DA RAÇA SANTA INÊS¹

Fátima Revia Granja Lima², Airton Alencar de Araujo³, Diônes Oliveira Santos⁴, Olivardo Facó⁴, Ítalo Cordeiro Silva Lima⁵, Marco Antonio Basílio Linard⁵, Katiane Queiroz da Silva⁶

¹Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor.

²Doutoranda em Zootecnia – PDZ/UFC. Bolsista da FUNCAP. E-mail: reviagranja@yahoo.com.br (autor para correspondência)

³Professor do Programa de Pós-graduação em Zootecnia - UFC;

⁴Pesquisador da Embrapa Caprino - CNPC;

⁵Estudante de Graduação em Zootecnia – UFC;

⁶Mestranda do Programa de Pós-graduação em Zootecnia – UFC.

Resumo: Objetivou-se verificar a influência do tipo de diluidor e da temperatura sobre motilidade do sêmen ovino. A coleta do sêmen foi efetuada uma vez por semana em cinco ovinos da raça Santa Inês, após feito um pool dos ejaculados e avaliado quanto ao volume, à motilidade, vigor, concentração e diluído no Leite e Tris. As amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 ml e congeladas em três temperaturas (-79° C, -90° C, -120° C) no equipamento TK 3000. Quando atingida a primeira temperatura, um grupo de palhetas foi transferido para o botijão criogênico e assim sucessivamente, para às demais temperaturas testadas. Após 30 dias, as palhetas foram descongeladas e o sêmen avaliado pelo método CASA. Procedeu-se a ANOVA para testar o efeito da temperatura de congelação sobre os diluidores. Para o diluidor leite, a motilidade progressiva e a percentagem de espermatozóide rápidos diferiu significativamente para temperatura de -79° C em relação às de -90° C e -120° C. No diluidor Tris não houve diferença significativa entre as temperaturas de congelação, entretanto foi significativo e superior ao diluidor a base leite em todas as temperaturas testadas. O diluidor Tris e a temperatura de congelação de -79° C mostraram ser o protocolo de congelação mais apropriado para sêmen de carneiros Santa Inês, entretanto estudos utilizando a inseminação artificial precisam ser conduzidos para validar sua qualidade.

Palavras-chave: carneiro, congelação, diluidor, temperatura, sêmen.

Abstract : This study aimed to verify the influence of the temperature and the extender type on the motility of ram semen. The semen was collected a time per week in five “Santa Inês” ram, after it was made one pool of the ejaculated and evaluated how much to the volume, motility, vigor, concentration and diluted with Milk and Tris. The samples were stored in straw of 0,25 mL to be frozen in three temperatures (-79°C, -90°C, -120°C) employing the TK 3000 equipment. When reached the first temperature, a group of straws was transferred to the cryogenic container and thus successively, for the others tested temperatures. After 30 days, the straws had been thawed and the semen evaluated for the CASA method. It was used the ANOVA to test the effect of the temperature of freezing on the extenders. For the Milk, the progressive motility and the fast spermatozoid percentage for the temperature of -79°C differed significantly when compared to the temperatures of -90°C and -120°C. In the extender Tris did not have significant difference between the temperatures of freezing, however it was significant and superior to the extender milk in all tested temperatures. The extender Tris and the freezing temperature of -79°C showed to be the more appropriate freezing protocol for “Santa Inês” ram semen. However more studies using the artificial insemination need to be lead to validate its quality

Keywords: ram, freezing, extender, temperature, semen

Introdução

Os recentes avanços na tecnologia da reprodução assistida têm aberto uma nova perspectiva na conservação do sêmen (Yoshida, 2000). A combinação da temperatura de conservação, taxa de congelação, composição química do diluidor, concentração do crioprotetor e do controle higiênico na manipulação do sêmen são fatores que afetam a sobrevivência do espermatozóide congelado. Com o conhecimento dos eventos provocados pelas injúrias da criopreservação pode-se prevenir, retardar ou até mesmo reverter às mudanças na membrana espermática e melhorar a eficiência da inseminação artificial em ovinos (Maxwell & Watson, 1996). A interação entre diluidor e temperatura pode influenciar, positiva ou negativamente, a conservação do sêmen ovino congelado (D’Alessandro et al., 2001; Bag et al., 2002). Necessita-se, portanto, investigar esses fatores a fim de viabilizar o uso da inseminação por via cervical com sêmen congelado e desenvolver um protocolo de congelação, bem como uma técnica de inseminação

artificial que possa ser aplicada nas raças ovinas deslanadas do Nordeste e obter taxas de concepção mais satisfatórias. O objetivo deste estudo foi verificar a influência dos tipos de diluidores e das temperaturas de congelação sobre as características de motilidade do sêmen congelado de ovino.

Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Andrologia, Tecnologia do Sêmen e Inseminação Artificial (LATSIA), da Embrapa caprinos, localizado na estrada Sobral/Groaíras. Foram utilizados cinco reprodutores ovinos da raça Santa Inês com idade média de $31,2 \pm 10,7$ meses, mantidos em regime intensivo recebendo capim-elefante picado e 500g de um concentrado comercial, sal mineral e água *ad libidum*. O sêmen foi coletado uma vez por semana, durante seis semanas, usando vagina artificial. Após a coleta foi feito um pool de ejaculados para suprimir o efeito individual e obtenção de um volume de sêmen suficiente para serem testados os protocolos de congelação. Em seguida, as amostras foram mantidas em banho-maria a 32°C e avaliadas quanto ao volume, a motilidade, o vigor e à concentração espermática. Após a mensuração da concentração espermática do pool de sêmen em espectrofotômetro, este foi diluído em dois diluidores: um diluidor com 91,5% de leite desnatado, marca Molico, 5% de gema de ovo de galinha caipira e 3,5% de glicerol e outro contendo 76,5% de Tris, 20% de gema de ovo de galinha caipira e 3,5% de glicerol. As amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 ml para serem congeladas em três temperaturas (-79°C, -90°C, -120°C) no equipamento TK 3000, com programa P3S1 específico para ovinos. Quando atingida a primeira temperatura de -79°C, o primeiro grupo de palhetas foi transferido para o botijão criogênico para serem conservadas em nitrogênio líquido a -196°C, e assim sucessivamente, para as demais temperaturas. Após 30 dias de congelação foi procedida à descongelação das palhetas para análise das características de motilidade, método Computer Assisted Sêmen Analysis (CASA) realizadas no laboratório de tecnologia do sêmen caprino e ovino da Universidade Estadual do Ceará. O experimento foi conduzido em blocos casualizados. Procedeu-se ao estudo da ANOVA para testar o efeito da temperatura de congelação sobre os diluidores testados. As médias foram comparadas pelo teste t-student com probabilidade de 5% de erro. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS v. 6.11 (1996).

Resultados e Discussão

Para o diluidor a base de leite a motilidade progressiva do espermatozóide diferiu significativamente ($p < 0,05$) a temperatura de -79°C em relação às de -90°C e -120°C (Tabela 1). 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. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as temperaturas de congelação no diluidor Tris, porém observou-se melhor resultado a -79°C, entretanto este diluidor foi superior ($p < 0,05$) ao diluidor Leite nas diferentes temperaturas. Resultados diferentes foram observados por D' Alessandro et al. (2001) em que o diluidor Leite desnatado apresentou a melhor avaliação *in vitro* comparada ao Tris.

Tabela 1. Comparações de médias da motilidade progressiva do espermatozóide com diferentes diluidores e temperaturas de congelação.

Diluidor	Temperatura		
	-79°C	-90°C	-120°C
LEITE	8,00 ^{ab}	3,12 ^{bc}	5,49 ^{bc}
5TRIS	15,46 ^{aA}	13,23 ^{aA}	13,61 ^{aA}

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 ($P < 0,05$).

A percentagem de espermatozóides rápidos com diluidor Leite, a temperatura de -79°C foi significativo ($P < 0,05$) em relação as demais temperaturas. Já as temperaturas de -90°C e -120°C não diferiram ($p > 0,05$) (Tabela 2). Diferentemente dos resultados encontrados por Bag et al. (2002) em que a temperatura de congelação de -125°C comparado a de -25°C e -75°C conferiu uma melhor qualidade de criopreservação para o sêmen de carneiro congelado no diluidor Tes- gema, a -125°C com melhor percentagem de células móveis e espermatozóides normais. No diluidor Tris, as diferentes temperaturas de congelação não diferiram ($p > 0,05$) entre si. A diferença encontrada no experimento possivelmente seja devido a composição dos diluidores serem diferentes. Entre os diluidores, observou-se uma variação significativa ($p < 0,05$) em todas as temperaturas de congelação e os melhores resultados obtidos com o Tris. El-Alamy et al. (2001) constataram que o diluidor Tris-gema foi superior a outros diluidores, exceto

para o leite na proteção da célula espermática durante o processo de congelamento e descongelamento. Resultado diferente foi observado neste estudo com o diluidor Leite.

Tabela 2. Percentagem de espermatozoides rápidos com diferentes diluidores e temperaturas de congelamento.

Diluidor	Temperatura		
	-79°C	-90°C	-120°C
LEITE	9,12 ^{ab}	5,86 ^{bc}	5,58 ^{bc}
TRIS	22,52 ^{aA}	17,28 ^{aA}	16,92 ^{aA}

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 ($p < 0,05$).

Conclusões

O diluidor Tris a -79° C apresentou um melhor protocolo para conservação do sêmen ovino na máquina de congelamento TK 3000. Entretanto, mais estudos utilizando este sêmen na Inseminação artificial precisam ser conduzidos para validar sua qualidade.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Andrologia, Tecnologia do Sêmen e Inseminação Artificial da Embrapa/cnpc, ao Laboratório de Tecnologia do Sêmen da Universidade Estadual do Ceará/UECE e a Fundação Cearense de Apoio a Pesquisa / FUNCAP pela concessão da bolsa de Doutorado e a empresa Integral-mix pela doação da ração para os animais do experimento.

Literatura citada

- ALESSANDRO, A. G. D.; 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.
- 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, 2002.
- 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, n.2, p. 277-285, 1975.
- EL-ALAMY, M. A.; FOOTE, R. H. Freezability of spermatozoa Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. *Animal Reproduction Science*, v. 65, p. 245-254, 2001.
- MAXWELL, W. M. C.; WATSON, P. F. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v. 42, p.55-65, 1996.
- YOSHIDA, M. Conservation of sperms:current status and new trends. *Animal Reproduction Science*, v. 60, p. 349-355, 2000.