

## VIABILIDADE DO SÊMEN OVINO REFRIGERADO EM DIFERENTES DILUENTES (Viability of ovine semen cooled in different extenders)

MILCZEWSKI, V.<sup>1</sup>; KOZICKI, L.E.<sup>2</sup>; NEVES, J.P.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – UFPR;

<sup>2</sup>Departamento de Medicina Veterinária – UFPR;

<sup>3</sup>Departamento de Reprodução Animal – UFSM.

**RESUMO** – O presente trabalho objetivou comparar a eficiência *in vitro* de 6 diluentes na conservação de sêmen ovino à temperatura de 5°C por 8 horas. Foram utilizados 3 carneiros da raça Suffolk e constituídos 23 homogeneizados de sêmen. Cada homogeneizado era dividido em 6 alíquotas, nas quais cresciam-se os diluentes: “Cornell University Extender” (CUE), “Cornell University 16” (CU-16), glicina-gema (GG), citrato-gema (CG), TRIS-gema (TG) e leite desnatado UHT-gema (LG). O sêmen foi refrigerado através da redução da temperatura de 30°C para 5°C em 120 minutos, em caixa de poliestireno expandido contendo gelo. Após 8 horas de refrigeração o sêmen diluído foi submetido a análise de turbilhamento, motilidade progressiva, vigor, morfologia espermática, e ao teste de termo-resistência (TT) a 38°C por 4 horas. Considerando os valores transformados de motilidade progressiva, turbilhamento e vigor pelo modelo estatístico de Componentes Principais, o diluente CG apresentou resultados superiores. Os diluentes CUE, CU-16, TG e LG não diferiram entre si e o GG foi inferior ( $P<0,05$ ) aos demais. Igualmente, no TT o CG apresentou resultados superiores, concluindo o teste com 50% de motilidade progressiva média, enquanto que os diluentes GG e LG demonstraram motilidade progressiva próxima a zero ao final do teste. Houve aumento significativo de caudas enroladas em todas as amostras de sêmen refrigerado, exceto nas com GG. Ao se analisar em todas as características estudadas *in vitro*, verificou-se que o diluente CG apresentou melhor preservabilidade do sêmen refrigerado de carneiro, seguido pelo CUE.

**Palavras chave:** ovinos, sêmen refrigerado, diluentes.

**ABSTRACT** – The aim of this work was to compare *in vitro* efficiency of 6 extenders in the conservation of ram semen at 5°C for 8 hours. Twenty-three pooled ejaculates, from 3 Suffolk rams, were diluted in 6 extenders: Cornell University Extender (CUE), Cornell University – 16 (CU-16), glycine-yolk, citrate-yolk, TRIS-yolk and UHT skim milk-yolk. After 1+3 dilution at 30°C, the semen samples were cooled during 120 minutes until reach 5°C. After 8 hours at 5°C analysis of progressive motility, vigor, wave motion, morphology of spermatozoa and thermoresistance test (TT) for 4 hours, were performed. The citrate-yolk extender displayed the best results. CUE, CU-16, TRIS-yolk and UHT skim milk-yolk extenders did not demonstrate differences, but glycine-yolk extended semen results were significantly inferior ( $P<0,05$ ). During TT, citrate-yolk extended semen demonstrated the best results ( $P<0,05$ ), finishing the test with the average of 50% of progressive motility. When glycine-yolk and UHT skim milk-yolk extenders were used progressive motility was near zero at the end of the test. There were significant increase rates of bent tail in all cooled samples, except in glycine-yolk. When all characteristics studied *in vitro* were analyzed, the citrate-yolk extender showed the best semen preservability followed by CUE.

**Key words:** sheep, cooled semen, extenders.

### Introdução

Muitos trabalhos têm sido realizados na tentativa de melhorar a capacidade fertilizante do sêmen ovino congelado e refrigerado que ainda apresentam resultados insatisfatórios quando utilizado *in vivo*. Após a diluição e refrigeração ocorrem danos provocados nas células espermáticas que reduzem a motilidade e rompem a integridade das membranas dos espermatozoides. Estas alterações interferem significativamente na

sobrevivência e capacidade fecundante dos espermatozoides (MARTIN, 1968; MAXWELL e WATSON, 1996). Com o objetivo de encontrar um diluente com maior capacidade preservadora, diversas fórmulas têm sido propostas para sua conservação quando mantido a 5°C. Dentre os diluentes naturais destaca-se o leite de vaca utilizado na forma integral, desnatado, reconstituído e mais comumente ultrapasteurizado (EVANS e MAXWELL, 1987). Os diluentes sintéticos contêm TRIS ou citrato como tampões, glicose ou frutose como fonte de energia e gema de ovo contra choques térmicos. PETRUZZI *et al.* (1976), observaram que o TRIS e citrato foram

superiores aos diluentes a base de leite após 24 horas de armazenamento a 5°C. Desde 1961, SCHINDLER e AMIR relatavam que a glicina acrescida nos diluentes promovia um benefício na longevidade dos espermatozoides. BUTSWAT *et al.* (1992), utilizando o diluente CUE que contém glicina em sua formulação, obtiveram 80% e 6% de espermatozoides móveis no 1º e 8º dia respectivamente de conservação do sêmen ovino. O objetivo deste experimento foi comparar *in vitro* a qualidade espermática de amostras de sêmen ovino refrigerado a 5°C durante 8 horas em 6 diferentes diluentes.

### Material e Métodos

Foram submetidos à colheita de sêmen, por vagina artificial, nos meses de janeiro, fevereiro e maio, 3 carneiros comprovadamente férteis da raça Suffolk. Analisou-se 23 ejaculados, um ejaculado por dia de cada 2 carneiros. Imediatamente após a colheita, cada amostra foi avaliada quanto ao volume, turbilhonamento, motilidade progressiva e concentração espermática, segundo EVANS e MAXWELL (1987) e vigor segundo CHEMINEAU e COGNIÉ (1991).

TABELA 1 – AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE SÊMEN OVINO FRESCO E APÓS 8 HORAS DE REFRIGERAÇÃO A 5°C. Curitiba(PR),1999.

| Diluentes                   | Motilidade Progressiva (%) | Turbilhonamento (0-5) | Vigor (0-5) |
|-----------------------------|----------------------------|-----------------------|-------------|
| Sêmen fresco <sup>a</sup>   | 75,65                      | 4,02                  | 3,73        |
| CUE <sup>*c</sup>           | 64,34                      | 2,3                   | 2,85        |
| CU-16 <sup>**c</sup>        | 61,73                      | 2,21                  | 2,94        |
| glicina-gema <sup>d</sup>   | 55,22                      | 1,06                  | 2,42        |
| citrato gema                | 55,22                      | 2,64                  | 2,74        |
| leite uht-gema <sup>c</sup> | 67,82                      | 1,98                  | 2,8         |
| tris-gema <sup>c</sup>      | 42,17                      | 2,36                  | 2,46        |

NOTA: letras diferentes indicam diferença estatística (P< 0,05)

\*Cornell University Extender; \*\*Cornell University – 1

Posteriormente, foi avaliada a morfologia espermática (BLOM, 1973). Após a colheita os ejaculados eram homogeneizados. Constituíram-se 23 homogeneizados que foram divididos em 6 alíquotas e diluídos a 30°C na proporção de uma parte de sêmen para 3 partes dos seguintes diluentes: “Cornell University Extender” (CUE) e “Cornell University 16” (CU-16) (FOOTE e BRATON, 1960), glicina-gema (GG) (AHMED, 1955), citrato-gema (CG) e TRIS-gema (TG) (EVANS e MAXWELL, 1987) e leite desnatado UHT-

gema (LG) (SCHINDLER e AMIR, 1961). O sêmen foi resfriado de 30°C para 5°C em 120 minutos, em caixa de poliestireno expandido contendo gelo. Após 8 horas de conservação a 5°C, o sêmen diluído foi submetido a análise de turbilhonamento, motilidade progressiva e vigor. A morfologia espermática foi avaliada em microscópio com contraste de fase. Sete amostras foram também submetidas ao teste de termo-resistência (TT) a 38°C por 4 horas e avaliada a motilidade progressiva, vigor e turbilhonamento a cada hora.

TABELA 2 – AVALIAÇÃO *IN VITRO* NA 4ª HORA DO TT DE SÊMEN OVINO REFRIGERADO POR 8 HORAS A 5°C. Curitiba (PR),1999.

| Diluentes                   | Motilidade Progressiva (%) | Turbilhonamento (0-5) | Vigor (0-5) |
|-----------------------------|----------------------------|-----------------------|-------------|
| CUE <sup>*b</sup>           | 38,89                      | 1,17                  | 1,44        |
| CU-16 <sup>**b</sup>        | 29,37                      | 1                     | 1,56        |
| glicina-gema <sup>c</sup>   | 0                          | 0                     | 0           |
| citrato-gema <sup>a</sup>   | 50                         | 1,5                   | 1,89        |
| Leite uht-gema <sup>c</sup> | 2,2                        | 0                     | 0,33        |
| Tris-gema <sup>b</sup>      | 35                         | 0,68                  | 1,31        |

NOTA: letras diferentes indicam diferença estatística (P< 0,05)

\*Cornell University Extender; \*\*Cornell University – 16

Para se efetuar as comparações entre o sêmen fresco e após 8 horas de refrigeração em cada um dos 6 diluentes, utilizou-se a

Técnica de Componentes Principais, através da combinação linear das 3 variáveis categóricas motilidade progressiva, vigor e

turbilhamento com o objetivo de se obter apenas uma variável. As variáveis de cada grupo foram submetidas a análise de variância (ANOVA) e ao Teste de Comparação Múltipla de Tukey, fixando-se a significância em 5%.

### Resultados e Discussão

Verificou-se, neste estudo, que o processo de refrigeração causou diminuição significativa na qualidade espermática, independente do diluente utilizado, quando comparado ao sêmen fresco (TABELA 1). Segundo SALAMON e MAXWELL (1995), a redução e aumento na temperatura, assim como a manipulação do

sêmen durante o processo de conservação promovem, inevitavelmente, redução na motilidade e causam danos ultraestruturais, bioquímicos e funcionais nos espermatozoides. Na avaliação 8 horas após a refrigeração, o sêmen diluído em CG demonstrou melhores resultados na característica avaliada (motilidade progressiva + turbilhamento + vigor). Não houve diferença significativa entre os diluentes CUE, CU-16, LG e TG, sendo estes superiores ao GG. Não foi observada vantagem no uso de diluentes acrescidos de glicina, em relação aos outros diluentes, nas avaliações realizadas em curto período de conservação como neste experimento.

TABELA 3 – AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA EM SÊMEN OVINO FRESCO E REFRIGERADO EM 6 DILUENTES POR 8 HORAS A 5°C. Curitiba (PR), 1999.

| DILUENTE      | DEFEITOS MENORES (%)  |                    |                    |                     | DEFEITOS MAIORES (%) | TOTAL DEFEITOS (%) |
|---------------|-----------------------|--------------------|--------------------|---------------------|----------------------|--------------------|
|               | acrossoma desprendido | cauda enrolada     | outros             | TOTAL               |                      |                    |
| Sêmen fresco  | 3,9 <sup>a</sup>      | 2,4 <sup>a</sup>   | 3,5 <sup>ab</sup>  | 9,8 <sup>a</sup>    | 3,1 <sup>a</sup>     | 12,9               |
| CUE*          | 4,7 <sup>a</sup>      | 9,2 <sup>bc</sup>  | 3,05 <sup>a</sup>  | 16,95 <sup>ab</sup> | 3,4 <sup>a</sup>     | 20,35              |
| CU-16**       | 5,85 <sup>a</sup>     | 13,15 <sup>c</sup> | 3,85 <sup>ab</sup> | 22,85 <sup>b</sup>  | 2,9 <sup>a</sup>     | 25,75              |
| glicina-gema  | 5,75 <sup>a</sup>     | 4,05 <sup>ab</sup> | 6,1 <sup>b</sup>   | 15,9 <sup>ab</sup>  | 3,9 <sup>a</sup>     | 19,8               |
| citrato-gema  | 6,1 <sup>a</sup>      | 7,55 <sup>bc</sup> | 3,8 <sup>ab</sup>  | 17,45 <sup>ab</sup> | 2,95 <sup>a</sup>    | 20,3               |
| leite uht-gem | 4,9 <sup>a</sup>      | 9,45 <sup>bc</sup> | 4,05 <sup>ab</sup> | 18,4 <sup>b</sup>   | 3,15 <sup>a</sup>    | 21,55              |
| tris-gema     | 5,1 <sup>a</sup>      | 9,1 <sup>bc</sup>  | 5,2 <sup>ab</sup>  | 19,4 <sup>b</sup>   | 3,05 <sup>a</sup>    | 22,45              |

NOTA: letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa (P<0,05).

\*Cornell University Extender; \*\*Cornell University – 16

A avaliação durante o TT revelou não haver alteração nas médias de motilidade progressiva, vigor e turbilhamento na 1ª hora de incubação; porém nas 3 horas subsequentes ocorreu um

declínio lento, progressivo e linear na média de todas as características avaliadas nos 6 diluentes testados até a última observação, (4ª hora de incubação) (FIGURAS 1, 2 e 3).

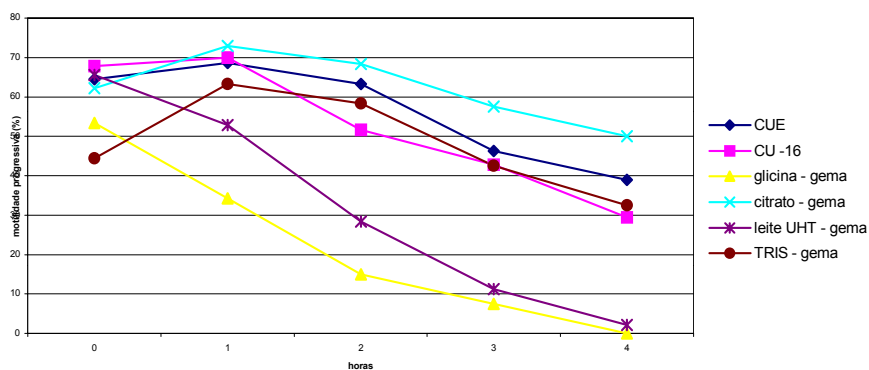


FIGURA 1 – VALORES DE MOTILIDADE PROGRESSIVA (%) DURANTE O TT DE SÊMEN OVINO REFRIGERADO EM 6 DILUENTES POR 8 HORAS À TEMPERATURA DE 5°C.

Estes resultados concordam com as avaliações de PAGANINI *et al.* (1997) que obtiveram declínio linear significativo com o avanço do período de estocagem durante o

teste de exaustão. Este fato pode ser explicado em função dos espermatozoides utilizarem mais os seus substratos nutritivos e diminuir sua viabilidade durante as 4 horas

do teste. Na 4ª hora de avaliação, verificou-se a morte de todos os espermatozoides diluídos em GG e apenas 2,2% de motilidade progressiva no diluente LG (TABELA 2). O diluente CG manteve as amostras de sêmen em melhores condições que os demais diluentes, apresentando 50% de motilidade na 4ª hora, enquanto que os diluentes CUE, CU-

16 e TG mantiveram os espermatozoides em condições semelhantes e significativamente inferiores ao citrato-gema (TABELA 2). PAGANINI *et al.* (1997) não observaram diferenças significativas entre os diluentes testados (glicina-gema, glicina-leite-gema e gema-leite) na motilidade e vigor dos espermatozoides aos 240 minutos do teste.

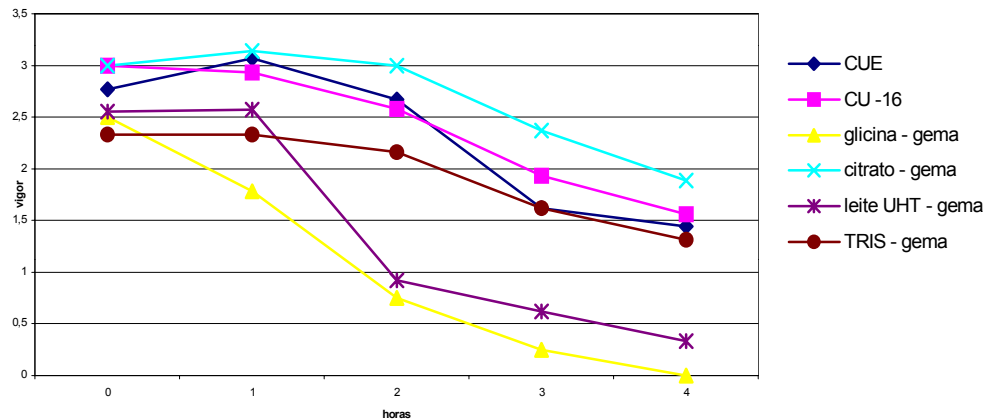


FIGURA 2 – VALORES DE VIGOR (0-5) DURANTE O TT DE SÊMEN OVINO REFRIGERADO EM 6 DILUENTES POR 8 HORAS À TEMPERATURA DE 5°C. FIGURA 1 – VALORES DE MOTILIDADE PROGRESSIVA (%) DURANTE O TT DE SÊMEN OVINO REFRIGERADO EM 6 DILUENTES POR 8 HORAS À TEMPERATURA DE 5°C.

Com os resultados do TT foi possível determinar, por meio da avaliação dos espermatozoides, a habilidade e capacidade de cada diluente em fornecer um meio de nutrição e manutenção do pH compatíveis com a sobrevivência dos

espermatozoides em temperaturas que não diminuam seu metabolismo. Conforme observou LUZ (1991) com sêmen congelado, há uma correlação positiva entre a motilidade progressiva no TT e os resultados de fertilidade.

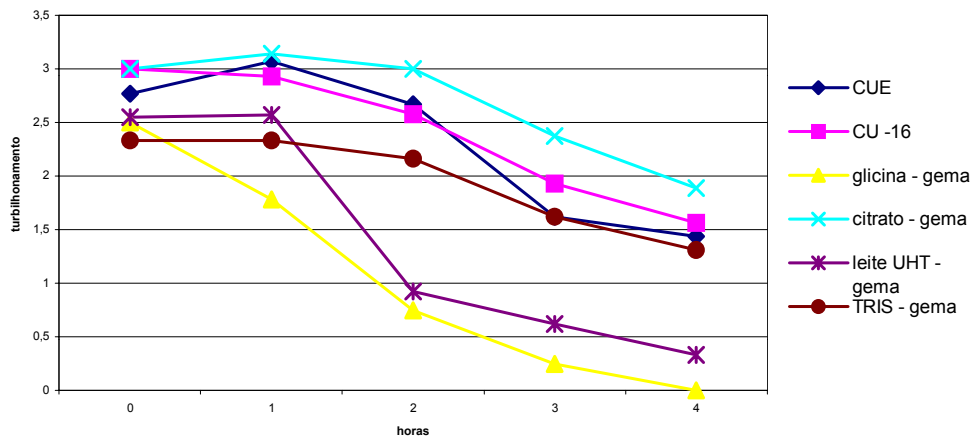


FIGURA 3 – VALORES DE TURBILHONAMENTO (0-5) DURANTE TT DE SÊMEN OVINO REFRIGERADO EM 6 DILUENTES POR 8 HORAS À TEMPERATURA DE 5°C.

O estudo da morfologia espermática, após 8 horas de refrigeração, demonstrou aumento na percentagem de espermatozoides com cauda enrolada quando comparado ao sêmen fresco (TABELA 3). Segundo BARTH e OKO (1989), o estresse térmico e hiposmolaridade das soluções conservantes aumentam a proporção de defeitos de cauda.

### Conclusões

Considerando-se todas as características avaliadas, concluiu-se que dentre os 6 diluentes testados, o CG apresentou melhores condições de preservabilidade do sêmen ovino refrigerado por 8 horas a 5°C, seguido pelo diluente CUE. Apesar da sensível diminuição da qualidade espermática, após o processo de refrigeração, o sêmen apresentava-se em boas condições de motilidade progressiva, vigor e morfologia espermática.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, S.I. Effect of glycine on storage of ram semen. **Journal Agricultural Science**, v.46, p.164-167, 1955.
- BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa**. Iowa, Iowa State University Press, 1989, 283 p.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinärmedicin**, v.25, p.282-391, 1973.
- BUTSWAT, I.S.; OSINOWO, O.A.; DIM, N.I. Studies on ram semen preservation at ambient temperatures by flow dialysis techniques. **Tropical Agriculture**, v.69, n.2, p.145-148, 1992.
- CHEMINEAU, P.; COGNIE, Y. **Training manual on artificial insemination in sheep and goats**. Rome, FAO, 1991, p.222.
- EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats**. Sydney, Butterworths, 1987, 194 p.
- FOOTE, R.H.; BRATTON, R.W. Survival of bovine spermatozoa stored at 5 and 25°C in extenders containing varying levels of egg yolk, glucose, glycine, glycerol, citrate, and others salts. **Journal of Dairy Science**, v.43, n.9, p.1322-1329, 1960.
- LUZ, S.L.N. **Inseminação intra-uterina por laparoscopia em ovinos**. Santa Maria, 1991, 58 p. Tese de Mestrado, Curso de Medicina Veterinária - Universidade Federal de Santa Maria.
- MARTIN, I.C.A. Milk and synthetic diluents for ram semen. In: International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination, 2, 1968, Paris. **Proceedings...** Paris, 1968, p.1619-1622.
- MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.55-65, 1996.
- PAGANINI, FILHO, P.; BICUDO, S.D.; SOUZA, M.I.L.; SOUSA, D.B. Viabilidade do sêmen ovino frente a três diluidores em temperaturas de 37°C e sob refrigeração. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, XII, Belo Horizonte, 1997. **Anais ...** Belo Horizonte, CBRA, 1997, p. 61.
- PETRUZZI, V.; TARANTINI, S.; ROYCHOUDHURY, P.N. Effect of different semen diluents on survival of ram spermatozoa at 5°C. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, v.23, n.7, p.556-561, 1976.
- SALAMON, 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, 1995.
- SCHINDLER, H.; AMIR, D. Longevity of ram sperm in various diluent and at different dilution rates. **Journal Agricultural Science**, v.56, p.183-189, 1961.