

BARTIRA PASTOR DE ANDRADE SOUSA

**AVALIAÇÃO *in vitro* E *in vivo* DA ADIÇÃO DE DILUENTES NA
REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN DE CARNEIROS DA RAÇA DORPER**

RECIFE

2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

BARTIRA PASTOR DE ANDRADE SOUSA

**AVALIAÇÃO *in vitro* E *in vivo* DA ADIÇÃO DE DILUENTES NA
REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN DE CARNEIROS DA RAÇA DORPER**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientadora: Prof^ª Dra. Áurea Wischral

Co-orientador: Med. Vet. M.Sc.
Joaquim Corrêa de Oliveira Andrade

**RECIFE
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA

S725a Sousa, Bartira Pastor de Andrade
 Avaliação *in vitro* e *in vivo* da adição de diluentes na refrigeração
 Do sêmen de carneiros da raça Dorper / Bartira
 Pastor de Andrade Sousa. -- 2008.
 64 f. il.

 Orientadora : Áurea Wischral
 Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade
 Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina Veteri –
 nária.

 Inclui bibliografia.

CDD 636.308 24

1. Inseminação artificial
 2. Fertilização
 3. Embriões
 4. Ovino
 5. Conservação
 6. Espermograma
- I. Wischral, Áurea
II.. Título

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**Avaliação *in vitro* e *in vivo* da adição de diluentes na refrigeração do sêmen de
carneiros da raça Dorper**

Dissertação de Mestrado elaborada por

BARTIRA PASTOR DE ANDRADE SOUSA

Aprovada em 29/08/2008

BANCA EXAMINADORA



Profª Dra. ÁUREA WISCHRAL

Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE - Orientadora



Profª Dra. MARIA MADALENA PESSOA GUERRA
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE



Dr. SEBASTIÃO INOCÊNCIO GUIDO
Medico Veterinário – IPA/PE



Prof Dr. ANTÔNIO RODRIGUES DA SILVA
Departamento de Zootecnia da UFMT
Campus de Rondonópolis

IN MEMORIAM

Muitas são as frases ditas por sábios homens ao longo da história da humanidade. E estas com frequência são lembradas e registradas em momentos importantes ou especiais. Neste meu momento especial, quero deixar registrada a sabedoria de um homem que embora não tenha realizado nenhum grande feito à humanidade, soube em seus 84 anos de vida aplicá-las sabiamente. Pois sempre foi perseverante, sonhou e apoiou o sonho dos outros; alegrou-se com as conquistas e sofreu com a dor de cada um ao seu lado, e com igual intensidade as suas. Conquistou admiração e respeito além do limite de seus familiares. Indiscutivelmente aplicou a arte de ouvir pacientemente, para depois aconselhar ou advertir. Viveu intensamente sempre aberto às mudanças e ao conhecimento, aprendidos com as frequentes e incansáveis leituras. E com o dom da boa expressão soube repassar cada uma, para que não se perdessem com o tempo. Orientou a todos, mesmo em seu leito de morte, e nunca se abalou por doença alguma, nem mesmo no último suspiro de vida. E terminou sua passagem assim: "Combati o bom combate, acabei a carreira e guardei a fé" (II Timóteo 4:7). Ao senhor, meu mais que avô Antônio Pereira de Andrade meu eterno amor.

Dedico este trabalho ao meu esposo, Joaquim Corrêa, pois verdadeiramente foi o meu ponto de equilíbrio na realização e finalização deste projeto.

Agradeço por seu ilimitado apoio, pelas incontáveis orientações, por sua extensa paciência, por sua fiel amizade e por seu carinhoso companheirismo. Beijo!

AGRADECIMENTOS

Especial agradecimento, aos meus pais, José Cesário e Maria Eugênia Pastor, por todo o amor e atenção dedicados a mim desde sempre. E aos meus irmãos, Ubirajara Pastor e Iaponã Pastor, pelo apoio, confiança e admiração.

Meus sinceros agradecimentos à professora Áurea Wischral pela receptividade e apoio, na reta final de minha jornada, sendo pessoa crucial para a conclusão deste trabalho.

À professora Maria Madalena Pessoa Guerra, pela abertura da sua porta que possibilitou a minha introdução ao Programa de Pós-graduação e sua paciência.

Aos meus sogros, João Antônio Corrêa e Zélia Maria Correia, pela gentileza em abrir a sua casa para que se realizassem todos os trabalhos.

À minha querida amiga Gilsan Aparecida, pelos agradáveis momentos convvidos, auxílio nos trabalhos e valiosas dicas.

Aos professores Cláudio Coutinho Bartolomeu, Cláudia Helena Dezotti e Rinaldo Aparecido Mota, pelas preciosas discussões em aula.

Aos funcionários Joana D`arc Rocha Alves e Alcir Loureiro, pela cordial prestatividade nas incontáveis solicitações de material. E à funcionária Sônia Maria Domingos, por toda a atenção.

Ao professor Lêucio Câmara Alves, pela orientação no uso do microscópio de fluorescência e pelo conselho após uma derrota em um dos obstáculos enfrentados. Consegui professor!

Aos tratadores de animais João Ilídio Soares Filho, José da Silva (Tozinho) e Reginaldo Antônio da Silva, pelo auxílio e apoio na lida com os animais e, manejo durante todo o desenvolvimento do projeto.

À senhora Severina Soares da Silva (Dói) por todo o cuidado e atenção durante as longas e freqüentes estadias.

Ao médico veterinário Paulo Castelo Branco de Gouveia Filho, pelas informações e experiências compartilhadas. E ao amigo Dr. Sebastião Inocêncio Guido, pelo material fornecido e orientações pertinentes ao delineamento do experimento.

Ao criador Manasses de Melo Rodrigues, por disponibilizar o microscópio óptico, durante as fases de desenvolvimento dos trabalhos.

Ao amigo, André Mariano, pela torcida e disposição em discutir assuntos pertinentes aos experimentos, técnicos e profissionais.

RESUMO

Avaliação *in vitro* e *in vivo* da adição de diluentes na refrigeração do sêmen de carneiros da raça Dorper.

Neste estudo objetivou-se avaliar a viabilidade *in vitro* e *in vivo* das células espermáticas após a adição de diluente no processo de refrigeração do sêmen ovino, e na fertilização de oócitos após inseminação de fêmeas ovinas superovuladas. No Experimento I foram utilizados três ejaculados de cada um dos três reprodutores Dorper, coletados com vagina artificial a intervalo de 3 dias, em três repetições. As características macro e microscópicas do sêmen foram analisadas antes e após a formação de um *pool*, além da concentração espermática, integridade do DNA e do acrossoma. O *pool* foi dividido em cinco partes iguais, procedeu-se com a diluição (1:3, sêmen:diluente) para constituir os respectivos grupos de diluentes: Equimix (DI), Laiciphos Green Ovine (DII), FR 4 (DIII), Equimix-Gema – Equimix com 20% gema de ovo (DIV) e Tris-Gema (DV; controle). Cada grupo foi subdividido em quadruplicata, refrigerado e mantido a 4 °C até as avaliações (MIP, vigor, integridade do DNA e do acrossoma) correspondendo a 0, 12, 24, 36 e 48 horas. Nas avaliações *in vitro* do sêmen o DI apresentou maior queda de MIP às 12 h em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Às 24 h os grupos DII, DIV e DV apresentaram a melhor MIP ($p < 0,05$), não divergindo ($p > 0,05$) entre si, enquanto que às 48 h o DII e o DV foram superiores ($p < 0,05$) aos demais. Com relação ao vigor, os grupos DII e o DV apresentaram valores superiores ($p < 0,05$) ao DI e DIII a partir das 12 horas e ao DIV a partir das 24 horas ($p < 0,05$). Em todos os grupos de diluentes houve a preservação total da integridade do DNA e alto índice de espermatozoides com acrossoma intacto, para todos os intervalos avaliados. Para o Experimento II foi utilizada a mesma técnica para colheita e processamento dos ejaculados de três reprodutores Dorper. Formou-se um *pool* com três ejaculados de cada animal, dividiu-se em duas partes iguais diluídas na proporção 1:3 para constituir os respectivos grupos experimentais: Equimix-Gema (DI) e Tris-Gema (DII; controle). Cada grupo foi subdividido em outras duas alíquotas: fresco – F (F-DI e F-DII), que foi usado imediatamente, e refrigerado – R (R-DI e R-DII), mantido a 4 °C por 24 horas de armazenamento. Foram realizadas inseminações laparoscópicas, com volume inseminante de 0,25 mL por corno uterino, momento em que foram realizadas as avaliações dos ovários. Foram realizados 39 procedimentos de colheitas de embriões, em 19 foram utilizados sêmen refrigerado (R-DI e R-DII) e em 20 sêmen fresco (F-DI e F-DII). No teste *in vivo* obteve-se uma taxa geral de estruturas fertilizadas de 71,0% (237/334), sendo 59,3% (198/334) de embriões viáveis, o que não variou significativamente ($p > 0,05$) entre os tipos de sêmen e de diluentes. No total dos embriões, 86,4% apresentaram qualidade de grau I e II, sendo o sêmen refrigerado do R-DI o de melhor percentual (100%) ($p < 0,05$). O “status” ovariano no momento da inseminação interferiu na fertilização, observado-se melhores resultados para o sêmen fresco do F-DI quando o ovário se encontrava em ovulação. Para o F-DII, este *status* foi o que apresentou menor quantidade de estruturas fertilizadas ($p < 0,05$). Ao final dos experimentos pode-se concluir que: o diluente Laiciphos Green Ovine, da mesma forma que o Tris-gema, pode ser utilizado na conservação do sêmen a 4 °C por 48 horas; enquanto o Equimix, acrescido de 20% de gema de ovo, recomenda-se que seja utilizado no armazenamento do sêmen (4 °C) por até 24 horas. É viável a refrigeração do sêmen ovino a 4 °C por 24 horas para a utilização em programas de transferência de embriões; e que o diluidor Equimix, acrescido de 20% gema de ovo, resultou em taxa de fertilização e qualidade embrionária similares ao tradicional Tris-Gema.

Palavras chave: sêmen, diluidor, refrigeração, embriões, fertilização, ovinos.

ABSTRACT

***In vitro* and *in vivo* assessment of the addition of diluents in the refrigeration of semen of Dorper sheep.**

The aim of the present study was to assess the *in vitro* and *in vivo* viability of sperm cells following the addition of diluent in the refrigeration process of sheep semen and the fertilization of oocytes following the insemination of superovulated ewes. In Experiment I, three ejaculates from each of three Dorper breeders were used, collected with an artificial vagina during three repetitions with three-day intervals. The macroscopic and microscopic characteristics of the semen were analyzed before and after the pooling, analyzing sperm concentration, DNA integrity and acrosome integrity as well. The pooled semen was divided into five equal parts. Dilution was performed (1:3, semen:diluent) to establish the diluent groups: Equimix (DI), Laiciphos Green Ovine (DII), FR 4 (DIII), Equimix-Yolk [Equimix with 20% egg yolk (DIV)] and Tris-Yolk (DV; control). Each group was subdivided in quadruplicate, refrigerated and kept at 4 °C until the evaluations (MIP, vigor, DNA integrity and acrosome integrity), corresponding to 0, 12, 24, 36 and 48 hours. In the *in vitro* assessments, DI exhibited the greatest drop in MIP at 12 h in comparison to the other groups ($p < 0.05$). At 24 h, DII, DIV and DV exhibited the highest MIP ($p < 0.05$), with no significant differences between one another ($p > 0.05$). At 48 h, DII and DV were superior to the other groups ($p < 0.05$). Regarding vigor, DII and DV had higher values ($p < 0.05$) than DI and DIII at 12 hours and DIV had the highest values at 24 hours ($p < 0.05$). In all groups, there was total preservation of DNA integrity and a high number of spermatozooids with intact acrosomes for all the intervals studied. In Experiment II, the same collection method and processing of the ejaculates from the three Dorper breeders were performed. A pool was formed of the three ejaculates of each animal, divided into two equal parts at a 1:3 proportion in order to establish the experimental groups: Equimix-Yolk (DI) and Tris-Yolk (DII; control). Each group was subdivided into two aliquots: fresh – F (F-DI and F-DII), which was used immediately; and refrigerated – R (R-DI and R-DII), which was kept at 4 °C for a storage time of 24 hours. Laparoscopic inseminations were performed with an inseminate volume of 0.25 mL per uterine horn, which was when the ovary evaluations were performed. Thirty-nine embryo harvesting procedures were performed, 19 using refrigerated semen (R-DI and R-DII) and 20 using fresh semen (F-DI and F-DII). In the *in vivo* test, a general rate of 71.0% (237/334) of fertilized structures was obtained, 59.3% (198/334) of which were viable embryos. There was no significant variation ($p > 0.05$) between the types of semen and diluents. Among the total number of embryos, 86.4% exhibited quality Grades I and II, with the refrigerated semen of R-DI obtaining the best percentage (100%) ($p < 0.05$). The ovarian status at the time of insemination affected fertilization, as better results were obtained for the fresh semen of F-DI when the ovary was ovulating. For F-DII, this status exhibited a smaller number of fertilized structures ($p < 0.05$). At the end of the experiments, it was concluded that both the Laiciphos Green Ovine and Tris-Yolk can be used in the conservation of semen at 4 °C for 48 hours, whereas Equimix added with 20% egg yolk is recommended for use in semen storage (4 °C) of up to 24 hours. The refrigeration of ovine semen at 4 °C for 24 hours is viable for use in embryo transference programs. Equimix added with 20% egg yolk resulted in a fertilization rate and embryo quality similar to the traditional Tris-Yolk.

Keywords: semen, diluent, refrigeration, embryos, fertilization, sheep.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 Porcentagem da motilidade individual progressiva (MIP) dos espermatozoides ovino após diluição com cinco diferentes diluentes e mantidos sobre refrigeração a 4 °C, durante 48 horas 42
- FIGURA 2 Vigor espermático dos espermatozoides ovino diluídos com cinco diferentes diluentes sobre refrigeração a 4 °C, durante 48 horas 43

LISTA DE TABELAS

Experimento I

TABELA 1	Valores médios e desvio padrão da motilidade individual progressiva (MIP) de acordo com o diluente e o tempo de armazenamento do sêmen ovino	41
TABELA 2	Valores médios e desvio padrão do vigor espermático de acordo com o diluente e o tempo de armazenamento do sêmen ovino	43
TABELA 3	Porcentagem de células espermáticas com acrossoma íntegro no sêmen ovino diluído em cinco diferentes diluentes sobre refrigeração a 4 °C, durante 48 horas	45

Experimento II

TABELA 1	Números e porcentagem de estruturas fertilizadas obtidas de ovelhas inseminadas com sêmen diluído com dois diferentes diluentes, a fresco e refrigerado	61
TABELA 2	Distribuições e porcentagem de embriões viáveis, degenerados e óvulos obtidos de ovelhas inseminadas com sêmen diluído com dois diferentes diluentes, a fresco e refrigerado	61
TABELA 3	Distribuição e porcentagem da qualidade embrionária obtida de ovelhas inseminadas com sêmen diluído com dois diferentes diluentes, a fresco e refrigerado	62
TABELA 4	Números e porcentagem de estruturas fertilizadas em relação ao <i>status</i> ovariano no momento da IA laparoscópica com sêmen ovino diluído com dois diferentes diluentes, a fresco e refrigerado	63

SUMÁRIO

1	Introdução	11
2	Revisão de Literatura	12
2.1	Bioquímica do Sêmen	12
2.2	Diluentes	15
2.3	Refrigeração do Sêmen	18
2.4	Inseminação Artificial	20
2.5	Fertilização	22
3	Referências	24
4	Experimentos	34
4.1	Viabilidade <i>in vitro</i> das células espermáticas ovinas após refrigeração utilizando diferentes diluentes	35
4.2	Eficiência do Equimix acrescido de gema de ovo na fertilização de ovelhas superovuladas, após refrigeração do sêmen por 24 horas	49
5	Considerações Finais	64

1 Introdução

A ovinocultura no Brasil tem conquistado, nos últimos tempos, um local de destaque no setor do agronegócio. Isto se deve ao melhoramento das raças nativas, à importação de novas raças de alto potencial genético e ao aprimoramento das técnicas de manejo. Convergindo todas estas ações e investimentos para a agregação de valor aos produtos finais: reprodutores e matrizes.

Em 2005, o rebanho nacional de ovinos correspondeu a 16,05 milhões de cabeças, sendo a região Nordeste possuidora de 56,3% desta criação. Contudo, a maior parte da produção nessa região ainda é voltada para a subsistência (OJIMA et al., 2006). Dentro deste contexto, o pequeno criador encontra-se à margem de todo o progresso dessa atividade, por desconhecimento ou falta de acesso às tecnologias ou, até mesmo, pela inviabilidade do emprego desses animais de comprovado mérito genético em sistemas tradicionais de criação.

Inicialmente, visando à obtenção do melhoramento genético de um rebanho, a contribuição do material limitava-se a 50% do patrimônio genético proveniente do germoplasma masculino através do uso de biotécnicas como monta controlada e Inseminação Artificial (IA). Ultimamente, a melhoria do rebanho expandiu-se às fêmeas através das técnicas de Superovulação (SOV), colheita e Transferência de Embriões (TE) (FREITAS, 2003), ou Aspiração Folicular guiada por Laparoscopia e Fertilização *in vitro* (FIV), cultivo e posterior transferência para receptoras sincronizadas (BERNARDI, 2005).

A IA torna-se atrativa por possibilitar a otimização do aproveitamento de um ejaculado e, dentre as possibilidades de biotecnologias a serem empregadas, apresenta menor custo e maior praticidade no aumento do ganho genético. Embora, um pouco mais onerosa, a TE potencializa a utilização de uma única dose de sêmen enquanto multiplica o germoplasma da fêmea. Sendo assim, a associação destas duas tecnologias amplia o melhoramento animal, principalmente, para os criatórios de rebanho de elite e comercial.

Todavia, os resultados obtidos na espécie ovina são bastante variados e, segundo Maxwell e Salamon (1993b), uma eficiente fertilização após IA é influenciada pelo tipo de diluente utilizado na conservação do sêmen, por refletir na capacidade que os espermatozoides têm em suportar a refrigeração, assim como, na duração da viabilidade espermática após diluição. Além disso, foram observadas diferenças significativas entre inseminadores, carneiros, ejaculados do mesmo animal e momento da inseminação em relação à taxa de prenhez de ovelhas inseminadas com sêmen refrigerado, mesmo quando se utilizam

diluentes semelhantes (LAPWOOD et al., 1972). Também ocorrem variações de porcentagens de oócitos fertilizados e embriões viáveis de ovelhas superovuladas e inseminadas com sêmen criopreservado (EHLING et al., 2003) bem como, quanto ao local de deposição do sêmen (JABBOUR e EVANS, 1991; MAXWELL et al., 1993a), e, somado a isto, há a escassez de trabalhos que avaliem o emprego do sêmen ovino refrigerado em programas de Transferência de Embriões.

As substâncias diluentes, em geral, apresentam propriedades benéficas à manutenção da viabilidade das células espermáticas. A refrigeração do sêmen propicia maior tempo de conservação, possibilitando superar distâncias (PAPA et al, 2005) quando um reprodutor é compartilhado por um grupo de proprietários (PALHÃO et al., 2006). Busca-se então, encontrar um diluente que apresente características físico-químicas semelhantes ao ejaculado, e que preserve as células espermáticas por longo período. Uma variedade de fórmulas são propostas, tendo como objetivo aumentar a viabilidade dos espermatozoides durante o processo de refrigeração. Acredita-se que a padronização dos diluentes comerciais durante o processo de fabricação e a garantia do tempo de conservação de suas características pode ser fator importante na minimização do efeito dessa variável sobre os resultados de fertilização e prenhez.

Neste sentido, esta pesquisa foi realizada objetivando a avaliação do efeito da adição de três diluentes comerciais (Equimix, Laiciphos Grenn Ovine e FR 4) sobre a viabilidade *in vitro* e *in vivo* das células espermáticas de carneiros Dorper submetidas ao procedimento de refrigeração.

2 Revisão de Literatura

2.1 Bioquímica do Sêmen

O líquido seminal, em condições normais, é um meio isotônico (GONZALES et al., 1984) e neutro para células espermáticas, que apresentam pouca resistência a variações da pressão osmótica (MIES FILHO, 1982). Todavia, foi reportado por Salamon e Maxwell (1995a), que o sêmen de carneiro suporta bem soluções com pressão osmótica média de 7,7

atmosferas (atm). As alterações na forma destas células são o enrolamento da cauda em soluções hipotônicas e curvaturas em ziguezague nas hipertônicas (MIES FILHO, 1982). O equilíbrio iônico do plasma seminal é assegurado pelos minerais, e estes também promovem as condições metabólicas exigidas pelo espermatozóide durante e após sua formação (MIES FILHO, 1982), sendo encontrados na concentração de 103mg de Na, 71mg de K, 9mg de Ca e 3mg de Mg por 100mL de sêmen (DIAS CORREIA e DIAS CORREIA, 1985). Hafez (1995), cita valores maiores de 225mg de Na, 155mg de K, 40mg de Ca e 8mg de Mg por 100mL de sêmen, ficando demonstrado que há uma variação fisiológica muito ampla, sendo esta tolerada pelas células espermáticas dos ovinos. Segundo Gonzáles et al. (1984), o sêmen ovino mantido a 37 °C por um período de 90 minutos não apresenta trocas eletrolíticas significativas dos seus principais eletrólitos: sódio, potássio, cálcio e magnésio.

O pH seminal apresenta uma variabilidade de acordo com a espécie animal e até mesmo entre ejaculados do mesmo indivíduo, estando relacionado com a concentração espermática e com as diferentes secreções das glândulas anexas. Contudo, as células espermáticas suportam oscilações bastante amplas (MIES FILHO, 1982), podendo haver uma variação de 5,9 a 7,3 para carneiros (KOLB, 1984). Em se tratando de sêmen recém-ejaculado, o valor se aproxima do neutro, todavia, nas espécies que ejaculam sêmen muito concentrado, há uma diminuição inicial do pH devido ao acúmulo de ácido láctico formado pela atividade frutolítica. No sêmen ovino, o ácido láctico é encontrado na concentração de 36mg/100mL (KOLB, 1984; DIAS CORREIA e DIAS CORREIA, 1985).

Foi evidenciado por Gonzáles e Neves (1984), que o sêmen ovino mantido a 37 °C apresenta decréscimo significativo no pH até os 90 minutos pós-ejaculação. Todavia, Kolb (1984) cita que a presença de algumas substâncias de capacidade tampão, a exemplo do fosfato, bicarbonato e citrato, regula o pH seminal, mantendo-o uniforme após 24 horas de colheita (MIES FILHO, 1982). Na espécie ovina, o ácido cítrico apresenta-se estável por longo período após a colheita do sêmen, sendo encontrado numa concentração variável de 55,7 (GONZÁLES e NEVES, 1984) a 137mg/100mL (KOLB, 1984; DIAS CORREIA e DIAS CORREIA, 1985). Todavia, a acidificação do plasma seminal também tem relação com a presença de CO₂, que é um dos produtos finais do metabolismo do ácido láctico (MIES FILHO, 1982).

Os teores de açúcares presentes no sêmen divergem entre as espécies e também entre os ejaculados de um mesmo animal, e constituem-se na principal fonte de energia para os espermatozóides (HAFEZ, 1995). Dentre os glicídios, a frutose é o de maior concentração no sêmen ovino, aproximadamente 247mg/100mL (KOLB, 1984; DIAS CORREIA e DIAS

CORREIA, 1985), podendo oscilar em decorrência das variações estacionais (GIRÃO e MIES FILHO, 1989). A velocidade de degradação da frutose está na dependência da concentração espermática, temperatura (KOLB, 1984) e pH (DIAS CORREIA e DIAS CORREIA, 1985), ocorrendo intenso consumo nos primeiros 30 minutos após o sêmen ter sido ejaculado (GONZALES e NEVES, 1984). O sorbitol, considerado um álcool-açúcar, é encontrado na concentração de 72mg/100mL (MIES FILHO, 1982) no plasma seminal, e pode servir como fonte de energia através de sua conversão em frutose (SWENSON, 1984).

Os espermatozóides dos testículos diferem daqueles encontrados nos ejaculados quanto à capacidade de captação de oxigênio (O_2), e também no seu padrão de utilização de açúcar para a produção de energia (VOGLMAYR et al., 1967, citado por HAFEZ, 1995). Sob condições anaeróbicas, convertem glicose, frutose e manose em ácido láctico, possibilitando a sobrevivência durante o período de estocagem (HAFEZ, 1995). As enzimas oxidativas envolvidas no metabolismo glicolítico/frutolítico estão presentes na peça intermediária dos espermatozóides, rica em mitocôndrias (KOLB, 1984).

Na presença de oxigênio, os espermatozóides utilizam uma variedade de substratos encontrados no plasma seminal (DIAS CORREIA e DIAS CORREIA, 1985). A atividade respiratória exógena subministra os meios de utilização do lactato ou piruvato, resultantes da frutólise de glicídios em dióxido de carbono (CO_2) e água (MANN, 1964, citado por HAFEZ, 1995). Este processo oxidativo localizado nas mitocôndrias é considerado o mais eficiente para a produção de energia (HAFEZ, 1995). Na respiração endógena, o plasmalogênio intracelular pode fornecer energia quando os substratos exógenos se esgotam. Contudo, esta fonte de energia parece ser prejudicial aos espermatozóides (MANN, 1964, citado por HAFEZ, 1995).

Os espermatozóides convertem a maior parte da energia em trifosfato de adenosina (ATP), sendo esta usada para motilidade espermática (DIAS CORREIA e DIAS CORREIA, 1985) e manutenção da integridade das membranas plasmáticas (HAFEZ, 1995).

As espécies reativas ao oxigênio (ROS) são geradas durante o metabolismo aeróbico dos espermatozóides, sendo necessárias aos processos de capacitação espermática e reação do acrossoma (De LAMIRANDE e GANGNON, 1995). O controle endógeno das ROS ocorre através dos antioxidantes presentes no plasma seminal (SIKKA et al., 1995), sendo de fundamental importância para prevenir o estresse oxidativo causador de efeitos patológicos a essas células (JANSSEN et al., 1993). Foi citado por Luis Ruiz et al. (2007) que são encontrados no sêmen ovino a superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, as vitaminas C e E e o ácido úrico.

O ácido ascórbico, presente no sêmen ovino no valor máximo de 8mg/100mL (MIES FILHO, 1982) é um inibidor de radicais livres. A ergotioneína é uma base nitrogenada considerada como protetora das células espermáticas contra os efeitos tóxicos de agentes oxidantes (SWENSON, 1984) e, provavelmente, neutraliza os efeitos nocivos de íons de cobre e de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MIES FILHO, 1982). Os agentes oxidantes tais como radical superóxido (O_2^-), radical hidroxil (OH^\cdot) e H_2O_2 , podem produzir danos, como a lipoperoxidação de lipídios insaturados das membranas celulares.

2.2 Diluentes

O fracionamento do sêmen fresco proporciona o máximo aproveitamento do volume total do ejaculado, sendo os diluentes empregados com esta finalidade. Estes extensores, além de possibilitarem o aumento volumétrico do ejaculado, devem fornecer ambiente favorável à viabilidade das células espermáticas por um longo período de tempo após a colheita (MIES FILHO, 1982). Sendo assim, devem fornecer nutrientes como fontes de energia; oferecer proteção contra os efeitos deletérios que podem ocorrer durante a refrigeração e congelamento; apresentar ausência ou baixa citotoxicidade; prover pressão osmótica igual ou aproximada ao sêmen (puro) da espécie trabalhada; inibir o crescimento bacteriano e apresentar efeito tampão para prevenir mudanças no pH, desfavorável à vitalidade dos espermatozóides (MIES FILHO, 1982; HAFEZ, 1995).

O plasma seminal (líquido das glândulas anexas) de machos vasectomizados pode ser utilizado para diluição de sêmen de reprodutores da mesma espécie, por apresentarem características físico-químicas relativamente próximas (MIES FILHO, 1982). Contudo, por promover limitada proteção aos espermatozóides contra a mudança de temperatura (SALAMON e MAXWELL, 1995a), não servem para utilização na refrigeração ou congelamento. Em geral, os diluentes usados para conservação do sêmen no estado líquido têm como base a gema de ovo ou o leite tratado pelo calor, por apresentarem o benefício de proteger as células espermáticas do estresse térmico durante a refrigeração e a vantagem de serem ricos em nutrientes (HAFEZ, 1995).

Segundo SALAMON e MAXWELL (2000), a fração protéica de baixa densidade da gema de ovo, provavelmente, é a responsável pela ação protetora contra a ação deletéria do

frio. Também é atribuída, à gema, a redução das perdas de enzimas acrossomais e a prevenção contra as mudanças degenerativas do acrossoma durante a estocagem no estado líquido.

Os diluentes à base de leite (*in natura*, desnatado ou reconstituído) possuem uma fração protéica que atua contra as variações de pH e como agente quelante dos metais pesados (SALAMON e MAXWELL, 2000). Entretanto, lactenina, proteína de baixo peso molecular, é tóxica para o espermatozóide, devendo o diluente à base de leite ser aquecido a 92-95 °C, durante 8 a 10 minutos (BARBAS et al., 2004). Com o tratamento térmico, a lactose é desdobrada em glicose, sendo esta uma fonte energética imediata ao metabolismo dos espermatozoides (MIES FILHO, 1982).

Uma variedade de tampões (Citrato, Tris, Tes, Hepes, Mop, Mês e Pipes) pode ser usada para manter o pH aproximadamente neutro (SALAMON e MAXWELL, 2000) e a pressão osmótica próxima dos 300 miliosmóis, que é equivalente a do sêmen (HAFEZ, 1995). Os de origem orgânica, igualmente ao Tris, apresentam maior poder tampão do que o fosfato ou o citrato, e podem ultrapassar a membrana plasmática, reduzindo as variações intracelulares do pH, não influenciando na mobilidade e no metabolismo dos espermatozoides de carneiros (SALAMON e MAXWELL, 2000). Segundo Sandoval et al. (2007), os diluidores contendo Tris demonstraram melhor capacidade de regulação osmótica e baixa toxicidade na criopreservação do sêmen ovino.

Os diluentes citrato-gema e tris-gema foram originariamente idealizados para a preservação do sêmen não congelado para espécie bovina (HAFEZ, 1995) e continuam a ser empregados na espécie ovina (MORAES et al., 1998; LUZ et al., 2000; MENCHACA, et al., 2005), assim como o leite desnatado ou em pó reconstituído (MAXWELL e SALAMON, 1993b; BARBAS et al., 2004), acrescido ou não de crioprotetores.

A glicose, adicionada usualmente, é preferencialmente utilizada pelos espermatozoides *in vitro* como fonte energética (MIES FILHO, 1982). A adição deste monossacarídeo até o dobro do nível isotônico é tolerável pelos espermatozoides ovinos, devido à sua capacidade de permeabilidade na membrana celular, possibilitando assim equilíbrio do gradiente osmótico (SALAMON e MAXWELL, 1995a). A manose, assim como a frutose, também são metabolizadas pelos espermatozoides durante o armazenamento do sêmen, podendo ser utilizadas combinações entre estes três.

Contudo, o emprego de outros açúcares tem por finalidade preservar a motilidade espermática (SALAMON e MAXWELL, 2000). A rafinose (HAFEZ, 1995), a trealose (SANDOVAL et al., 2007), a lactose e a sacarose são empregadas por promoverem boa desidratação e atuarem mantendo a pressão/equilíbrio osmótico (SALAMON e MAXWELL,

2000), bem como a integridade da membrana das células espermáticas durante a refrigeração (SALAMON e MAXWELL, 2000).

Alguns ácidos graxos e aminoácidos, a exemplo da glicina, podem ser acrescidos ao meio diluente como substratos para os processos metabólicos das células espermáticas (MIES FILHO, 1982). O benefício da glicina em promover maior longevidade aos espermatozóides foi comprovado nos estudos de Schindler e Amir (1961, citado por HAFEZ, 1995) e Wolf et al. (1999). Também se faz necessária a utilização de antibióticos para inibir o crescimento de microrganismos no sêmen, sendo usualmente adicionados penicilina, estreptomicina, polimixina B ou outras combinações de antibióticos (HAFEZ, 1995).

Aditivos também podem ser adicionados objetivando melhorar a capacidade fertilizante. Segundo Oliveira et al. (1988), a melhor proteção acrossomática é verificada ao adicionar Orvus-Es-Paste (OEP) ao meio de congelamento para sêmen ovino. Estes mesmos autores observaram a diminuição na motilidade e maiores danos ao acrossoma quando ao diluente foi acrescido apenas β -amilase, diferentemente da associação desta última com o OEP. Maia (2006) indica a adição nas concentrações de 0,5 ou 1%, ao diluente Tris-gema (20%), do detergente lauril sulfato de sódio (LSS) para obtenção de bons resultados de congelabilidade do espermatozóide ovino.

Atualmente, nos estudos da bioquímica do sêmen, as ROS têm lugar de destaque juntamente com os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Através destes novos conhecimentos, alguns inibidores de radicais livres são aplicados na formulação de diluentes, visando reduzir o estresse oxidativo durante o resfriamento e congelamento (SALAMON e MAXWELL, 2000). Maia (2006) obteve efeito benéfico sobre a viabilidade dos espermatozóides após a congelação, quando foi adicionado ao meio diluente a catalase. No entanto, quando associou a catalase ao Trolox no mesmo diluente, observou efeito deletério sobre a motilidade espermática e a integridade acrossomal, indicando o seu uso isoladamente. Luis Ruiz et al. (2007) ao trabalharem com o antioxidante TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxy1), em uma concentração de 0,5 mM, adicionado no momento do processo de refrigeração a 10 °C obtiveram a prevenção da perda da motilidade, maior viabilidade dos espermatozóides ovinos e o bloqueio do início da capacitação.

Foi demonstrado que a produção de ROS ocorre no diluente em decorrência de reações químicas entre os compostos, mesmo sem a presença celular (MAIA, 2006). Logo, o caráter bioquímico dos componentes, a maneira como interagem com os espermatozóides e a possibilidade de sua metabolização, ou até os possíveis efeitos adversos, devem ser minuciosamente avaliados. E ao final, pretende-se obter um diluente promovedor de:

interações benéficas entre as células espermáticas e o meio que as circundam, e minimizador dos efeitos deletérios causados pelas alterações provocadas por diminuição ou aumento da temperatura, alterações no pH e na osmolaridade (WATSON, 1981).

2.3 Refrigeração do Sêmen

A habilidade dos espermatozoides de sobreviverem por longos períodos no epidídimo deve-se ao fato de estarem imóveis ou semi-imóveis, e em estado metabólico quiescente. Este princípio é atribuído ao processo de refrigeração, onde ocorre a redução da mobilidade e diminuição do metabolismo espermático, prevenindo a auto-intoxicação pelos seus metabólitos (EVANS e MAXWELL, 1990; MAXWELL e SALAMON, 1993b). Na estocagem do sêmen no estado líquido, trabalha-se em geral com as temperaturas entre 0-5 °C ou 10-15 °C (SALAMON e MAXWELL, 2000).

A diminuição da temperatura deve ser procedida gradativamente para evitar os efeitos deletérios do choque térmico na faixa crítica dos 18 °C (EVANS e MAXWELL, 1990) a 5 °C (WATSON, 2000), pois as mudanças ocorridas são irreversíveis aos espermatozoides (EVANS e MAXWELL, 1990). São descritas diversas velocidades para a curva de refrigeração do sêmen ovino, indo desde 0,25 °C/min (MENCHACA et al., 2005) a 0,94 °C/min (GUERRA e NUNES, 1999). Em geral, a refrigeração a 5 °C deve ocorrer aproximadamente em, duas (KOLB, 1984; MILCZEWSKI et al., 2000a) a três horas (EVANS e MAXWELL, 1990).

O sêmen diluído, submetido aos procedimentos de refrigeração ou congelamento, esta sujeito à ocorrência de danos a integridade das membranas espermáticas, interferindo significativamente na sobrevivência e na capacidade fecundante dos espermatozoides (MARTIN, 1968; MAXWELL e WATSON, 1996). Estas alterações podem ser atribuídas às transições da fase lipídica (WATSON, 2000) e/ou aumento na peroxidação (ALVAREZ e STOREY, 1992), com a conseqüente redução na velocidade e na porcentagem de espermatozoides móveis (WATSON, 1995; ISACHENKO et al., 2004). No reaquecimento do sêmen ocorre à reordenação da membrana plasmática e, neste momento, pode haver a desorganização das associações lipo-protéicas, que refletirá no funcionamento das trocas metabólicas (MORAES et al., 1998).

Nessa perspectiva, é essencial o uso de uma substância lipoprotéica que determine proteção contra o choque térmico e diminuição das alterações degenerativas que ocorrem no acrossoma durante a conservação do sêmen no estado líquido (SALAMON e MAXWELL, 2000). Segundo Vishwanath e Shannon (2000) a atividade da bomba de Na^+/K^+ diminui com temperaturas reduzidas tais como 5 °C, mas é incapaz de lidar com a difusão dos íons através da membrana celular. Desta maneira, a permeabilidade ao cálcio poderá induzir a uma vesiculação prematura da membrana acrossomal (BICUDO et al., 2007). Além disso, atenção especial deve ser dada aos procedimentos utilizados em laboratório, de retirada do plasma seminal e/ou adição de diluente antes da refrigeração/criopreservação, que reduzem a proteção conferida pelos antioxidantes aos espermatozoides (OCHSENDORF, 1999; BILODEUA et al., 2000).

Para a conservação do sêmen ovino sob refrigeração são propostos vários diluentes, sempre buscando o de maior capacidade preservadora por maior período de tempo. Em seus trabalhos, Petruzzi et al. (1976) obtiveram bons resultados de motilidade quando refrigeraram sêmen ovino em diluentes à base de Tris e citrato, após 24 horas de armazenamento a 5 °C. Jobim et al. (1987) utilizando o diluente INRA, à base de leite, acrescido de 20% de gema de ovo, obtiveram índices de 45% de fertilidade com o sêmen de carneiros, refrigerado a 5 °C, durante 8 horas.

Em contrapartida, Bettencourt et al. (1997), ao avaliarem o sêmen ovino diluído em Laiciphos a 5 °C, incubado por 3 horas, observaram fertilidade à inseminação apenas de 32,0% e prolificidade de 1,53. Segundo Milczewski et al. (2000a), houve diminuição significativa na qualidade espermática do sêmen ovino submetido à refrigeração a 5 °C após períodos de oito horas de armazenamento, independentemente dos diluentes utilizados Cornell University Extender (CUE), Cornell University – 16 (CU-16), glicina-gema, citrato-gema e tris-gema.

No intuito de melhorar a capacidade conservante, são adicionadas substâncias crioprotetoras, a exemplo do glicerol, aos diluentes para a refrigeração do sêmen. Figueirêdo et al. (2002) demonstraram que a adição de glicerol e gema de ovo ao diluente à base de água de côco contribui para a manutenção da viabilidade e da fertilidade do sêmen caprino refrigerado a 4 °C. Diferindo dos achados de Bedford et al. (1995), que verificaram diminuição da fertilidade do sêmen equino a 5 °C quando utilizaram gema de ovo ou glicerol na solução de leite desnatado-glicose.

Segundo Maxwell e Salamon (1993b) e Maxwell e Watson (1996), o sêmen ovino refrigerado conserva a sua capacidade fertilizante somente quando armazenado por um

período inferior a 24 horas, corroborando com Menchaca et al. (2005), que encontraram melhores taxas de concepção para sêmen ovino refrigerado a 5 °C quando armazenado por 12 horas. Para Nunes e Feliciano Silva (1984), o sêmen caprino a 4 °C se presta para o uso na IA, desde que não ultrapassem 12 horas de refrigeração.

Divergindo destes autores, as avaliações *in vitro* realizadas por Paganini Filho et al. (1997) revelaram elevada capacidade de manutenção das células espermáticas de ovinos por até 48 horas de refrigeração a 5 °C, corroborando com Figueirêdo et al. (2002) que encontraram taxa de fertilidade para o sêmen caprino refrigerado por 24 horas a 4 °C, significativamente superior à do conservado por 12 horas.

A redução na motilidade espermática entre 24 e 48 horas de armazenamento do sêmen refrigerado tem sido registrada por vários autores (ROBERTSON e WATSON, 1987; MAXWELL e SALAMON, 1993b; SAMPAIO NETO et al., 2002). Em contrapartida, Sousa e Bicudo (2002), controlando a refrigeração do sêmen ovino em container Equitainer e refrigerador, demonstraram haver elevada capacidade de manutenção das células espermáticas por períodos de 24 e 48 horas.

Diante da vasta divergência de resultados, faz-se necessário maior entendimento da fisiologia espermática, assim como dos eventos advindos do processo de refrigeração sobre a membrana plasmática, acrossoma e DNA. Levando a crer que, com o maior conhecimento dos danos a estas estruturas, será possível estabelecer os diluentes e a metodologia que melhor se presta à conservação do sêmen ovino sob refrigeração.

2.4 Inseminação Artificial

Durante o procedimento de inseminação artificial (IA), as tentativas de superar a barreira cervical na ovelha e alcançar o útero têm sido inúmeras, uma vez que a anatomia da cérvix desta espécie, por apresentar pregas cartilaginosas em diferentes direções e planos, torna praticamente impossível a inseminação intrauterina através da abordagem vaginal (SOUZA et al., 1994; BALDASSARRE, 1995; DIÓGENES et al., 2001; NAQVI et al., 2001).

Os espermatozóides submetidos à refrigeração ou congelamento apresentam reduzida fertilidade após a inseminação cervical, quando comparados ao sêmen fresco ou a

inseminação intrauterina por laparoscopia (MAXWELL e SALAMON, 1993b; MAXWELL e WATSON, 1996). Segundo Milczewski et al. (2000b) e Watson (2000), o sêmen ovino refrigerado apresenta capacidade fertilizante satisfatória desde que seja depositado o mais próximo do sítio de fertilização. A laparoscopia é, atualmente, a técnica mais utilizada de inseminação artificial intrauterina, apresentando bons resultados de fertilidade (EPPLESTON e MAXWELL, 1995; MILCZEWSKI et al., 2000b; MEDEIROS et al., 2002).

A eficiência da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) é afetada pela variação da ovulação do estro sincronizado (ROMANO et al, 2001; BICUDO et al., 2003). Uribe-Velásques et al. (2002) relatam que a combinação de eCG com os proetágenos resulta em manifestações mais rápidas e uniformes do estro e da ovulação. Para Evans e Maxwell (1990), a inseminação artificial cervical com tempo pré-determinado deve ser realizada dentro de 48 a 58 horas após a remoção da esponja vaginal, sendo geralmente utilizada uma única inseminação, aproximadamente 55 horas após término do tratamento de sincronização.

Em seus trabalhos, Menchaca et al. (2005) obtiveram melhores taxas de prenhez para IATF, com IA cervical, às 48 horas (34,7%) do que às 54 horas (10,6%). Todavia, Medeiros et al. (2002) obtiveram índices de 60,82% de prenhez para IA realizada entre 50 e 55 horas após a retirada das esponjas vaginais. Em contrapartida, Bicudo et al. (2003) citam melhores resultados para a IA realizada 60 horas após a retirada do progestágeno, quando comparado àqueles obtidos às 48 horas.

Intervalos menores entre a retirada dos pessários vaginais e a inseminação artificial têm sido observados ao se associar protocolos de superovulação, uma vez que, o estímulo ao recrutamento de um grupo de folículos determina aumento da taxa de ovulação, reduzindo o tempo decorrido do estro ao momento dessas ovulações (McEVOY et al., 1996). Em fêmeas superovuladas, o intervalo entre a remoção do progestágeno e a inseminação deverá ser de 36 a 48 horas, para sêmen fresco, e de 44 a 48 horas para sêmen congelado (BETTENCOURT, 1999). É sugerido por Salamon e Maxwell (2000) para o sêmen preservado o intervalo de 44 a 64 horas após a retirada do progestágeno. Em seu trabalhos Lymberopoulos et al. (2001) propuseram o tempo de 24 e 28 horas após o início do estro para inseminações intrauterina, obtendo 81,0 e 82,8% de oócitos fecundados em ovelhas superovuladas, respectivamente.

Determinando um tempo fixo para IA de 40 horas após a remoção do pessário intravaginal, Rexroad Junior e Powell (1991) verificaram, em duas experimentações seqüenciais, taxas de 82,8 e 96,4% de oócitos fertilizados. Jabbour e Evans (1991) realizaram inseminações intrauterina 24, 48 e 64 horas após a retirada do implante intravaginal e obtiveram valores médios de estruturas fertilizadas de 60,0; 93,7 e 87,8% para cada momento

de inseminação. Todavia, Maxwell et al. (1993) relataram índices de fertilização de 45,0 e 22,0% para 44 horas e de 38,0 e 19,0% para as 68 horas, em inseminações no oviduto e intrauterina, respectivamente.

2.5 Fertilização

A fusão dos gametas masculino e feminino só ocorre no terço médio da tuba uterina. Desta forma, deve haver a migração tanto de espermatozóides quanto do oócito para este local. As tubas uterinas conduzem os gametas em direção oposta quase simultaneamente, através dos movimentos peristálticos e antiperistálticos. O transporte dos espermatozóides até a ampola dar-se pela sua motilidade ou pelo relaxamento da junção istmo-ampola, e para oócito nos primeiros milímetros da ampola, este transporte é efetuado pela presença dos cílios, sendo mais rápida do infundíbulo à junção istmo-ampolar, do que através do istmo (HAFEZ, 1995).

A capacidade fertilizante do oócito é perdida rapidamente ao aproximar-se do istmo, apresentando-se infértil ao atingir o útero (HAFEZ, 1995). Nas trompas, o período de sobrevivência espermática é de difícil estimativa, mas, caso permaneçam móveis, eles podem migrar para a cavidade peritoneal. Por conseguinte, a capacidade fertilizante destas células é perdida antes do término de sua motilidade (HAFEZ, 1995), que é mantida pelo dobro do tempo de sua atividade fertilizante (DUKES, 1984). Mesmo assim, para que haja a fertilização do oócito, se faz necessária a capacitação dos espermatozóides durante o trajeto no trato reprodutivo feminino, e a reação acrossomal quando no contato com a zona pelúcida (HAFEZ, 1995).

As falhas na fertilização poderão ser de várias ordens, pois há muitos fatores que interagem simultaneamente para o sucesso ou entrave do processo. Poderá haver interferência por parte da fêmea em responder à ação hormonal, desde um bom recrutamento e crescimento folicular, até a maturação do oócito a ser fecundado. Bem como nas limitações a pequenas correções do material genético masculino (TWIGG et al., 1998). Segundo Hawk (1983), a sobrevivência e o transporte espermático no trato reprodutivo de ovelhas são reduzidos drasticamente quando o estro é induzido com progestágenos ou prostaglandina F_{2α}.

O sêmen deve apresentar boa resistência espermática às diversas etapas durante o trajeto no trato genital masculino e feminino; responder ao estímulo para capacitação espermática e sofrer a reação acrossomal apenas quando em contato com a zona pelúcida; bem como, carregar e transmitir um DNA íntegro e viável para a replicação. Arruda et al. (2005) descreveram que após a IA, o sêmen no trato genital da fêmea deve atravessar útero, oviduto, barreiras seletivas das junções útero-tubárica e istmo-ampolar, interagir com o epitélio do oviduto e fertilizar o oócito, sendo requisitos para isto que possua morfologia, atividade metabólica e membranas celulares normais.

Alterações na fluidez da membrana plasmática poderão ocasionar precoce capacitação espermática e conseqüente reação acrossomal (SALAMON e MAXWELL, 2000). É sabido que o processo de criopreservação induz a uma prematura capacitação (MAXWELL E WATSON, 1996; WATSON, 2000). Conseqüentemente, os espermatozóides somente seriam viáveis em um curto período de tempo, no trato reprodutivo da fêmea, e teriam menor oportunidade de fecundação dos ovócitos (WATSON, 1981). Todavia, foi demonstrado por Lausmann et al. (2004), que o plasma seminal confere proteção aos espermatozóides ovinos, prevenindo reações de acrossoma no sêmen descongelado.

Azevedo (2006) verificou que há um maior ou menor grau de suscetibilidade das células espermáticas de alguns indivíduos em apresentarem esta capacitação após exposição ao frio. Este mesmo autor sugeriu uma classificação dos indivíduos em grau de sensibilidade a esta reação. Segundo Bicudo et al. (2002), pode ocorrer a interação de fatores relacionados a uma menor proteção conferida pelo meio, que se combina a condições desfavoráveis para a fertilização, quando se utiliza o estro induzido.

Foi reportado por Rocio Sartori (2004) que a baixa taxa de fertilização de fêmeas bovinas superovuladas é conseqüência de alguns efeitos adversos do tratamento, podendo decorrer no distúrbio do transporte de espermatozóides e ovócitos, na qualidade ovocitária inferior devido a má maturação ou possíveis transtornos as células da granulosa, comprometendo a fertilização e a viabilidade embrionária. Segundo Freitas (2003), o sucesso na fertilização de ovelhas doadoras depende do sincronismo entre o momento da inseminação e a ovulação, este mesmo autor, cita taxas de fecundação de 10% com a IA transcervical e 93% para IA laparoscópica. A falha na fertilização de oócitos provenientes de ovelhas superovuladas também tem relação com o local de deposição do sêmen, sendo observada uma variação das taxas de fertilização de 70 a 90% na IA intrauterina (LYMBERPOULOS et al., 2001).

3 Referências

ALVAREZ , J.G.; STOREY, B.T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a model of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 13, n. 3, p. 232-241, 1992.

ARRUDA R.P. et al. Importância da qualidade do sêmen em **programas de IATF e TETF**. **Acta Scientiae Veterinariae**. Porto Alegre, v. 33, p. 145-150, 2005. Suplemento.

AZEVEDO, H.C. **Integridade e funcionalidade dos espermatozoides ovinos submetidos à criopreservação após a incorporação de colesterol, desmosterol, ácido oléico-linoléico e alfa-lactoalbumina**. 2006. 195 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. Disponível em: <http://lib2.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/bbo/33004064022P3/2006/azevedo_hc_dr_botfmv_z%20.pdf>. Acesso em: 05 jul. 2008.

BALDASSARRE, H. Avances en reproduccion asistida en ovinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, v. 1, 1995, p. 156-168.

BARBAS, J.P. et al. Influência do diluidor de sêmen, época e exploração, nos resultados da inseminação artificial em ovelhas de raça Saloia. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 98, n. 549, p. 59-63, 2004.

BEDFORD, S.J. et al. Effect of seminal extenders containing egg yolk and glycerol on motion characteristics and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v. 43, n. 5, p. 955-967, 1995.

BERNARDI, M.L. Produção *in vitro* de embriões ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, p. 1-16, 2005. Suplemento.

BETTENCOURT, E.M.V. et al. Utilização da inseminação artificial em raças ovinas autóctones do sul de Portugal. In: CONGRESSO IBÉRICO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1., 1997, Estoril. **Proceedings...** Estoril: Federação Ibérica de Reprodução Animal, v. 2, p. 431-436, 1997.

BETTENCOURT, E.M.V. **Caracterização de parâmetros reprodutivos nas raças ovinas Merina branca, Merina preta e Campaniça.** 1999. 126 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 1999.

BICUDO, S.D.; SOUSA, D.B.; TAKADA, L. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado e biotécnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 120-127, 2003.

BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C.; MAIA S.M. et al. Avanços na criopreservação do sêmen ovino visando sua aplicação em programas de inseminação artificial e em biotecnologias com embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, n. 3, p. 787-798, 2007. Suplemento

BILODEAU, J.F. et al. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular, Reproduction and Development**, New York, v. 55, n. 3, p. 282-288, 2000.

CAMPOS, A.C.N. et al. Resfriamento a + 4 °C do sêmen caprino diluído em água de coco. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 25, n. 1, p. 430-431, 2001.

De LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes; and II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 13, p. 368-386, 1995.

DIAS CORREIA, A.A.; DIAS CORREIA, J.H.R. Bioquímica da espermatogênese e do sêmen. In: _____. **Bioquímica animal**. 2. ed., Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1985. cap. 3, p. 829-836.

DIÓGENES, B.O.P. et al. Biometria do aparelho reprodutivo de ovelhas deslanadas e caprinos Sem Raça Definida (SRD) no semi-árido do Nordeste Brasileiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 25, n. 2, p. 149-151, 2001.

EHLING, C. et al. Laparoscopial intrauterine insemination with different doses of fresh, conserved, and frozen semen for the production of ovine zygotes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 60, n. 4, p. 777-787, 2003.

EPPLESTON, J.; MAXWEEL, W.M.C. Sources of variation in the reproductive performance of ewes inseminated with frozen-thawed ram semen by laparoscopy. **Theriogenology**, Stoneham, v. 43, n. 4, p. 777-788, 1995.

EVANS, G.; MAXWEEL, W.M.C. **Salamon`s inseminación artificial de ovejas y cabras**. Zaragoza: Acribia, 1990. 192 p.

FIGUEIRÊDO, E.L. et al. Fertilidade de cabras inseminadas artificialmente com sêmen refrigerado a 4°C e conservado por até 24 horas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, n. 5, p. 118-120, 2002. Suplemento.

FREITAS, V.J.F. Superovulation and embryo transfer in goat and cheep. **Acta Scientiae Veterinaeiae**, Porto Alegre, v. 31, p. 97-105, 2003. Suplemento.

GONZALES, C.I.M; NEVES, J.P.; SILVA, C.A.M. Determinação do sódio, potássio, cálcio e magnésio no plasma seminal ovino em diferentes tempos de incubação do sêmen a + 37° C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 8, n. 3, p. 174-178, 1984.

GONZALES, C.I.M; NEVES, J.P. Avaliação biológica e determinação da frutose e ácido cítrico no plasma seminal ovino em diferentes tempos de incubação do sêmen a + 37° C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 8, n. 3, p. 166-173, 1984.

GUERRA, F.F.A.; NUNES, J.F. Fertilidade *in vivo* e avaliação *in vitro* do sêmen ovino resfriado e conservado em água de coco por 72 horas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 23, n.3, p. 287-289, 1999.

GUSMÃO, A.L.; ANDRADE MOURA, J.C. Transferência de embriões em caprinos e ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, p. 29-32, 2005. Suplemento.

GIRÃO, R.N.; MIES FILHO, A. Teores de frutose e de ácido cítrico no sêmen de carneiros da raça Corriedale, submetidos a fotoperíodo e temperatura naturais e artificiais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 13, n. 3, 137-142, 1989.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 6. ed. São Paulo: Manole, 1995. 582 p.

HAWK, H.W. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 66, n. 12, p. 2645-2660, 1983.

ISACHENKO, E. et al. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. **Human Reproduction**, Oxford, v. 19, n. 4, p. 932-939, 2004.

JABBOUR, H.N.; EVANS, G. Fertility of superovulated ewes following intrauterine or oviducal insemination with fresh or frozen-thawed semen. **Reproduction, Fertility and Development**, Paris, v. 3, n. 1, p. 1-7, 1991.

JANSSEN, Y.M. et al. Cell and tissue responses to oxidative damage. **Laboratory Investigation**, Hagerstown, v. 69, n. 3, p. 261-274, 1993.

JOBIM, M.I.M. et al. Inseminação artificial em ovinos com sêmen refrigerado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 11, n. 4, p. 163-167, 1987.

KOLB, E. A fisiologia da reprodução. In: **Fisiologia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 1984. cap 16, p. 374-412.

LAPWOOD, K.R.; MARTIN, I.C.A.; ENTWISTLE, K.M. The fertility of merino ewes artificially inseminated with semen diluted in solutions based on skim milk, glucose or ribose. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 23, n. 3, p. 457-466, 1972.

LUIS RUIZ, G. et al. Efecto de dos antioxidantes (tempo y tempol) en la criopreservación de semen ovino empleando un dilutor en base a tris. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru**, Lima, v. 18, n. 2, p. 99-106, 2007.

LUZ, S.L.N.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D. Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science** São Paulo, v. 37, n. 2, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962000000200010&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 14 jun. 2007. No prelo.

LYMBEROPOULOS, A.G. et al. Fertilization and embryo recovery rates in superovulated chios ewes after laparoscopic intrauterine insemination. **Theriogenology**, Stoneham, v. 55, n. 9, p. 1855-1862, 2001.

MACHADO, M.M.; VIEIRA, F.V. Biossegurança e qualidade sanitária em centro de coleta e processamento de sêmen bovino e bubalino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 25, n. 3, p. 384-386, 2001.

MAIA, M.S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ros) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (oep), trolox-c e catalase**. 2006, 165 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu.

MANN, T **Biochemistry of semen and of the male reproductive tract**, London: Methuen, 1964. p. 36-46.

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. et al. Fertility of superovulated ewes after intrauterine or oviducal insemination with low numbers of fresh or frozen-thawed. **Reproduction, Fertility and Development**, Paris, v. 5, n. 1, p. 57-63, 1993a.

MAXWELL, W.M.C.; SALAMON, S. Liquid storage of ram semen: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, Paris, v. 5, n. 6, p. 613-638, 1993b.

MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 55-65, 1996.

McEVOY, T.G. et al. The effect of time of intrauterine insemination on the development and viability of embryos collected from superovulated ewes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 46, n. 4, p. 727-738, 1996.

MEDEIROS, A .L.N. et al. Inseminação laparoscópica a campo em ovelhas mestiças no sertão central do Ceará (dados preliminares). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, n. 5, p. 84-86, 2002. Suplemento.

MENCHACA, A.; PINCZAK, A.; QUEIROLO, D. Storage of ram semen at 5°C: effects of preservation period and timed artificial insemination on pregnancy rate in ewes. **Animal Reproduction**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 195-198, 2005.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 5 ed. Porto Alegre: Sulina, 1982. v. 1-2, 783 p.

MIES FILHO, A. et al. Estudo sobre inseminação artificial com sêmen congelado em ovinos no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 10, n. 4, p. 235-245, 1986.

MILCZEWSKI, V.; KOZICKI, L.E.; NEVES, J.P. Viabilidade do sêmen ovino refrigerado em diferentes diluentes. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 5, n. 20, p. 29-33, 2000a.

MILCZEWSKI, V. et al. Inseminação artificial intrauterina e cervical em ovelhas utilizando sêmen refrigerado. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 5, n. 20, p. 35-39, 2000b.

MORAES, C.N. et al. Criopreservação do sêmen ovino em *pellets* com etileno glicol. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 2, p. 287-292, 1998.

NAQVI, S.M.K. et al. Development and application of ovine reproductive technologies: an Indian experience. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 39, n. 3, p. 199-208, 2001.

NUNES, J.F.; FELICIANO SILVA, A.E.D. Tecnologia do sêmen resfriado em caprinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 8, n. 2, p. 121-127, 1984.

OJIMA, A.L.R.O.; BEZERRA, L.M.C.; OLIVEIRA, A.L.R. Caprinos e ovinos em São Paulo atraem argentinos. **Análise e Indicadores do Agronegócio**, São Paulo, v. 1, n. 1, jan. 2006. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=4462>>. Acesso em: 30 mai. 2006.

OCHSENDORF, F.R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 5, n. 5, p. 399-420, 1999.

OLIVEIRA, J.F.C.; NEVES, J.P.; LUZ, S.L.N. Utilização de orvus es paste e beta-amilase no congelamento de sêmen ovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 12, n. 2, p. 107-113, 1988.

PAGANINI FILHO, P. et al. Viabilidade do sêmen ovino frente a três diluentes em temperatura de 37°C e sob refrigeração. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 21, n. 2, p. 61-64, 1997.

PALHÃO, M.P. et al. Uso do sêmen resfriado em programas de inseminação artificial em caprinos. **O Embrião**, v. 10, n. 26, p. 6-7, 2006.

PAPA F.O. et al. Inovações metodológicas na biotecnologia de refrigeração e congelamento de sêmen equino. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, p. 19-27, 2005. Suplemento.

PETRUZZI, V.; TARANTINI, S.; ROYCHOUDHURY, P.N. Effect of different semen diluents on survival of ram spermatozoa at 5°C. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, Berlin, v. 23, n. 7, p. 556-561, 1976.

REXROAD JÚNIOR, C.E.; POWELL, A.M. FSH injections and intrauterine insemination in protocols for superovulation of ewes. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 69, n. 1, p. 246-251, 1991.

ROBERTSON, L.; WATSON, P.F. The effect of egg yolk on the control of intracellular calcium in ram spermatozoa cooled and stored at 5°C. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 15, n. 3-4, p. 177-187, 1987

ROCÍO SANDOVAL, M. et al. Criopreservación de semen ovino empleando tres dilutores y cuatro combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, Lima, v. 18, n. 2, p. 107-114, 2007.

ROMANO, J.E.; ABELLA, D. F.; VILLEGAS, N. A note on the effect of continuous ram presence on estrus onset, estrus duration and ovulation time in oestrus synchronized ewes. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 73, n. 3, p. 193-198, 2001.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Review. Frozen storage of ram semen. I Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**. Amsterdam, v. 37, n. 3-4, p. 185-249, 1995a.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**. Amsterdam, v. 62, n. 1-3, p. 77-111, 2000.

SAMPAIO NETO, J.C. et al. Efecto de la utilización del agua de coco (*Cocos nucifera* L.) en la refrigeración de espermatozoides equinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, n. 5, p. 134-137, 2002. Suplemento.

SARTORI, R. Fertilização e morte embrionária em bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, n. 32, p. 35-50, 2004. Suplemento.

SCHINDLER, H.; AMIR, D. Longevity of ram sperm in various diluent and at different dilution rates. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.56, n. 20, p. 183-189, 1961.

SIKKA, S.C.; RAJASEKARAN, M.; HELLSTROM, W.J. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 16, n. 6, p. 464-481, 1995.

SOUSA, D.B., BICUDO, S.D. Desempenho do Equitainer na refrigeração do sêmen ovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 166-168, 2002.

SOUZA, M.I.L.; LUZ, S.L.N; GONÇALVES, P.B.D. Inseminação transcervical com sêmen congelado em ovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 24, n. 3, p. 597-602, 1994.

SWENSON, M.J. Processos reprodutivos no macho. In: _____. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**, 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1984. cap. 50, p. 719-730.

TWIGG, J.P.; IRVINE, D.S.; AITKEN, R.J. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, Oxford, v. 13, n. 7, p. 1864-1871, 1998.

URIBE-VELÁSQUEZ, L.F. et al. Respostas endócrinas e ovarianas associadas com o folículo dominante da primeira onda folicular em ovelhas sincronizadas com CIDR ou PGF2 α . **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 2, p. 944-953, 2002. Suplemento.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 62, n. 1-3, p. 23-53, 2000.

VOGLMAYR, J.K. et al. Metabolism of testicular spermatozoa and characteristics of testicular fluid collected from conscious rams. **Journal of Reproduction Fertility**, Cambridge, v. 14, n. 1, p. 87-99, 1967.

WATSON, P. F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. **Journal of Reproduction Fertility**, Cambridge, v. 62, n. 2, p. 483-492, 1981.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, Paris, v. 7, n. 4, p. 871-891, 1995.

WOLF, A.; GABALDI, S.H.; PAPA, F.O. Viabilidade espermática pós-descongelção de sêmen bovino criopreservados com meio diluente glicina-gema em quatro diferentes tempos de estabilização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte v. 23, n. 3, p. 262-264, 1999.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60, n. 1, p. 481-492, 2000.

4 Experimentos

4.1 Viabilidade *in vitro* das células espermáticas ovinas após refrigeração utilizando diferentes diluentes¹

(In vitro viability of ovine sperm cells after refrigeration using different extenders)

B.P.A. Sousa^{2*}, J.C.O. Andrade³, A. Wischral⁴, M.M.P. Guerra⁴

² Mestranda do Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal Rural de Pernambuco – Brasil

³ Médico Veterinário – Mestre em Medicina Veterinária – Recife – Pernambuco – Brasil

⁴ Professora do DMV da Universidade Federal Rural de Pernambuco – Brasil

RESUMO

Neste estudo objetivou-se avaliar a viabilidade *in vitro* das células espermáticas após a adição de três diluentes comerciais, em comparação com o diluente tradicional Tris-gema, utilizados no processo de refrigeração do sêmen ovino, em até 48 horas de armazenamento. Foram utilizados três ejaculados diários, obtidos de três reprodutores Dorper com vagina artificial, em três repetições com intervalo de 3 dias. O sêmen foi mantido a 30 °C e foram avaliadas as características macro e microscópicas. Após formação do *pool* repetiram-se estas avaliações acrescidas da concentração espermática, integridade do DNA e do acrossoma. Dividiu-se o *pool* em cinco grupos, cada um constituído de uma parte de sêmen para três partes dos respectivos diluentes: Equimix (DI), Laiciphos Green Ovino (DII), FR 4 (DIII), Equimix-Gema- Equimix com gema de ovo (DIV) e Tris-Gema (DV). Cada grupo foi subdividido em quadruplicata, refrigerado e mantido a 4 °C até as avaliações (MIP, vigor, integridade do DNA e do acrossoma) correspondendo a 0, 12, 24, 36 e 48 horas. Nas avaliações do sêmen o DI apresentou maior queda de MIP às 12 h em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Às 24 h os grupos DII, DIV e DV apresentaram a melhor MIP ($p < 0,05$), não divergindo ($p > 0,05$) entre si, enquanto que às 48 h o DII e o DV foram superiores ($p < 0,05$) aos demais. Com relação ao vigor, os grupos DII e DV apresentaram valores superiores ($p < 0,05$) ao DI e DIII a partir das 12 horas e ao DIV a partir das 24 horas ($p < 0,05$). Concluiu-se que o diluente Laiciphos Green Ovino, da mesma forma que o Tris-Gema, pode ser utilizado na conservação do sêmen a 4 °C por 48 horas; enquanto o Equimix, acrescido de 20% de gema de ovo, recomenda-se que seja utilizado no armazenamento do sêmen (4 °C) por até 24 horas.

PALAVRAS-CHAVE: ovino, sêmen, diluidor, resfriamento.

¹ Formação de acordo com a Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia - ISSN 0102-0935 versão impressa

* Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: bpastoras@hotmail.com

ABSTRACT

The aim of the present study was to assess the *in vitro* viability of sperm cells following the addition of three commercial extenders in comparison to the traditional Tris-Yolk extender used in the refrigeration process of ovine sperm in up to 48 hours of storage. Three ejaculates were used daily, obtained from three Dorper breeders using an artificial vagina, in three repetitions with a three-day interval. The semen was kept at 30 °C and both macroscopic and microscopic characteristics were evaluated. After pooling the sample, these evaluations were repeated together with an assessment of sperm concentration, DNA integrity and acrosome integrity. The pool was divided into five groups, each made up of one part semen and three parts of the respective extenders: Equimix (EI), Laiciphos Green Ovine (EII), FR 4 (EIII), Equimix-Yolk (Equimix with egg yolk - EIV) and Tris-Yolk (EV). Each group was subdivided in quadruplicate, refrigerated and kept at 4 °C until evaluations (MIP, vigor, DNA integrity and acrosome integrity) at 0, 12, 24, 36 and 48 hours. EI exhibited the greatest drop in MIP at 12 h ($p < 0.05$). At 24 h, EII, EIV and EV exhibited the best MIP ($p < 0.05$), with no differences between one another ($p > 0.05$). At 48 h, EII and EV had the best MIP values ($p < 0.05$). Regarding vigor, EII and EV had better values ($p < 0.05$) in comparison to EI and EIII at 12 h and in comparison to EIV at 24 h ($p < 0.05$). It was concluded that, like Tris-Yolk, the Laiciphos Green Ovine extender can be used in the conservation of semen at 4 °C for up to 48 hours, whereas Equimix with 20% egg yolk is recommended for use in the storage of semen (4 °C) for up to 24 hours.

KEYWORDS: ovine, semen, extender, refrigeration.

INTRODUÇÃO

Na busca ao melhoramento genético de um rebanho, a inseminação artificial (IA) apresenta-se como a primeira biotécnica a ser implantada, em virtude do menor investimento e da simplicidade, quando comparado às demais biotecnologias. Todavia, a sua eficiência envolve inúmeros fatores, sendo a preservação da viabilidade das células espermáticas um ponto crucial para o sucesso de sua aplicação.

O simples fracionamento de um ejaculado amplia o aproveitamento do germoplasma masculino (MIES FILHO, 1982), e a adição de meios diluentes proporciona sua otimização. As possibilidades de emprego do sêmen ovino aumentam, consideravelmente, com a metodologia e a solução preservadora empregadas durante a sua manipulação. Sendo assim, diversas formulações são propostas para a composição do diluente, objetivando a conservação por longos períodos da capacidade fecundante das células espermáticas armazenadas *in vitro* (SALAMON e MAXWELL, 1995a).

O frio, na faixa dos 5 a 0°C, é um importante agente conservador por promover a redução do metabolismo celular próximo ao estágio de quiescência, propiciando a estocagem prolongada e o transporte do sêmen (PALHÃO et al., 2006). Todavia, este mesmo agente também é promotor de lesões nas membranas espermáticas, tornando imprescindível o

controle da diminuição de temperatura (EVANS e MAXWELL, 1990) e o uso de substância lipoprotéica que determine proteção contra o choque térmico (SALAMON e MAXWELL, 2000). Na refrigeração do sêmen utiliza-se a gema de ovo e o leite como fonte lipoprotéica, elementos necessários à sobrevivência dos espermatozóides (EVANS e MAXWELL, 1990; VISHWANATH e SHANNON, 2000), existindo várias indicações de proporções na composição do meio diluente (MAXWELL e SALAMON, 1993).

As propriedades básicas de um bom diluente são: pH e osmolaridade próximos ao fisiológico, capacidade de prevenir a capacitação precoce e proteger de eventuais crioinjúrias (SALAMON e MAXWELL, 1995a). A biossegurança também é fundamental durante o processamento do sêmen, refletindo diretamente na eficiência da aplicação desta biotecnologia. Logo, se faz necessário, dentre outros fatores, a obtenção de meios diluentes estéreis e de boa qualidade (MACHADO e VIEIRA, 2001).

Dentro deste contexto, os diluentes comerciais além de contribuírem para a maior praticidade do emprego da IA, apresentam o controle dos componentes durante o processo de fabricação, constituindo uma garantia quanto ao período de conservação das características e da segurança do produto. Diante do exposto, objetivou-se avaliar a viabilidade *in vitro* das células espermáticas após a adição de três diluentes comerciais, em comparação com o diluente tradicional Tris-Gema, utilizados no processo de refrigeração do sêmen ovino em até 48 horas de armazenamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Como doadores de sêmen foram utilizados três carneiros da raça Dorper, com idade variando entre 1 e 3 anos, comprovadamente férteis, criados em regime intensivo com arraçoamento de feno Tyfton, suplementados com 500g de concentrado/animal/dia, além de sal mineral e água *ad libitum*. Cada animal foi submetido a colheitas diárias de sêmen com vagina artificial, utilizando como manequim fêmea em estro, a intervalo de três dias, em três blocos de repetições, totalizando 27 ejaculados. Os ejaculados que apresentaram as características macroscópicas (volume, cor e aspecto) dentro dos padrões normais (FONSECA et al., 1992) foram imediatamente colocados em banho-maria a 30 °C. Uma alíquota de sêmen foi submetida à avaliação em lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37 °C em microscópio com platina aquecedora na mesma temperatura; foram aprovadas as amostras que apresentaram o valor mínimo: de 3 (0-5) para turbilhonamento, 70% para motilidade individual progressiva (MIP) e 3 (0-5) para o vigor espermático (FONSECA et al., 1992).

Para o estudo, formou-se um *pool* com três ejaculados de cada animal e foram repetidas as avaliações macro e microscópica anteriormente descritas. Também foram obtidas, deste *pool*, alíquotas para estimar o pH² do sêmen, e avaliar a concentração espermática e integridade do DNA (EVENSON et al., 1999) e do acrossoma (ROTH et al., 1998). Em seguida, dividiu-se o *pool* em cinco amostras iguais, que foram diluídas na proporção 1:3 (sêmen:diluyente) para constituir os seguintes grupos experimentais: Equimix^{®3} (DI), Laiciphos Green Ovine^{®4} (DII), FR-4^{®3} (DIII), Equimix-Gema⁵ (DIV) e Tris-Gema (EVANS e MAXWELL, 1990) - controle (DV). Foram utilizadas para os grupos DII, DIV e DV partes iguais de um homogeneizado de gema de ovo fresca, de no máximo três dias. A aferição do pH dos cinco meios realizou-se com pHmetro digital⁶, antes de proceder às diluições.

Após diluição, as amostras de sêmen foram subdivididas e refrigeradas em quadruplicata. Os tubos contendo sêmen diluído foram colocados em recipiente de porcelana contendo água à temperatura 30 °C e o conjunto levado ao refrigerador (4 °C), momento em que foi adicionado gelo. A diminuição da temperatura da água até 4 °C, monitorada com auxílio de termômetro digital⁷, ocorreu gradativamente em 180 minutos e as alíquotas de sêmen foram mantidas nesta temperatura até o momento de sua avaliação, correspondendo a 0, 12, 24, 36 e 48 horas de refrigeração. Previamente à avaliação, as amostras foram aquecidas e estabilizadas em banho-maria a 30 °C, sendo então submetidas às análises dos parâmetros: MIP, vigor (em lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37 °C com platina isotérmica) e processada as amostras para a realização da integridade do DNA e do acrossoma.

Para o teste de integridade do DNA, as alíquotas (10µL) foram colhidas imediatamente após a diluição (0 hora) e a intervalo de 12 horas (12, 24, 36 e 48 horas) de refrigeração, sendo diluídas com 990 µL de TNE (0,15 M NaCl, 0,01 M tris-HCl, 0,001 M EDTA (dissódico), pH 7,4), submetidas ao congelamento no vapor de nitrogênio líquido (N₂) e armazenadas a - 20 °C. Para a avaliação, as amostras foram descongeladas a 37 °C e 100µL de amostra de cada grupo foram transferidos para microtubos vazios resfriados em gelo. Em seguida, foram adicionados 200µL de solução ácido detergente (0,08 M 1N HCl, 0,15 M NaCl, 0,1% Triton X-100, pH 1,2) e, passados 30 segundos, foram acrescidos 600µL da

² Merck – PAP Indic pH 0-14 (Merck- Alemanha)

³ Nutricell – Nutrientes Celulares LTDA

⁴ IMV – IPV Brasil LTDA.

⁵ Equimix adicionado de 20% de gema de ovo

⁶ Ph100 da Phtek[®]

⁷ Incoterm[®] (-50 a 70 °C)

solução de laranja de acridina⁸ (AO) [60µL 1mg/mL AO/10mL 0,037 M ácido cítrico, 0,126 M Na₂HPO₄, 0,0011 M EDTA (dissódico), 0,15 M NaCl; pH 6,0]. Após 3 minutos da adição da sonda fluorescente, utilizou-se uma gota (10µL) destas amostras para preparações úmidas, entre lâmina e lamínula. A leitura foi realizada imediatamente em microscópio de fluorescência (microscópio Olympus BX 41[®] - Japão). Foram contadas 200 células e classificadas segundo Evenson et al. (1999), sendo que as células que emitiram fluorescência verde foram consideradas normais, ou seja, com cromatina íntegra, enquanto as células que emitiram fluorescência vermelha ou laranja no interior da cabeça foram consideradas anormais, o que significa desnaturação total ou parcial da cromatina.

Para o teste de integridade do acrossoma foram retiradas alíquotas (5µL) de cada grupo, nos momentos 0, 12, 24, 36 e 48 horas, para o preparo dos estiraços secados à temperatura ambiente e, em seguida, conservados a 4 °C. No momento da leitura depositou-se sobre cada lâmina 30µL de FITC-PNA⁹ (20µL de FITC-PNA-1mg/mL em 480µL de PBS) e, imediatamente, as lâminas foram colocadas em câmara úmida a 4 °C por 20 minutos em ambiente escuro. As lâminas foram lavadas por imersão em 50mL de PBS¹⁰ uma única vez, e logo depois foram deixadas a secar em ambiente protegido da luz. Posteriormente 5µL de UCD (5 mg Na azide, 0,5 mL PBS, 5 mg p-phenylenediamine¹¹, 4,5 mL glicerol) foram colocados sobre a lâmina, cobertos com lamínula e examinadas em microscópio de fluorescência (microscópio Olympus BX 41 - Japão). Para cada lâmina foram contadas 200 células e classificadas de acordo com critérios sugeridos por Roth et al. (1998) em: a) acrossoma intacto (AI), se o acrossoma apresentar-se corado em verde; b) acrossoma reagido ou danificado (AR), se nenhuma coloração estiver presente ou fosse observada apenas uma faixa verde fluorescente na região equatorial da célula.

A análise dos dados foi realizada através do programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 13, onde foram obtidas as medidas estatísticas: média e desvio padrão (técnicas de estatística descritiva) e foram utilizadas as técnicas estatísticas: (ANOVA) para dois fatores e interação, ANOVA para um fator e ANOVA com um fator para medidas repetidas e teste de Kruskal-Wallis (Técnicas de estatística inferencial). No caso de diferença significativa entre os grupos foram utilizadas comparações de Tukey entre os pares de grupos; no caso de diferença significativa entre os tempos de avaliação foram

⁸ Polysciences Inc

⁹ PNA (Agglutinina de *Arachis hypogea*) conjugada com isotiocionato de fluoresceína – Sigma, USA

¹⁰ Sem adição de antibiótico.

¹¹ Sigma Chemical Company

utilizadas, entre os pares de tempos, as comparações de Bonferroni ou LSD (Least significance difference) no caso de incoerência entre os resultados do teste e das comparações pareadas (Técnicas de estatística inferencial). O nível de significância utilizado nas decisões dos testes estatísticos foi de 5,0%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração espermática média do *pool* foi de $2,9 \times 10^9$ espermatozóides por mL de sêmen e após a respectiva diluição (1:3, sêmen:diluyente) foi obtida uma concentração final de $74,0 \times 10^7$ /mL. A diluição utilizada é comum na rotina (BETTENCOURT et al., 1997; MILCZEWSKI et al., 2000), sendo considerada adequada à conservação das células espermáticas. A adição de meios diluentes tem como finalidade principal aumentar o volume e conferir proteção aos espermatozóides. Logo, a diluição que mantenha uma alta concentração pode conduzir a um maior número de metabólitos, devido ao rápido consumo dos substratos.

O pH do *pool* do sêmen fresco apresentou média de 6,5, estando dentro da variação de 5,9 a 7,3 esperada para a espécie ovina (KOLB, 1984). Nos meios diluentes foram observados os seguintes valores: Equimix - pH 7,0, Laiciphos Green Ovine - pH 6,7, FR 4 - pH 7,0, Equimix-Gema - pH 7,0 e Tris-Gema - pH 6,9. Pelo fato das células espermáticas suportarem oscilações bastante amplas de pH (MIES FILHO, 1982), as diferenças encontradas nos cinco grupos de meios, provavelmente, não proporcionaram alterações que comprometessem a viabilidade dos espermatozóides.

Na Tab. 1 e Fig. 1 estão apresentados os valores de MIP avaliados nos cinco grupos de diluentes. Observou-se nos grupos DI, DIII e DIV redução da motilidade progressiva no decorrer do tempo de armazenamento. Conforme já afirmaram Salamon e Maxwell (1995a) há a redução da motilidade, com a diminuição e posterior aumento da temperatura, bem como, com a própria manipulação do sêmen no decorrer do processo de conservação.

Todavia, no DI se observou os menores valores de MIP, havendo uma forte queda já nas 12 primeiras horas de refrigeração ($p < 0,001$), vindo a demonstrar que o meio diluyente composto apenas por leite não foi favorável à preservação das células espermáticas à temperatura de 4 °C por longo período. Comparando o DI ao DIV, verificou-se uma expressiva proteção aos espermatozóides até 24 horas ($p < 0,001$) ao adicionar a gema de ovo, uma vez que se trata do mesmo meio comercial. Corroborando com afirmativa de Salamon e

Maxwell (1995a), que os meios diluentes contendo a gema de ovo favorecem a conservação em temperaturas mais baixas em virtude da proteção ao choque térmico e da diminuição das alterações degenerativas.

Quando avaliados nas 36 e 48 horas seguintes, os dois grupos DI e DIV não diferiram significativamente ($p > 0,05$). Em contrapartida, Sousa e Bicudo (2002), ao avaliarem o desempenho de dois diluentes para o sêmen ovino a 5 °C por períodos de 48 horas, observaram superioridade no uso do meio Glicina-gema-leite em relação ao Glicose-leite.

O meio Equimix (DI e DIV) é constituído de leite e glicose, mas apresenta também o bicarbonato de sódio, podendo este elemento ter interagido de forma negativa com a motilidade das células espermáticas. Todavia, foi relatado por Gonzáles et al. (1984) que, no sêmen ovino mantido a 37 °C por 90 minutos pós-ejaculação, não ocorrem trocas iônicas significativas do sódio.

Tabela 1 – Valores médios e desvio padrão da motilidade individual progressiva (MIP) de acordo com o diluente e o tempo de armazenamento do sêmen ovino

Variável	Tempo (hora)	Grupos					Valor de p
		(I) Equimix	(II) L. Green	(III) FR-4	(IV) Equimix-Gema	(V) Tris-Gema	
• MIP	0	76,67 ± 10,41 ^(a)	80,00 ± 8,66	80,00 ± 0,00 ^(a)	80,00 ± 5,00 ^(a)	81,67 ± 2,89	$p^{(1)} = 0,915$
	12	35,00 ± 8,66 ^(B, ab)	78,33 ± 7,64 ^(A)	66,67 ± 5,77 ^(A, ab)	75,00 ± 5,00 ^(A, a)	80,00 ± 5,00 ^(A)	$p^{(1)} < 0,001^*$
	24	30,00 ± 5,00 ^(B, ab)	78,33 ± 2,89 ^(A)	58,33 ± 2,89 ^(C, bc)	65,00 ± 13,23 ^(AC, ac)	78,33 ± 2,89 ^(A)	$p^{(1)} < 0,001^*$
	36	16,67 ± 2,89 ^(B, ab)	68,33 ± 2,89 ^(A)	53,33 ± 5,77 ^(AC, bc)	36,67 ± 15,28 ^(BC, bc)	73,33 ± 2,89 ^(A)	$p^{(1)} < 0,001^*$
	48	3,67 ± 2,31 ^(B, b)	61,67 ± 2,89 ^(A)	36,67 ± 7,64 ^(C, c)	10,33 ± 12,86 ^(B, bc)	68,33 ± 2,89 ^(A)	$p^{(1)} < 0,001^*$
Valor de p		$p^{(2)} = 0,004^*$	$p^{(2)} = 0,051$	$p^{(2)} = 0,009^*$	$P^{(2)} = 0,018^*$	$p^{(2)} = 0,057$	

(*): Diferença significante a 5,0%.

(1): Através do teste F (ANOVA) para a comparação entre os grupos segundo o tempo de avaliação e comparações, pareadas de Tukey.

(2): Através do teste F (ANOVA) para medidas repetidas com a comparação entre os tempos de avaliação segundo o grupo através do teste de Bonferroni.

^{ABC}: Letras maiúsculas diferentes representam diferença significante entre os grupos através dos testes de comparações pareadas de Tukey.

^{abc}: Letras minúsculas diferentes representam diferença significante entre os tempos de avaliação para cada grupo através dos testes de comparações pareadas do teste de Bonferroni.

As temperaturas de 30 e 4 °C, utilizadas no presente trabalho, propiciaram baixo e reduzido metabolismo, respectivamente, levando a crer que não tenham transcorrido grandes variações no equilíbrio eletrolítico do sêmen. Além de que, Milczewski et al. (2000) ao trabalharem com o Cornell University Extender, que apresenta em sua fórmula o bicarbonato de sódio (MIES FILHO, 1982a), concluíram que este foi o segundo melhor diluente na preservação do sêmen ovino refrigerado por 8 horas a 5 °C.

Dentre os diluentes comerciais, durante as 48 horas do processo de refrigeração, o DII teve os valores de MIP equivalentes ao DV (controle) e superiores aos demais ($p < 0,001$). Isto pode ser devido ao fato do Laiciphos Green Ovino ser indicado para a espécie em estudo, ou ainda pela presença do colesterol e da lecitina em sua fórmula (MIES FILHO, 1982).

Para o DIV não foram observadas, nos intervalos de 12 e 24 horas, divergências ($p > 0,05$) com o DII e DV, provavelmente devido à adição da gema, mas demonstrou um acentuado declínio a partir das 36 horas de armazenamento ($p < 0,001$). O D III apresentou resultados semelhantes ao DIV com exceção ao tempo de 48 horas. Embora tenha se mostrado inferior ($p < 0,05$) ao DII e DV no tempo de 24 e 48 horas.

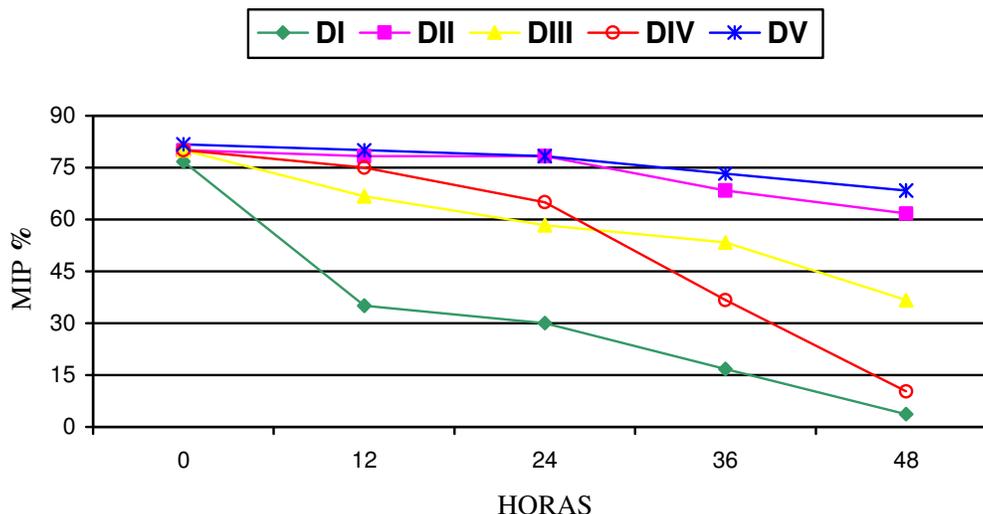


Figura 1 – Porcentagem da motilidade individual progressiva (MIP) de espermatozoides ovino após diluição com cinco diferentes diluentes e mantidos sobre refrigeração a 4 °C durante 48 horas. DI – Equimix, DII – Laiciphos Green Ovine, DIII – FR 4, DIV – Equimix-Gema, DV – Tris-Gema

Vale ressaltar que os diluentes FR 4 (DIII) e o Equimix-Gema (DIV) apresentaram uma superfície oleosa que dificultou a visualização no momento das avaliações, podendo este fato estar relacionado à presença da lactose no DIII e à quantidade de gema de ovo adicionada ao DIV. Nestes dois grupos observou-se uma alta viscosidade do diluente, podendo ter implicado na menor mobilidade dos espermatozoides.

Outro ponto a ser considerado é a osmolaridade, pois a ação negativa das soluções hipertônicas sobre a progressão dos espermatozoides pode chegar a paralisá-los (MIES FILHO, 1982b). Porém, a lactose (DIII) atua extracelularmente mantendo a pressão osmótica durante a estocagem do sêmen (SALAMON e MAXWELL, 2000), e considera-se que as fórmulas comerciais apresentam valor próximo dos 300 miliosmóis, pressão equivalente a do sêmen (HAFEZ, 1995). Neste estudo, esta mensuração não foi realizada e, portanto, não é possível esclarecer se este foi um fator determinante.

Os valores referentes a característica do vigor nos cinco grupos de diluentes estudados (Tab. 2 e Fig. 2), apresentaram no decorrer do tempo, diminuição progressiva nos grupos DI,

DIII e DIV, tornando-se mais evidente (Fig. 2) ao final das 48 horas ($p < 0,05$). As amostras dos grupos DII e DV foram as que mantiveram o vigor ao longo do tempo, com valores aceitáveis e acima dos demais grupos ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Valores médios e desvio padrão do vigor espermático de acordo com o diluente e o tempo de armazenamento do sêmen ovino

Variável	Tempo (hora)	Grupos					Valor de p
		(I) Equimix	(II) L. Grenn	(III) FR-4	(IV) Equimix-Gema	(V) Tris-Gema	
• Vigor	0	4,00 ± 0,00 ^(a)	4,33 ± 0,58	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00 ^(a)	4,00 ± 0,00	$p^{(3)} = 0,406$
	12	3,00 ± 0,00 ^(B, ab)	4,00 ± 0,00 ^(A)	3,33 ± 0,58 ^(B)	4,00 ± 0,00 ^(A, a)	4,00 ± 0,00 ^(B)	$p^{(3)} = 0,024^*$
	24	2,67 ± 0,58 ^(B, ab)	4,00 ± 0,00 ^(A)	3,00 ± 0,00 ^(B)	3,33 ± 0,58 ^(B, ab)	4,00 ± 0,00 ^(B)	$p^{(3)} = 0,023^*$
	36	2,00 ± 0,00 ^(B, ab)	3,33 ± 0,58 ^(AC)	2,67 ± 0,58 ^(BC)	2,33 ± 0,58 ^(B, b)	3,67 ± 0,58 ^(B)	$p^{(3)} = 0,046^*$
	48	1,67 ± 0,58 ^(B, b)	3,00 ± 0,00 ^(A)	2,00 ± 0,00 ^(B)	1,33 ± 0,58 ^(B, b)	3,33 ± 0,58 ^(B)	$p^{(3)} = 0,016^*$
Valor de p		$p^{(2)} = 0,038^*$	$p^{(2)} = 0,099$	$p^{(2)} = 0,063$	$P^{(2)} = 0,029^*$	$p^{(2)} = 0,225$	

(*): Diferença significativa a 5,0%.

(2): Através do teste F (ANOVA) para medidas repetidas com a comparação entre os tempos de avaliação segundo o grupo através do teste de Bonferroni.

(3): Através do teste de Kruskal-Wallis para a comparação entre os grupos segundo o tempo de avaliação e comparações pareadas do teste de Kruskal-Wallis.

^{ABC}: Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa entre os grupos através dos testes de comparações pareadas de teste de Kruskal-Wallis.

^{abc}: Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre os tempos de avaliação para cada grupo através dos testes de comparações pareadas do teste de Bonferroni.

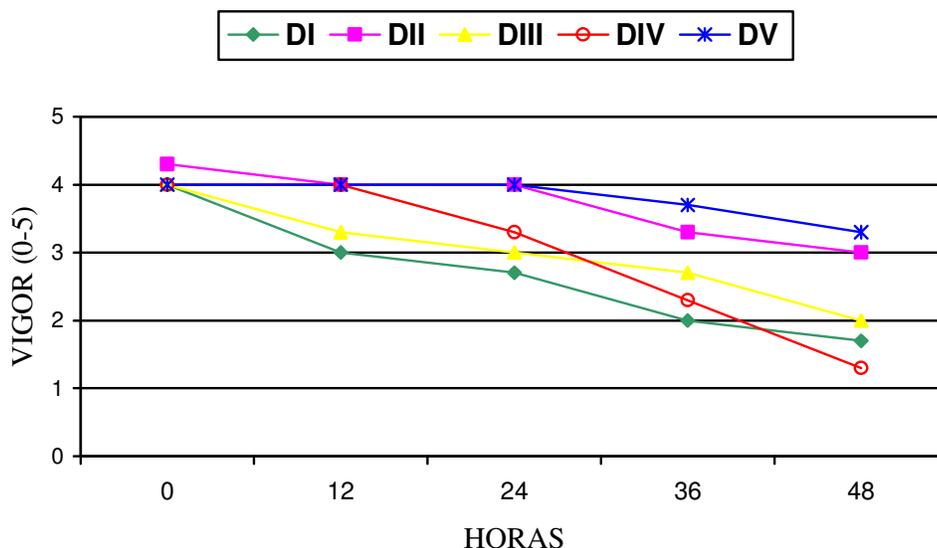


Figura 2 – Vigor espermático de espermatozóides ovino diluído com cinco diferentes diluentes sobre refrigeração a 4 °C, durante 48 horas. DI – Equimix, DII – Laiciphos Green Ovino, DIII – FR 4, DIV – Equimix-Gema, DV – Tris-Gema

Milczewski et al. (2000) ao avaliarem sêmen ovino refrigerado a 5 °C por 8 horas diluído em, Tris-Gema, observaram valores de 42,17% para motilidade e 2,46 para o vigor, sendo estes aquém do encontrado no intervalo de 12 horas para o DV. Estes mesmo autores

obtiveram para o meio constituído de leite desnatado UHT-gema 67,82% e 2,8 de MIP e vigor, respectivamente. Sendo semelhantes aos verificado no DIII e inferior ao resultado do DIV, no momento de 12 horas, que apresentam os mesmos componentes básicos, gema e leite.

Possivelmente esta diferença esta associada à velocidade mais lenta de refrigeração e a água com gelo empregada no presente trabalho. Segundo Evans e Maxwell (1990), a refrigeração do sêmen deverá ocorrer de 2 a 3 horas, de forma gradual, evitando descida rápida principalmente dos 18 a 5 °C, intervalo este em que os espermatozóides são mais sensíveis ao choque térmico, e que o uso do gelo é menos seguro que o uso de água gelada.

As lesões por ação do frio causam desestabilização das membranas plasmáticas dos espermatozóides, podendo resultar em uma reação acrossomal precoce e, por consequência falha na fertilização (EVANS e MAXWELL, 1990). Desta forma, espera-se que o meio diluente promova a preservação do maior número de células espermáticas durante todo o processo de refrigeração do sêmen (WATSON, 1981) e que nenhum de seus compostos interagem negativamente com as camadas da membrana plasmática (WATSON, 1995).

Nos cinco grupos de diluentes (Tab. 3) observou-se elevada porcentagem de células espermáticas com acrossoma íntegro em todos os intervalos avaliados (90,7 a 98,7%), e não se verificou divergência significativa entre os mesmos e tampouco entre o tempo e o diluente ($p > 0,05$). Estes resultados divergem dos relatos de Celeghini (2006), que encontrou 55,3 e 68,8% de espermatozóides bovinos com acrossomas íntegros após congelação/descongelação utilizando dois diferentes meios. E dos valores observado por Esteves et al. (2000), que encontraram uma variação de células espermáticas com acrossoma íntegro no sêmen de homens de 89,3 a 88,2% antes do congelamento e de 66,5 a 72,1% após descongelamento.

A redução da temperatura durante o processo de refrigeração e congelação do sêmen afeta as bombas adenosina trifosfato dependentes, dentre elas, a de Na⁺/K⁺, provocando despolarizações parciais das membranas, tornando-as permeáveis ao cálcio. E isto induz a uma vesiculação prematura da membrana acrossomal (BICUDO et al., 2007). Todavia, Azevedo (2006), avaliando o sêmen ovino em todas as fases do processamento, concluiu que a congelação/descongelação causa mais danos do que a refrigeração e, constatou haver diferenças entre grupos de indivíduos relacionadas à crioresistência e criocapacitação espermática. Segundo este autor, a refrigeração induz a capacitação, mas não contribui para o aumento da reação acrossomal.

Tabela 3 – Porcentagem de células espermáticas com acrossoma íntegro no sêmen ovino diluído em cinco diferentes diluentes sobre refrigeração a 4 °C durante 48 horas.

Grupo	Acrossoma Íntegro (%)				
	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h
DI	95,2	90,7	94,3	95,2	95,2
DII	94,2	97,7	96,2	94,5	96,2
DIII	98,0	96,7	95,8	96,8	96,5
DIV	96,5	96,3	97,7	97,7	97,2
DV	98,7	95,8	97,2	95,8	98,2

DI – Equimix, DII – Laiciphos Green Ovino, DIII – FR 4, DIV – Equimix-Gema, DV – Tris-Gema

Quanto à integridade do DNA, em todos os grupos foram verificados 100% de células com a cromatina normal. Corroborando com os resultados de Gonçalves (2006), ao verificar que a cromatina dos espermatozoides bovinos criopreservados mostrou-se íntegra quase na sua totalidade, não sendo observada a ação do tempo, do estresse promovido pelos procedimentos de fertilização *in vitro* (FIV) e nem do possível efeito das espécies reativas ao oxigênio (ROS). Segundo Watson (1995), o núcleo espermático é uma estrutura estável, sendo pouco afetada durante o processo de criopreservação.

Embora tenha sido demonstrado que as ROS induzem disfunção mitocondrial, danos ao DNA, RNA e proteínas (COMPORTI, 1989), no presente trabalho não foram evidenciadas tais ações sobre o DNA durante a refrigeração do sêmen ovino a 4 °C até as 48 horas de acondicionamento. Segundo Dutty et al. (2002), a integridade da cromatina do sêmen humano não é afetada nem mesmo na congelação rápida sem crioprotetor e, baseado nos seus estudos, indicaram a criopreservação como forma de conservar uma amostra de sêmen para submetê-la à análise do DNA pelo ensaio cometa.

Foi reportado por Rocha et al. (2002), no sêmen humano, que a coloração com laranja de acridina é menos sensível na detecção de baixa compactação da cromatina, ou seja, lesões mais leves, e que o plasma seminal influencia na atuação do corante. No presente trabalho, não houve a separação do plasma antes da adição dos diluentes, sendo assim, há a possibilidade de ter transcorrido uma interação plasma/corante, bem como, de alguns dos componentes dos meios diluentes.

CONCLUSÃO

O meio diluente Laiciphos Green Ovine pode ser utilizado na conservação do sêmen a 4 °C até 48 horas, da mesma forma que o Tris-gema; enquanto o Equimix, acrescido de 20% de gema de ovo, recomenda-se que seja utilizado no armazenamento do sêmen por até 24 horas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, H.C. Integridade e funcionalidade dos espermatozóides ovinos submetidos à criopreservação após a incorporação de colesterol, desmosterol, ácido oléico-linoléico e alfa-lactoalbumina. 2006, 195f, Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) -Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

BETTENCOURT, E.M.V.; BETTENCOURT, C.M.V.; SIMÕES, J.P.C. et al. Utilização da inseminação artificial em raças ovinas autóctones do sul de Portugal. In: CONGRESSO IBÉRICO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1., 1997, Estoril. *Proceedings...* Estoril: Federação Ibérica de Reprodução Animal, v. 2, 1997, p. 431-436.

BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C.; MAIA S.M. et al. Avanços na criopreservação do sêmen ovino visando sua aplicação em programas de inseminação artificial e em biotecnologias com embriões. *Acta Sci. Vet.*, v. 35, n. 3, p. 787-798, 2007. Suplemento

CELEGHINI, E.C.C. *Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes*. São Paulo, 2006, 188f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

COMPORTI, M. Three models of free radical induced cell injury. *Chem. Biol. Int.*, v.72, n. 1-2, p. 1-56, 1989.

DUTTY, S.M.; SINGH, N.P.; RYAN, L. et al. Realiability of the comet assay in cryopreserved human sperm. *Hum. Reprod.*, v. 17, n. 5, p. 1274-1280, 2002.

ESTEVES, S.C.; SHARMA, R.K.; THOMAS Jr, A.J. et al. Improvement in motion characteristics and acrosome status in cryopreserved human spermatozoa by swim-up processing before freezing. *Hum. Reprod.*, v. 15, n. 10, p. 2173-2179, 2000.

EVANS, G.; MAXWEEL, W.M.C. *Salamon`s inseminación artificial de ovejas y cabras*. Zaragoza: Acribia, 1990, 192 p.

EVENSON, D.P.; JOST, L.K.; MARSHALL, D. et al. Utility of the sperm chromatin structure as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum. Reprod.*, v. 14, n. 4, p. 1039-1049, 1999.

FONSECA, V.O.; VALE FILHO, V.R.; MIES FILHO, A. et al. *Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. Belo Horizonte: CBRA, 1992, 79p.

GONÇALVES, F.S. *Efeitos de antioxidantes adicionados ao meio de fecundação in vitro sobre a capacitação espermática e desenvolvimento embrionário em bovinos*. Jaboticabal, 2006, 140f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

GONZALES, C.I.M.; NEVES, J.P.; SILVA, C.A.M. Determinação do sódio, potássio, cálcio e magnésio no plasma seminal ovino em diferentes tempos de incubação do sêmen a + 37° C. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 8, n. 3, p. 174-178, 1984.

KOLB, E. *Fisiologia Veterinária, Capítulo 16 A fisiologia da reprodução*. 4ª, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1984, p. 374-412.

LAPWOOD, K.R.; MARTIN, I.C.A.; ENTWISTLE, K.M. The fertility of merino ewes artificially inseminated with semen diluted in solutions based on skim milk, glucose or ribose. *Aust. J. Agric. Res.*, v. 23, n. 3, p. 457-466, 1972.

MACHADO, M.M.; VIEIRA, F.V. Biossegurança e qualidade sanitária em centro de coleta e processamento de sêmen bovino e bubalino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 25, n. 3, p. 384-386, 2001.

MAXWEEL, W.M.C.; SALAMON, S. Liquid storage of ram semen: a review. *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 5, n. 6, p. 613-638, 1993.

MIES FILHO, A. *Reprodução dos animais e inseminação artificial*. 5. ed. Porto Alegre: Sulina, 1987. v. 1-2, 783 p.

MILCZEWSKI, V.; KOZICKI, L.E.; NEVES, J.P. Viabilidade do sêmen ovino refrigerado em diferentes diluentes. *Arch. Vet. Sci.*, v. 5, n. 20, p. 29-33, 2000.

PALHÃO, M.P.; BISPO, C.A.S.; ROVAY, H. et al. Uso do sêmen resfriado em programas de inseminação artificial em caprinos. *O Embrião*, n. 26, p. 6-7, 2006.

ROCHA, H.L.O.G.; BELETTI, M.E.; MARCOLINI, T.T. et al. Uso de laranja de acridina e azul de toluidina na avaliação da fertilidade masculina. *Biosci. J.*, v. 18, n. 1, p. 65-77, 2002.

- ROTH, T.L.; WEISS, R.B.; BUFF, L.M. et al. Heterologous *in vitro* fertilisation and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). ***Biol. Reprod.***, v. 58, n. 2, p. 475-482, 1998.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. ***Anim. Reprod. Sci.***, v. 37, n. 3-4, p. 185-249, 1995a.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. ***Anim. Reprod. Sci.***, v. 38, n. 1-2, p. 1-36, 1995b.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. ***Anim. Reprod. Sci.***, v. 62, n. 1-3, p. 77-111, 2000.
- SOUSA, D.B.; BICUDO, S.D. Desempenho do Equitainer na refrigeração do sêmen ovino. ***Rev. Bras. Reprod. Anim.***, v. 26, n. 3, p. 166-168, 2002.
- VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. ***Anim. Reprod. Sci.***, v. 62, n. 1-3, p. 23-53, 2000.
- WATSON, P. F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. ***J. Reprod. Fertil.***, v.62, n. 2, p. 483-492, 1981.

4.2 Eficiência do Equimix acrescido de gema de ovo na fertilização de ovelhas superovuladas, após refrigeração do sêmen por 24 horas¹².

Efficiency of egg yolk added to Equimix in the fertilization of superovulated sheep following refrigeration of the semen for 24 hours.

Bartira Pastor de Andrade Sousa^{13*}, Joaquim Corrêa de Oliveira Andrade¹⁴, Áurea Wischral¹⁵,
Gilsan Aparecida de Oliveira^{II}

RESUMO

Neste trabalho objetivou-se demonstrar à eficiência do diluente comercial Equimix acrescido de gema de ovo, na refrigeração do sêmen ovino visando à fertilização de oócitos após inseminação de fêmeas ovinas superovuladas. Utilizou-se um *pool* constituído de três ejaculados de cada um dos três reprodutores Dorper. Após colheita e avaliação das características macro e microscópicas do sêmen e do *pool*, dividiu-se em duas partes iguais diluídas na proporção 1:3 (sêmen:diluente) para constituir os respectivos grupos experimentais: Equimix-Gema (DI) e Tris-Gema (DII) - controle. Cada grupo foi subdividido em outras duas alíquotas: fresco - F (F-DI e F-DII) que foi usado imediatamente, e refrigerado - R (R-DI e R-DII), mantido a 4 °C por 24 horas de armazenamento. Foram realizados 39 procedimentos de colheitas de embriões, sendo 19 utilizando sêmen refrigerado (R-DI e R-DII) e 20 com sêmen fresco (F-DI e F-DII). Foram realizadas inseminações laparoscópicas, com volume inseminante de 0,25 mL para corno uterino, momento em que foram realizadas as avaliações dos ovários. As estruturas colhidas foram selecionadas de acordo com o estágio e qualidade embrionária. Obteve-se uma taxa geral de estruturas fertilizadas de 71,0% (237/334), sendo 59,3% (198/334) de embriões viáveis, o que não variou significativamente ($p>0,05$) entre os tipos de sêmen e de diluentes. No total dos embriões, 86,4% apresentaram qualidade de grau I e II, sendo o R-DI o de melhor percentual (100%) ($p<0,05$). O *status* ovariano no momento da inseminação interferiu na fertilização, observando-se melhores resultados para o sêmen do F-DI quando o ovário se encontrava em ovulação. Para o F-DII,

¹² Formatação de acordo com a Revista Ciência Rural - ISSN 0103-8478 versão impressa.

¹³ Mestranda do Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. E-mail: bpastoras@hotmail.com. Autor para correspondência.

¹⁴ Médico Veterinário, Mestre em Ciência Veterinária, Recife, PE, Brasil.

¹⁵ Professora do DMV da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

este *status* foi o que apresentou menor quantidade de estruturas fertilizadas ($p < 0,05$). Conclui-se que é viável a refrigeração do sêmen ovino a 4 °C por 24 horas para a utilização em programas de transferência de embriões; e que o diluente Equimix, acrescido de 20% de gema de ovo, resultou em taxa de fertilização e qualidade embrionária similares ao tradicional Tris-Gema.

Palavras-chave: sêmen, diluidor, resfriamento, embriões, fertilização, ovino.

ABSTRACT

The aim of the present study was to demonstrate the efficiency of egg yolk added to the commercial diluent Equimix in the refrigeration of sheep semen for the fertilization of oocytes following the insemination of superovulated ewes. A pool of three ejaculates from each of three Dorper breeders was used. After the collection and evaluation of the macroscopic and microscopic characteristics of the semen, the pool was divided into two equal parts diluted at a proportion of 1:3 (semen:diluent) in order to establish the respective experimental groups: Equimix-Yolk (DI) and Tris-Yolk (DII, control). Each group was subdivided into two aliquots: fresh – F (F-DI and F-DII), which was used immediately; and refrigerated – R (R-DI and R-DII), which was kept at 4 °C for a storage time of 24 hours. Thirty-nine embryo harvesting procedures were performed, 19 using refrigerated semen (R-DI and R-DII) and 20 using fresh semen (F-DI and F-DII). Laparoscopic inseminations were performed with an inseminate volume of 0.25 mL per uterine horn, which was when the ovary evaluations were performed.). The harvested structures were selected based on embryo state and quality. A general rate of 71.0% (237/334) of fertilized structures was obtained, 59.3% (198/334) of which were viable embryos. There was no significant variation ($p > 0.05$) between the types of semen and diluents. Among the total number of embryos, 86.4% exhibited quality Grades I and II, with the refrigerated semen of R-DI obtaining the best percentage (100%) ($p < 0.05$). The ovarian status at the time of insemination affected fertilization, as better results were obtained for the fresh semen of F-DI when the ovary was ovulating. For F-DII, this status exhibited a smaller number of fertilized structures ($p < 0.05$). It was concluded that refrigeration of sheep semen at 4 °C for 24 hours is viable for use in embryo transference programs. Equimix added with 20% egg yolk resulted in a fertilization rate and embryo quality similar to the traditional Tris-Yolk.

Keywords: semen, diluent, refrigeration, embryos, fertilization, sheep.

INTRODUÇÃO

A ovinocultura apresenta-se em constante ascensão no âmbito do agronegócio nacional (OJIMA et al., 2006). Este crescimento está expresso nos preços cada vez mais altos atribuídos a animais de destacável valor zootécnico. Em especial, volta-se a atenção à formação dos condomínios para a aquisição de um único reprodutor por vários criadores, tendo como conseqüência distâncias a serem superadas na utilização do germoplasma deste indivíduo.

A criopreservação do sêmen é incontestavelmente a biotecnologia de maior otimização do potencial genético de um reprodutor. Todavia, na espécie ovina existe uma grande variabilidade nos índices obtidos em programas de inseminação artificial (IA) e transferência de embriões (TE) com sêmen congelado, estando atribuída a inúmeros fatores (BICUDO et al., 2007). Dentre esses, destaca-se a sensibilidade à congelação dos gametas masculinos de alguns indivíduos (MIES FILHO et al., 1986), expressa nos índices de fertilidade, decorrentes das trocas de fases térmicas durante o processo de congelação e descongelação do sêmen, que, inevitavelmente, acarretam em redução da motilidade e formação de crioinjúrias às células espermáticas (SALAMON & MAXWELL, 1995).

Na TE, o desafio aos espermatozóides tende a ser maior em virtude da expressiva exigência dos ovários superovulados, sobretudo quanto à assincronia entre o momento das ovulações e a IA. Desta forma, a individualidade de alguns machos ovinos, determinada pelo grau de sensibilidade de suas células espermáticas à criopreservação, leva ao questionamento de sua ampla utilização em programas de TE.

A refrigeração do sêmen ovino a 5 °C possibilita a manutenção da capacidade fertilizante das células espermáticas (PAGANINI FILHO et al., 1997) por períodos de 24 a 48 horas de armazenamento (SOUSA & BICUDO, 2002), favorecendo o transporte entre propriedades (GUERRA & NUNES, 1999). A conservação por período de até 72 horas a 4 °C foi demonstrada por GUERRA & NUNES (1999) em solução de água de côco acrescida de 2,5% de gema. Os meios diluentes contendo gema de ovo favorecem a conservação em temperaturas mais baixas, protegendo as células espermáticas da ação do frio e minimizando as mudanças causadas por este agente (SALAMON & MAXWELL, 1995).

A IA com sêmen refrigerado é, sem dúvida, a técnica mais utilizada na espécie ovina, porém, apresenta a desvantagem do reduzido tempo de conservação, limitando a ampla difusão do material genético de animais considerados superiores (SALAMON & MAXWELL, 2000). Desde que seja depositado o mais próximo do local de fertilização, o

sêmen refrigerado apresenta resultados satisfatórios (EVAS & MAWELL, 1990; MILCZEWSKI et al., 2000). Sendo assim, existe a perspectiva da aplicabilidade deste sêmen na TE com provável potencial para se obter resultados similares ao sêmen fresco. Diante do exposto, objetivou-se demonstrar a eficiência do diluente comercial Equimix acrescido de gema de ovo, na refrigeração do sêmen ovino visando à fertilização de oócitos após inseminação de fêmeas ovinas superovuladas.

MATERIAL E MÉTODOS

Como doadores de sêmen foram utilizados três carneiros da raça Dorper, com idade variando entre 1 e 3 anos, comprovadamente férteis criados em regime intensivo com arraçoamento de feno Tyfton, suplementados com 500g de concentrado/animal/dia, além de sal mineral e água *ad libitum*. Cada animal foi submetido a colheita de sêmen com vagina artificial e auxílio de fêmea em estro. Os ejaculados que apresentaram características macroscópicas (volume, cor e aspecto) dentro dos padrões normais (FONSECA et al., 1992), foram imediatamente colocados em banho-maria a 30 °C. Uma alíquota de sêmen foi avaliada em lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37 °C em microscópio com platina aquecedora na mesma temperatura; sendo aprovadas as amostras que apresentaram valor mínimo no turbilhonamento de 3 (0-5), motilidade individual progressiva (MIP) de 70% e vigor espermático de 3 (0-5) (FONSECA et al., 1992).

Para o estudo, formou-se um *pool* com três ejaculados de cada animal e foram repetidas as avaliações macro e microscópica. Em seguida, dividiu-se o *pool* para constituir em duas alíquotas iguais, e estas foram diluídas na proporção de uma parte de sêmen para três partes dos respectivos diluentes: Equimix-Gema¹⁶ (DI) e Tris-Gema (EVANS & MAXWELL, 1990) - controle (DII). Após a diluição, as alíquotas de sêmen de cada diluente foram subdivididas em: fresco - F (F-DI e F-DII) e refrigerado - R (R-DI e R-DII). Foram utilizadas para todos os grupos partes iguais de um homogeneizado de gema de ovo fresca, de no máximo três dias. A aferição do pH dos dois meios realizou-se com pHmetro digital¹⁷, antes de proceder às diluições.

Os tubos de cada diluente, R-DI e R-DII, destinados ao refrigeração, foram colocados em recipiente de porcelana contendo água à temperatura 30 °C, e o conjunto levado ao refrigerador (4 °C), quando foi adicionado gelo à água. A diminuição da temperatura até 4 °C

¹⁶ Equimix acrescido de 20% de gema de ovo; Nutricell – Nutrientes Celulares LTDA

¹⁷ Ph100 da Phtek®

foi monitorada com auxílio de termômetro digital¹⁸ (sensor imerso na água), ocorrendo gradativamente em 180 minutos, sendo mantidos nesta temperatura até o momento da inseminação, correspondendo a 24 horas de armazenamento.

As amostras de sêmen mantidas a 30 °C, correspondendo ao sêmen fresco acrescido de cada diluente (F-DI e F-DII) foram imediatamente utilizadas. Todas as inseminações foram realizadas intra-uterinamente por via laparoscópica (NEVES & LUZ, 1994), com volume de 0,25 mL para cada corno uterino. Intercalaram-se, entre cada procedimento de inseminação, duas ovelhas de cada grupo (F-DI e F-DII; R-DI e R-DII), de forma a minimizar o efeito tempo.

A distribuição das fêmeas entre os grupos F-DI e F-DII e, R-DI e R-DII ocorreu no momento da IA procedendo-se de maneira a homogeneizar os grupos quanto a idade e número de parições. Os ovários foram observados e avaliados quanto ao *status* ovariano durante as laparoscopias, e classificados segundo a presença apenas de folículos (CF), folículos associados com algumas fossas ovulatórias (Ov) e, ausência de folículos, apresentando apenas fossas ovulatórias (TOv).

As doadoras utilizadas foram ovelhas da raça Santa Inês (n=28), com idade entre 2 a 5 anos, mantidas em regime de criação semi-intensivo com fornecimento alimentar de feno Tyfton e 100 g/dia de ração comercial por animal, além de sal mineral e água *ad libitum*. Para superovulação (SOV) foi utilizado o protocolo descrito por GUSMÃO & MOURA (2005), modificado quanto ao momento da inseminação laparoscópica (44 horas após retirada do implante intravaginal¹⁹). Houve diferença de um dia no início do protocolo entre as doadoras dos grupos F-DI e F-DII com as doadoras dos grupos R-DI e R-DII. Todas as doadoras foram submetidas ao procedimento de colheita de embriões através do método cirúrgico por laparotomia (SILVA et al., 2001), depois de transcorrido 5 dias da IA. Foram utilizados 40 mL de solução TQC Complete Flush^{®20} por corno uterino e, ao final da colheita, expôs-se os ovários para avaliação quantitativa ao tratamento SOV (contagem dos corpos lúteos). O conteúdo do lavado uterino foi colocado em placas de Petri (100 x 20 mm) para o rastreamento das estruturas que foram transferidas para placas menores (35x10mm) contendo Holding Plus[®] 0,4% BSA²¹; com auxílio de microscópio-estereoscópico. Em seguida elas foram avaliadas e classificadas de acordo com o estágio de desenvolvimento e a qualidade embrionária (IETS, 1998).

¹⁸ Incoterm[®] (-50° a 70 °C)

¹⁹ CIDR[®]- InterAg, New Zealand, Importador Laboratórios Pfizer LTDA

²⁰ Nutricell - Nutrientes Celulares LTDA

²¹ Cultilab – Material de Cultivo Celular LTDA

Para o estudo foram analisadas as seguintes variáveis:

Quantitativas: 1) Taxa de embriões viáveis (número total de embriões viáveis/número total de estruturas), 2) Taxa de embriões degenerados (número total de degenerados/número total de estruturas), 3) Taxa de fertilização (número total de estrutura fertilizadas/número total de estruturas recuperadas) e 4) Taxa de não fertilizados (número total de óvulos/número total de estruturas);

Qualitativas: 1) Embriões congeláveis (grau I e II) e 2) Embriões não congeláveis (grau III) e,

Status ovariano: 1) crescimento folicular (CF), 2) ovulando (Ov), c-3) término da ovulação (TOv), no momento das IA`s.

Para a análise dos dados foram utilizadas técnicas de estatística descritiva e inferencial. As técnicas de estatística descritiva incluíram distribuições absolutas e percentuais e as técnicas de estatística inferencial envolveram a aplicação do teste Qui-quadrado de Pearson ou teste Exato de Fisher quando as condições para utilização do teste não foram verificadas. O nível de significância utilizado nas decisões dos testes estatísticos foi de 5%. Os dados foram analisados no *software* utilizado SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 13.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração espermática do *pool* foi de $2,9 \times 10^9$ espermatozóides por mL de sêmen e após a respectiva diluição (1:3, sêmen:diluyente) foi obtida uma concentração final de $73,5 \times 10^7$ /mL. O pH do *pool* do sêmen fresco apresentou 6,0 e dos meios diluidores foram observados os seguintes valores: Equimix-Gema - pH 7,0 e Tris-Gema - pH 6,9. As células espermáticas suportam oscilações bastante amplas de pH (MIES FILHO, 1982), e na espécie ovina a variações encontra-se entre 5,9 e 7,3 (HAFEZ, 1995).

Foram realizados 39 procedimentos de colheita de embriões, sendo 19 utilizando sêmen refrigerado dos grupos R-DI e R-DII e 20 com sêmen fresco dos grupos F-DI e F-DII.

Quanto às estruturas fertilizadas (Tabela 1), vale ressaltar que a ovulação de folículos recrutados no processo de superovulação se dá em momentos diversos, sendo necessário que haja sincronismo perfeito dos gametas masculinos com estes. A taxa de fertilização geral foi de 71,0% (237/334), sendo de 71,5% e 70,3% para o sêmen fresco e refrigerado, respectivamente, sem diferença significativa ($p>0,05$). Entre os diluentes (F-DI e F-DII; R-DI e R-DII) também não foi verificada diferença estatística ($p>0,05$) quanto à capacidade de

fertilização. Já foi salientado por EVANS & MAXWELL (1990), que a viabilidade do sêmen refrigerado está relacionada ao local de deposição. Corroborando com MILCZEWSKI et al. (2000), que obtiveram fertilidade superior quando utilizada a via intrauterina, para dois diluentes testados, na inseminação de ovelhas com sêmen refrigerado a 5 °C. Neste trabalho a inseminação por via intrauterina possivelmente permitiu um melhor aproveitamento do sêmen e o bom resultado de fertilização. Os resultados encontrados neste trabalho corroboram com os de Leoni et al. (2001), que obtiveram, com sêmen fresco diluído, taxas de fertilização de 81,7 e 82,0%, para dois diferentes protocolos de superovulação respectivamente.

Na Tabela 2 encontra-se o número e a distribuição das estruturas recuperadas, que representaram um total de 59,3% de embriões viáveis. As taxas de estruturas viáveis totais apresentadas por cada grupo independente da condição de ser refrigerado ou fresco não diferiram ($p>0,05$). O mesmo ocorreu na análise das estruturas recuperadas ($p>0,05$). Segundo MAXWELL & SALAMON (1993a), a eficiência do sêmen ovino após IA é influenciada pelo tipo de diluente utilizado na sua conservação, por refletir na capacidade dos espermatozóides em suportar a refrigeração, assim como, na duração da viabilidade espermática após diluição. No caso dos diluentes utilizados, é possível considerar que ambos apresentaram a mesma capacidade de preservação do sêmen.

A qualidade embrionária é fator importante na TE, por refletir diretamente sobre as taxas de prenhez (REICHENBACH et al., 2001). A porcentagem de embriões com qualidade de grau I e II, considerados congeláveis em todos os grupos, foi superior aos de pobre qualidade (grau III) (Tabela 3). Foi reportado por SARTORI (2004) que o tratamento superovulatório pode estar relacionado à qualidade ovocitária inferior, devido à má maturação ou transtornos das células da granulosa, reduzindo a viabilidade embrionária. Este fator não foi evidenciado neste estudo, onde os embriões de melhor qualidade apareceram em maior quantidade.

As características seminais como viabilidade e morfologia espermática estão associadas com falhas na fertilização e embriogênese. O diluente Equimix-Gema mostrou expressiva proteção às células espermáticas durante o período de refrigeração (R-DI), vindo a produzir a totalidade dos embriões com qualidade congelável (Tabela 3) divergindo ($p<0,05$) do grupo R-DII. Comparando o sêmen fresco com o refrigerado, dentro de cada grupo de diluente (Tabela 3), houve diferença significativa ($p<0,05$) apenas entre o F-DI e R-DI, com superioridade do refrigerado. Segundo, SALAMON & MAXWELL (1995), se considera como uma das propriedades básicas de um bom diluidor, a prevenção da capacitação precoce e proteção de eventuais crioinjúrias (SALAMON & MAXWELL, 1995).

A determinação exata do momento da ovulação é crucial para o sucesso da inseminação, já que a viabilidade dos oócitos da ovelha após a ovulação é de 12 (EVANS & MAXWELL, 1990) a 24 horas (HAFEZ, 1995). Assim, o espermatozóide deve atingir o oviduto no momento em que exista um óvulo viável (BETTENCOURT, 1999). Segundo MAXWELL & WASTON (1996), o sêmen conservado requer menos tempo para a sua capacitação no trato genital feminino, portanto, se depositado o mais próximo do local de fertilização, poderá vir a fertilizar oócitos mais rapidamente.

O intervalo médio entre a retirada do progestágeno e o momento da IA foi de 43,0 horas para o sêmen fresco (F-DI e F-DII) e 44,5 horas para o refrigerado (R-DI e R-DII), estando de acordo com BETTENCOURT (1999) ao citar que, para fêmeas superovuladas, o intervalo entre a remoção do progestágeno e a inseminação deverá ser de 36 a 48 horas, para sêmen fresco, e de 44 a 48 horas para sêmen congelado.

Determinando um tempo fixo para IA de 40 horas após a remoção dos pessários, REXROAD JUNIOR & POWELL (1991) verificaram, em duas experimentações sequenciais, taxas de 82,8 % e 96,4 % de oócitos fertilizados com sêmen fresco. Sendo estas taxas superiores às obtidas no presente trabalho, para os grupos de sêmen fresco (F-DI e F-DII). Contudo, estes autores não diluíram o sêmen e utilizaram para avaliação e confirmação das taxas de fertilização a presença de pronúcleo ou núcleo em clivagem no zigoto, após colheita retrógrada das tubas uterinas, 64 a 66 horas após remoção do progestágeno.

JABBOUR & EVANS (1991) realizaram inseminações intrauterinas às 24, 48 e 64 horas após a retirada do implante intravaginal e obtiveram valores médios de estruturas fertilizadas de 60,0, 93,7 e 87,8 % para sêmen fresco e 46,1 98,2 e 26,1% para o sêmen congelado, em cada um dos tempos de inseminação. A colheita das estruturas foi realizada com 88 horas após retirada do pessário vaginal, considerando como estrutura fertilizada a que apresentasse clivagem ou presença de pronúcleo. Este autotes verificaram que, a viabilidade das células espermáticas no trato reprodutivo de ovelhas superovuladas poderá ser maior ou menor, do que a preconiza para o sêmen fresco (30 a 48h) e criopreservado (18 a 35h).

Todavia, MAXWELL et al. (1993b) relataram índices de fertilização de 45,0 e 22,0% para 44 horas e 38,0 e 19,0% para as 68 horas em inseminações no oviduto e intrauterina, respectivamente; ocorrendo maior taxa de fertilização nas inseminações as 44 horas. No presente trabalho as taxas de fertilização (F-DI, F-DII, R-DI e R-DII) foram superiores as encontradas por estes autores, com o intervalo de 44 horas para a realização da IA.

Foi sugerido por Robinson et al. (1989) que a inseminação intrauterina antes e durante a ovulação interferiria na captação dos oócitos pelas fímbrias. Contudo, no presente trabalho

quando verificada a taxa geral de fertilização (75,6, 65,0 e 71,7%) para cada *status* ovariano (CF, OV e TOv), respectivamente, não foi confirmada tal hipótese (Tabela 4).

Partindo-se da informação que uma das conseqüências da exposição ao frio é a indução a uma prematura capacitação (MAXWELL & WATSON, 1996; WATSON, 2000), foi observada, para o sêmen diluído no Equimix-Gema, uma relação entre o tipo de sêmen (F-DI e R-DI) com o *status* ovariano (Ov) no momento da IA (Tabela 4). O melhor resultado para o sêmen fresco diluído com Equimix-Gema (F-DI) foi quando o ovário se encontrava em ovulação. Para o diluente Tris-Gema (F-DII) este *status* foi o que apresentou menor quantidade de estruturas fertilizadas ($p < 0,05$). Todavia, as taxas de fertilizações dentro do mesmo tipo de diluente (F-DI e R-DI; F-DII e R-DII) e no mesmo tipo de sêmen (F-DI e F-DII; R-DI e R-DII), não apresentaram uma ordem segundo a seqüência da dinâmica folicular.

Foi reportado por WATSON (1981; 2000) que uma das mudanças nos espermatozoides, por ação do frio, é o curto período do tempo da viabilidade espermática no trato reprodutivo da fêmea. Sendo assim, deveria ter ocorrido uma ordem decrescente nas taxas de fertilização para o sêmen refrigerado do *status* CF para o TOv, e o inverso para o sêmen fresco. Todavia, as taxas de fertilização dentro do mesmo tipo sêmen (F-DI e F-DII; R-DI e R-DII), não apresentaram uma ordem segundo a seqüência da dinâmica folicular. Segundo HAWK (1983), a sobrevivência e o transporte espermático no trato reprodutivo de ovelhas são reduzidos drasticamente quando o estro é induzido com progestágenos ou prostaglandina $F_{2\alpha}$. Em fêmeas bovinas superovuladas a baixa taxa de fertilização é conseqüência a alguns efeitos adversos do tratamento que, provoca distúrbio do transporte de espermatozoides e ovócitos (SARTORI, 2004).

A ausência da diferença estatística observada em alguns casos pode ser devido a diferenças numéricas de algumas categorias de *status* dentro do mesmo grupo de diluente (F-DI e R-DI; F-DII e R-DII) e no mesmo tipo de sêmen (F-DI e F-DII; R-DI e R-DII), como por exemplo do *status* ovariano CF para o grupo de sêmen diluído com Equimix-Gema e refrigerado. Contudo, este fator foi difícil de controlar dada a dinâmica em que foi realizado o experimento. Um outro ponto é a deposição intrauterina do sêmen que minimiza o tempo e a distância a ser percorrida pelo espermatozóide refrigerado até o sítio de fertilização, conforme MILCZEWSKI et al. (2000) e MAXWELL et al. (1993b). A forma de inseminação pode ter contribuído para uma adequada fertilização pelo sêmen refrigerado, aproximando-o dos valores observados para o sêmen fresco.

CONCLUSÃO

É viável a utilização do sêmen ovino refrigerado em programas de transferência de embriões, permitindo a otimização do sêmen. O diluente comercial Equimix, acrescido de 20% gema de ovo, apresenta compatibilidade com o tradicional Tris-Gema com a vantagem de ser um preparado comercial que apresenta composição definida e estável.

REFERÊNCIAS

- BETTENCOURT, E.M.V. **Caracterização de parâmetros reprodutivos nas raças ovinas Merina branca, Merina preta e Campaniça**. 1999. 126 p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal). Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa. 1999.
- BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C.; MAIA S.M. et al. Avanços na criopreservação do sêmen ovino visando sua aplicação em programas de inseminação artificial e em biotecnologias com embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 3, p. 787-798, 2007. Suplemento
- EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Salamon's inseminación artificial de ovejas y cabras**. Zaragoza: Acribia, 1990. 192p.
- FONSECA, V.O.; VALE FILHO, V.R.; MIES FILHO, A. et al. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte: CBRA, 1992. 79p.
- GUERRA, F.F.A.; NUNES, J.F. Fertilidade *in vivo* e avaliação *in vitro* do sêmen ovino resfriado e conservado em água de coco por 72 horas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n.3, p. 287-289, 1999.
- GUSMÃO, A.L.; ANDRADE MOURA, J.C. Transferência de embriões em caprinos e ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, supl. 1, p. 29-32, 2005.
- HAFEZ, E.S.E. Tecnologia reprodutiva assistida: manipulação da ovulação, fertilização *in vitro*/transferência de embrião. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. São Paulo: Manole, 1995. Cap 23, p. 469-512.
- HAWK, H.W. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. **Journal Dairy Science**, v. 66, n. 12, p. 2645-2660, 1983.
- IETS – Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. **Manual da sociedade internacional de transferência de embriões**. Illinois: IETS.1998. 180p.

- JABBOUR, H.N.; EVANS, G. Fertility of superovulated ewes following intrauterine or oviducal insemination with fresh or frozen-thawed semen. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 1991.
- LEONI, G. et al. Sheep embryos derived from FSH/eCG treatment have a lower in vitro viability after vitrification than those derived from FSH treatment. **Reproduction Nutrition Development**, v. 41, n.3, p. 239-246, 2001.
- MAXWEEL, W.M.C.; SALAMON, S. Liquid storage of ram semen: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, n. 6, p. 613-638, 1993a.
- MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G.; RHODES, S.L.; HILLARD, M.A.; BINDON, B.M. Fertility of superovulated ewes after intrauterine or oviducal insemination with low numbers of fresh or frozen-thawed. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, n. 1, p. 57-63, 1993b.
- MAXWEEL, W.M.C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1, p. 55-65, 1996.
- LYMBEROPOULOS, A.G. et al. Fertilization and embryo recovery rates in superovulated chios ewes after laparoscopic intrauterine insemination. **Theriogenology**, v. 55, n. 9, p. 1855-1862, 2001.
- MIES FILHO, A. et al. Estudo sobre inseminação artificial com sêmen congelado em ovinos no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 10, n. 4, p. 235-245, 1986.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 5. ed. Porto Alegre: Sulina, 1987. v. 1-2, 783p.
- MILCZEWSKI, V. et al. Inseminação artificial intrauterina e cervical em ovelhas utilizando sêmen refrigerado. **Archives of Veterinary Science**, v. 5, p. 35-39, 2000.
- NEVES, J.P; LUZ, S.L.N. Inseminação laparoscópica em ovelhas com cio natural e induzido e sincronizado antes e durante a estação reprodutiva. **Ciência Rura**, v. 24, n. 1, p. 133-137, 1994.
- OJIMA et al. Caprinos e ovinos em São Paulo atraem argentinos. **Análise e Indicadores do Agronômico**, São Paulo, v. 1, n. 1, janeiro/2006. Capturado em 30 mai. 2006. Online. Disponível na Internet em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=4462>.
- PAGANINI FILHO, P. et al. Viabilidade do sêmen ovino frente a três diluentes em temperatura de 37°C e sob refrigeração. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, n. 2, p. 61-64, 1997.

REICHENBACH, H.D.; LEMOS, M.A.L.O.; LIMA, P.F., et al. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: GONSALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2001. Cap. 8, p. 127-177.

REXROAD JÚNIOR, C.E.; POWELL, A.M. FSH injections and intrauterine insemination in protocols for superovulation of ewes. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 1, p. 246-251, 1991.

ROBINSON, J.J.; WALLACE, J.M.; AITKEN, R.P. Fertilization and ovum recovery rates in superovulated ewes following cervical insemination or laparoscopic intrauterine insemination at different times after progestagen withdrawal and in one or both uterine horns. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, n. 2, p. 771-782, 1989.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Review. Frozen storage of ram semen. I Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**. v. 37, n. 3-4, p. 185-249, 1995.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**. v. 62, n. 1-3, p. 77-111, 2000.

SARTORI, R. Fertilização e morte embrionária em bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, n. 32, Supl 1, p. 35-50, 2004.

SILVA, J.C. et al. Superovulação de ovelhas Santa Inês através de uma injeção subcutânea de FSH dissolvido em polivinilpirrolidona (resultados preliminares). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p. 341-343, 2001.

SOUSA, D.B.; BICUDO, S.D. Desempenho do Equitainer na refrigeração do sêmen ovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 3, p. 166-168, 2002.

Tabela 1 – Números e porcentagem de estruturas fertilizadas obtidas de ovelhas inseminadas com sêmen diluído com dois diferentes diluentes, a fresco e refrigerado.

	ESTRUTURAS				
	Total	Fertilizadas		Não Fertilizadas	
	n	n	%	n	%
F-DI	108	77	71,3	31	28,7
F-DII	71	51	71,8	20	28,2
Sub-Total	179	128	71,5	51	28,5
R-DI	61	43	70,5	18	29,5
R-DII	94	66	70,2	28	29,8
Sub-Total	155	109	70,3	46	29,7
TOTAL	334	237	71,0	97	29,0

F-DI – Equimix-Gema/fresco, F-DII – Tris-Gema/fresco, R-DII – Equimix-Gema/refrigerado, R-DII – Tris-Gema/refrigerado.

Tabela 2 – Distribuições e porcentagem de embriões viáveis, degenerados e óvulos obtidos de ovelhas inseminadas com sêmen diluído com dois diferentes diluentes, a fresco e refrigerado.

	ESTRUTURAS						
	Total	Viáveis		Degenerados		Óvulos	
	n	n	%	n	%	n	%
F-DI	108	61	56,5	16	14,8	31	28,7
F-DII	71	43	60,6	8	11,3	20	28,2
Sub-Total	179	104	58,1	24	13,4	51	28,5
R-DI	61	35	57,4	8	13,1	18	29,5
R-DII	94	59	62,8	7	7,4	28	29,8
Sub-Total	155	94	60,7	15	9,7	46	29,7
TOTAL	334	198	59,3	39	11,7	97	29,0

F-DI – Equimix-Gema/fresco, F-DII – Tris-Gema/fresco, R-DII – Equimix-Gema/refrigerado, R-DII – Tris-Gema/refrigerado.

Tabela 3 – Distribuição e porcentagem da qualidade embrionária obtida de ovelhas inseminadas com sêmen diluído com dois diferentes diluentes, a fresco e refrigerado.

		EMBRIÕES				
		Total	Grau I e II		Grau III ou mais	
		n	n	%	n	%
I - Tipo de sêmen/Diluyente	Grupo					
	F-DI	61	51	83,6	10	16,4
	F-DII	43	36	83,7	7	16,3
	R-DI	35	35	100,0 ^b	-	-
	R-DII	59	49	83,1 ^a	10	19,9
	TOTAL	198	171	86,4	27	13,6
II - Diluyente/ Tipo de sêmen	F-DI	61	51	83,6 ^a	10	16,4
	R-DI	35	35	100,0 ^b	-	-
	F-DII	43	36	83,7	7	16,3
	R-DII	59	49	83,1	10	19,9

F-DI – Equimix-Gema/fresco, F-DII – Tris-Gema/fresco, R-DII – Equimix-Gema/refrigerado, R-DII – Tris-Gema/refrigerado.

^{ab} Valores com letras diferentes em uma mesma coluna são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Exato de Fisher ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Números e porcentagem de estruturas fertilizadas em relação ao *status* ovariano no momento da IA laparoscópica com sêmen ovino diluído com dois diferentes diluentes, a fresco e refrigerado.

		STATUS OVARIANO					
		CF		Ov		TOv	
		n	%	n	%	n	%
I - Tipo de sêmen/Diluyente	Grupo						
	F-DI	20/31	64,5 ^a	18/18	100,0 ^b	39/59	66,1 ^a
	F-DII	20/21	95,2 ^c	16/29	55,2 ^a	15/21	71,4 ^b
	R-DI	1/2	50,0	11/19	57,9	20/26	76,9
	R-DII	21/28	75,0	20/34	58,8	25/32	78,1
	TOTAL	62/82	75,6	65/100	65,0	99/138	71,7
II - Diluyente/ Tipo de sêmen	F-DI	20/31	64,5	18/18	100,0 ^B	39/59	66,1
	R-DI	1 /2	50,0	11/19	57,9 ^A	20/26	76,9
	F-DII	20/21	95,2	16/29	55,2	15/21	71,4
	F-DII	21/28	75,0	20/34	58,8	25/32	78,1

F-DI – Equimix-Gema/fresco, F-DII – Tris-Gema/fresco, R-DII – Equimix-Gema/refrigerado, R-DII – Tris-Gema/refrigerado.

CF – Crescimento Folicular; Ov – Ovulando; TOv – Termina da ovulação.

^{ab} Valores com letras minúsculas em uma mesma linha são estatisticamente diferentes de acordo com o Qui-quadrado de Pearson ($p < 0,05$).

^{AB} Valores com letras maiúsculas em uma mesma coluna são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Exato de Fisher ($p < 0,05$).

5 Considerações Finais

O emprego do sêmen refrigerado para a transferência de embriões possibilita resultados satisfatórios com uma margem de eficiência de 24 horas de armazenamento. Constituindo-se em mais uma ferramenta para a rápida multiplicação de indivíduos de características zootécnicas e geneticamente desejáveis.

Dos quatro diluentes comerciais utilizados nas avaliações *in vitro*, o Laiciphos Green Ovino, foi o que apresentou os melhores resultados, se igualando ao clássico diluente composto de Tris e gema de ovo. Todavia, este meio não foi usado no experimento *in vivo* em virtude de não estar mais disponível no mercado brasileiro; justificado pela baixa procura por parte dos técnicos.

O meio Equimix, acrescido de gema de ovo, que apresentou o segundo melhor resultado *in vitro* e avaliado *in vivo*, apresenta a vantagem de ser constituído em duas partes: líquida e em pó, facilitando o transporte. E, embora tenha um volume final (após reconstituição) de 100 mL, o seu baixo custo possibilita a obtenção de doses, após a diluição do sêmen, com valor bem aquém de outros diluentes. A adição da gema de ovo ao Equimix, é de prática aplicabilidade e fácil aquisição, com o benefício de potencializar a proteção às células espermáticas.

A refrigeração do sêmen com a manutenção das características espermáticas e a capacidade fertilizante, trás como benefício à otimização do ejaculado e do número de ovelhas superovuladas a serem inseminadas, permitindo também que a inseminação seja realizada no momento mais propício do ciclo estral.