

**Francisco Ayres de Oliveira Neto**

**Efeito da adição de gema de ovo no diluente de  
Kenney para o resfriamento de sêmen ovino**



**São Paulo**

**2012**

Francisco Ayres de Oliveira Neto

## **Efeito da adição de gema de ovo no diluente de Kenney para o resfriamento de sêmen ovino**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

**Departamento:**

Reprodução Animal

**Área de concentração:**

Reprodução Animal

**Orientador**

Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe

De acordo: \_\_\_\_\_

Orientador

São Paulo  
2012

**Obs .: A versão original se encontra disponível na biblioteca da FMVZ/USP**

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da  
Universidade de São Paulo)

T.2650  
FMVZ

Oliveira Neto, Francisco Ayres de  
Efeito da adição de gema de ovo no diluente de Kenney para o  
resfriamento de sêmen ovino / Francisco Ayres de Oliveira Neto. -- 2012.  
74 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de  
Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal,  
São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe.

1. Ovino. 2. Sêmen resfriado. 3. Diluente de Kenney. 4. Perfil oxidativo.  
5. Gema de ovo. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

*Comissão de Ética no uso de animais*

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito da adição de gema de ovo no diluente de Kenney para o resfriamento de sêmen ovino", protocolado sob o nº 2620/2012, utilizando 4 (quatro) carneiros, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 11/4/2012.

We certify that the Research "Effect of egg yolk addition to Kenney extender on cooling of ram semen", protocol number 2620/2012, utilizing 4 (four) sheep, under the responsibility Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 4/11/2012.

São Paulo, 12 de abril de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni  
Presidente

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

**Nome:** OLIVEIRA NETO, Francisco Ayres

**Título:** Efeito da adição de gema de ovo no diluente de Kenney para o resfriamento de sêmen ovino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## Dedicatória

Dedico,

Ao meu pai, Sebastião Astézio, pelo apoio, confiança e carinho.

A minha mãe, Ana Eulália por sempre torcer e acreditar muito na minha capacidade, por todo amor e carinho.

As minhas irmãs, Mariana, Juana, Ana Alzira e Gabriela pela fraternidade, apoio e carinho.

A minha namorada, Jéssica de Cássia pela amizade, companheirismo, compreensão. Por sempre ficar escutando as minhas reclamações, por me apoiar sempre e pelo seu imenso amor e carinho.

Ao Sr Anardino, Dona Léia, José Lino, Fernanda e Antônio pela força e incentivo.

A toda a minha família pelo apoio.

À Deus, por me proporcionar tudo.

## **Agradecimentos**

Ao Professor Cabral, pela amizade, pela confiança. Por sempre me ajudar nos momentos de aperto, por sempre poder contar contigo. Sem você a pós-graduação não seria possível.

Ao Professor Renato Campanarut Barnabe, meus sinceros agradecimentos, não só pela orientação, mas pela confiança.

À Professora Valquiria Hyppolito Barnabe pela confiança.

Ao Dr. Marcílio pela grande ajuda em todas as etapas, principalmente na tal estatística... Pela amizade e pelos conselhos.

À toda equipe do laboratório de andrologia pela ajuda e amizade, Eduardo, Paola, Mariana, Andressa, Carol, Diego e Roberta.

À equipe do laboratório de reprodução da PUC Minas – Poços de Caldas/MG pela enorme ajuda, pela amizade, pelas risadas, pelos conselhos e pelo companheirismo. Prof. Aduino, Saulo Oliveira, Diego Feitosa, Raphael Henrique, Nayara Terra, Gisele Mouro, Jamile da Rosa, Sergio Junior, Mariana Andrade, Renata Lançoni e André.

A todos os professores do Departamento de Reprodução Animal, Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi, Profa. Dra. Camila Infantsi Vannucchi, Profa. Dra. Clair Motos de Oliveira, Profa. Dra. Claudia Barbosa Fernandes, Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira, Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini, Prof. Dr. José Antônio Visintin, Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, Prof. Dr. Mário Binelli, Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção, Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, Prof. Dr. Wilson Gonçalves Vianna e Prof. Dr. Laudinor De Vuono.

A todos os funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

Ao CNPq, por fornecer a bolsa, que foi de muita ajuda para a conclusão da pós-graduação.

## Epígrafe

*Os nossos pais amam-nos porque somos seus filhos, é um fato inalterável. Nos momentos de sucesso, isso pode parecer irrelevante, mas nas ocasiões de fracasso, oferecem um consolo e uma segurança que não se encontra em qualquer outro lugar.*

*(Bertrand Russell)*



## RESUMO

OLIVEIRA NETO, F. A. **Efeito da adição de gema de ovo no diluente de Kenney para o resfriamento de sêmen ovino.** [Effect of the addition of egg yolk to the kenney extender for the cooling of ram sêmen]. 2012. 74 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Entre as biotécnicas da reprodução, a inseminação artificial (IA) é a que proporciona maior amplitude de resultados nos programas de melhoramento genético animal. A adequada seleção dos atributos produtivos e reprodutivos de fêmeas e principalmente dos machos é a base essencial para a maximização do potencial dessa técnica. O sêmen para IA pode ser fresco, fresco diluído, refrigerado e congelado. Os diluidores têm papel fundamental na expansão do volume seminal, permitindo seu fracionamento na preservação do sêmen no processo de refrigeração, eles devem ser atóxicos, ter pH e pressão osmótica compatíveis com a sobrevivência espermática, de baixo custo e fácil preparo. Sendo assim o objetivo deste trabalho foi avaliar a conservação de sêmen ovino resfriado com diluente de Kenney (K) ou diluente de Kenney mais gema de ovo (KG) por até 48 horas. Foram utilizados quatro carneiros, sendo feitas 40 colheitas. Logo após o sêmen era dividido em duas alíquotas uma com o diluente de K e outra alíquota com diluente de KG. As amostras foram resfriadas à 10°C. As análises subjetivas usuais foram feitas nos tempos 0, 24 e 48 horas. Estas análises incluíram turbilhonamento, motilidade e vigor. Foram feitas também análises de testes funcionais como a avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal através das colorações de eosina-nigrosina e técnica da coloração Fast Green / Rosa Bengala (POPE, 1991) respectivamente, avaliação da atividade citoquímica mitocondrial através da coloração de diaminobenzidina (DAB) e avaliação da susceptibilidade do espermatozóide ao estresse oxidativo através da avaliação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico após a incubação com sistema gerador constituído de sulfato de ferro e ascorbato. Neste trabalho o tempo afetou significativamente a motilidade e o vigor espermático, caindo de  $79,16 \pm 1,41$  para  $40,25 \pm 2,55$  após 48hs e de  $3,92 \pm 0,06$ , para  $2,57 \pm 0,10$  após 48hs respectivamente. O tempo influenciou também a integridade das membranas plasmática e

acrossomal, fazendo com que houvesse uma queda gradativa nas integridades (0hs=95,75±0,36, 24hs=90,69±0,99, 48hs=86,11±1,45) e (0hs=90,34±0,80, 24hs=84,33±1,30, 48hs=76.67±1,69) respectivamente. Foi possível observar também que ao longo do tempo houve uma diminuição da atividade mitocondrial e um aumento nas espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que diferiu do tempo 0hs para o tempo 48hs (807,42±39.22 e 937,76 ± 41,87). Verificou-se ainda que o meio K apresentou maiores valores de vigor do que o meio KG (p=0,0144), e que o meio K foi capaz de preservar melhor a atividade mitocondrial P=0,0005. A concentração de TBARS no diluente K correlacionou-se negativamente com as variáveis motilidade, vigor, integridade de membrana plasmática e acrossomal. No diluente KG as correlações do TBARS e DAB III foram positiva (r=0,35), demonstrando que quanto maior a quantidade de células com baixa atividade mitocondrial, maior a concentração de TBARS. Foi também encontrada uma correlação negativa entre a variável integridade de acrossomo (ACRO) e TBARS (r=-0,40; P=0,0001), mostrando que quanto menor a porcentagem de células com acrossomo integro, maior a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Concluindo que o diluente K foi eficaz em preservar as características seminais de ovino por até 48 horas e que a adição da gema de ovo ao diluente de Kenney não foi capaz de melhorar estas características.

Palavras-chave: Ovino. Sêmen resfriado. Diluente de Kenney. Perfil oxidativo. Gema de ovo.

## ABSTRACT.

OLIVEIRA NETO, F. A. **Effect of the addition of egg yolk to the Kenney extender for the cooling of ram semen.** [Efeito da adição de gema de ovo no diluente de Kenney para o resfriamento de sêmen ovino.] 2012. 74 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Among the reproductive biotechniques routinely used in animal production, the artificial insemination (AI) is known to provide a greater gain in genetic improvement programs. The adequate selection of female and especially male productive and reproductive traits is the keystone to maximize the potential of this technique. Semen used for AI can be used fresh diluted or not, chilled and frozen. An essential role is played by semen extenders on volume expansion, allowing not only the fractioning in multiple insemination doses, but also the maintenance of sperm fertilizing potential. Therefore, for semen fractioning, chilling or cryopreservation, extenders are required to be atoxic, must maintain pH and osmolarity compatible to the sperm survival, and should be preferably inexpensive and easy to prepare. Therefore, the objective of the present study was to evaluate chilled ram semen using the Kenney extender (K) of the Kenney extender with egg yolk (KG) for 48 h. Forty ejaculates of four rams were (n=40) were used. Samples were equally divided into two aliquots and extended in K extender and KG extender. Samples were chilled at 10°C and evaluated immediately after chilling (0h), 24 and 48 h later. These analyses included gross motility (swirl pattern), individual motility and vigor. Functional test analyses such as evaluation of plasma membrane integrity using the eosin-nigrosin staining technique, acrosome integrity using the fast green / bengal rose staining method (POPE, 1991), mitochondrial cytochemical activity evaluation utilizing diaminobenzidine (DAB) staining and assessment of sperm susceptibility to the oxidative stress based the levels of thiobarbituric acid reactive substances after the incubation with ferrous sulphate and ascorbate (TBARS) were performed. In this study, a significant influence of chilling period was found for spermatoc motility and vigor dropping from  $79.16 \pm 1.41$  to  $40.25 \pm 2.55$  after 48 hours and from  $3.92 \pm 0.06$  to  $2.57 \pm 0.10$  after 48 hours, respectively. Time also negatively influenced the integrity of plasma and acrosomal membrane (0hr= $95.75 \pm 0.36$ , 24hrs= $90.69 \pm 0.99$ , 48hrs= $86.11 \pm 1.45$ ; and 0hr= $90.34 \pm 0.80$ , 24hrs= $84.33 \pm 1.30$ , 48hrs= $76.67 \pm 1.69$ ,

respectively). Also, during the course of time there was a decrease in mitochondrial activity and an increase in TBARS, with an increase from moment 0 to 48 hrs ( $807.42 \pm 39.22$  and  $937.76 \pm 41.87$ ). It was also found that the medium K had greater values of vigor than the medium KG ( $p=0.0144$ ), and that the medium K was capable of better preserve mitochondrial activity ( $P=0.0005$ ). A negative correlation was found between the TBARS concentration with motility and vigor and plasma and acrosomal membrane integrity when samples were stored with the extender K. In the KG extender, the TBARS and DAB III correlations were positive ( $r=0, 35$ ) indicating that showing that the greater the number of cells with low mitochondrial activity, the higher the TBARS concentration. Also, a negative correlation between the acrosomal integrity variable (ACRO) and TBARS ( $r=-0, 40$ ;  $P=0,0001$ ) was found, which demonstrates that the lower the percentage of cells with intact acrosomal, the higher the susceptibility to the oxidative stress. Therefore, results indicated that the K extender was effective in preserve the seminal characteristics of ovine for 48 hours and the addition of egg yolk to kenney extender was not capable of improving such characteristics.

Key-words: ovine, cooled semen, kenney extender, oxidative profile, egg yolk.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito do meio de refrigeração (Kenney e Kenney com gema de ovo) e do tempo de refrigeração (0, 24 e 48hs) e da interação entre meio e tempo sobre as variáveis motilidade, vigor, integridade de membrana, potencial de atividade mitocondrial (DAB I, II, III e IV), integridade de acrossomo e TBARS de amostras seminais refrigeradas à 10°C, de carneiros SRD. Poços de Caldas, 2012 .....	47
Tabela 2 - Efeito dos meios Kenney (K) e Kenney com gema de ovo (KG) nas variáveis: motilidade e vigor de amostras seminais refrigeradas de carneiros SRD, mantidas por até 48hs à 10°C. Poços de Caldas, 2012.....	48
Tabela 3 - Efeito do tempo de armazenamento (0, 24 e 48hs) nas variáveis: motilidade e vigor de amostras seminais de carneiros SRD, refrigeradas à 10°C em meios Kenney e Kenney com gema de ovo. Poços de Caldas, 2012 .....	48
Tabela 4 - Efeito dos meios Kenney (K) e Kenney com gema de ovo (KG) nas variáveis: membrana plasmática e membrana acrossomal de amostras seminais refrigeradas de carneiros SRD, mantidas por até 48hs à 10°C. Poços de Caldas, 2012 .....	49
Tabela 5 - Efeito do tempo de armazenamento (0, 24 e 48hs) nas variáveis: membrana plasmática e membrana acrossomal de amostras seminais de carneiros SRD, refrigeradas à 10°C em meios Kenney e Kenney com gema de ovo. Poços de Caldas, 2012 .....	49
Tabela 6 - Efeito dos meios Kenney (K) e Kenney com gema de ovo (KG) nas variáveis de potencial de atividade mitocondrial: DABI, DABII, DABIII, DABIV de amostras seminais refrigeradas de carneiros SRD, mantidas por até 48hs à 10°C. Poços de Caldas, 2012 .....	50
Tabela 7 - . Efeito do tempo de armazenamento (0, 24 e 48hs) nas variáveis de potencial de atividade mitocondrial: DABI, DABII, DABIII, DABIV de amostras seminais de carneiros SRD, refrigeradas à 10°C em meios Kenney e Kenney com gema de ovo. Poços de Caldas, 2012 .....	50
Tabela 8 - Efeito dos meios Kenney (K) e Kenney com gema de ovo (KG) na variável: TBARS de amostras seminais refrigeradas de carneiros SRD, mantidas por até 48hs à 10°C. Poços de Caldas, 2012 .....	51
Tabela 9 - Efeito do tempo de armazenamento (0, 24 e 48hs) na variável: TBARS de amostras seminais de carneiros SRD, refrigeradas à 10°C em meios Kenney e Kenney com gema de ovo. Poços de Caldas, 2012 .....	51
Tabela 10 - Coeficientes de correlação e respectivos níveis de significância das variáveis: motilidade, vigor, integridade de membrana, potencial de atividade mitocondrial (DAB I, II, III e IV), integridade de acrossomo e Tbars de amostras seminais refrigeradas, de carneiros SRD no meio de Kenney .....	52
Tabela 11 - Coeficientes de correlação e respectivos níveis de significância das variáveis: motilidade, vigor, integridade de membrana, potencial de atividade mitocondrial (DAB I, II, III e IV), integridade de acrossomo e Tbars de amostras seminais refrigeradas, de carneiros SRD no meio de Kenney acrescido de gema de ovo .....	53

## LISTA DE SIMBOLOS

%	Porcentagem
<	menor que
®	marca registrada
µL	Microlitro
ACRO	Acrossomo
DAB	3,3 diaminobenzidina
DMPBS	solução tampão de fosfato
DNA	ácido desoxirribonucléico
E/N	eosina – nigrosina
Hs	Horas
IA	Inseminação artificial
K	Kenney
KG	Kenney com gema
Kg	Quilograma
LDL	lipoproteínas de baixa densidade
MDA	Malondialdeído
MI	Membrana integra
MOT	Motilidade
°C	graus Celsius
P	nível de significância
Ph	potencial hidrogênio iônico
POPE	coloração simples
PUFAs	ácidos graxos poli-insaturados
ROS	espécies reativas de oxigênio
TBA	teste do ácido 2-tiobarbitúrico
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
UHT	Ultra-high temperature

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	23
2.1	INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM OVELHAS .....	23
2.2	EFEITO DO ARMAZENAMENTO .....	24
2.3	DILUENTE À BASE DE GEMA DE OVO .....	26
2.4	DILUENTE À BASE DE LEITE .....	28
3	<b>HIPÓTESE</b> .....	32
4	<b>OBJETIVOS</b> .....	34
5	<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	36
5.1	LOCAL .....	36
5.2	ANIMAIS .....	36
5.3	COLHEITA E PROCESSAMENTO DO SÊMEN .....	37
5.4	DILUIÇÃO .....	37
5.5	ARMAZENAGEM .....	38
5.6	AVALIAÇÃO .....	38
5.6.1	Integridade da membrana plasmática .....	39
5.6.2	Integridade da membrana acrossomal .....	39
5.6.3	Atividade mitocondrial .....	40
5.6.4	Susceptibilidade ao estresse oxidativo (TBARS) .....	41
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	42
6	<b>RESULTADOS</b> .....	45
7	<b>DISCUSSÃO</b> .....	53
7.1	TEMPO DE ARMAZENAMENTO .....	53

7.1.1	<b>Motilidade e vigor</b> .....	53
7.1.2	<b>Integridade de membrana plasmática e acrossomal</b> .....	55
7.1.3	<b>Potencial de atividade mitocondrial</b> .....	55
7.1.4	<b>TBARS</b> .....	56
7.2	<b>EFEITO DO DILUENTE</b> .....	57
7.2.1	<b>Motilidade e vigor</b> .....	58
7.2.2	<b>Integridade de membrana plasmática e acrossomal</b> .....	59
7.2.3	<b>Potencial de atividade mitocondrial</b> .....	60
7.2.4	<b>TBARS</b> .....	61
7.2.5	<b>Correlações</b> .....	61
8	<b>CONCLUSÕES</b> .....	65
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	67



# **INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

A espécie ovina foi uma das primeiras a ser domesticada pelo homem. A ovinocultura está presente em praticamente todos os continentes e a ampla difusão da espécie se deve principalmente ao seu poder de adaptação a diferentes climas, relevos e vegetações (VIANA, 2008).

No Brasil o consumo de carne ovina ainda é limitado em comparação a outros produtos de origem animal. Da mesma forma o consumo médio mundial de carne ovina não ultrapassa 2kg per capita ano, No entanto, países como Mongólia, Nova Zelândia e Islândia, apresentam os maiores consumos de carne ovina, com 39kg, 24kg e 22kg per capita ano, respectivamente (VIANA, 2008), demonstrando um grande potencial de aumento de consumo no Brasil.

Neste contexto, o Brasil apresenta vocação para a atividade agropecuária, porém, muitas atividades relacionadas ao agronegócio ainda não apresentam sua máxima eficiência em relação à produtividade. Com a ovinocultura não é diferente (RODRIGUES, 2012). No entanto, os preços pagos ao produtor elevaram-se na última década, tornando a atividade atraente e rentável. Apesar do crescimento da produção de carne nos últimos anos, o Brasil realiza importações de carne ovina para abastecer o mercado consumidor, visto que a oferta de carne ainda é insuficiente (VIANA, 2008).

Segundo Bicudo et al. (2005), as inadequadas técnicas aplicadas à reprodução nos rebanhos, pode comprometer a lucratividade da exploração por impedir que o potencial produtivo máximo do rebanho seja atingido. Biotecnologias como a inseminação artificial, transferência de embriões e fertilização *in vitro* (FIV) são empregadas, cada vez mais corriqueiramente, na ovinocultura nacional, visando a excelência dos rebanhos.

A inseminação artificial (IA) é uma biotécnica de grande importância, desenvolvida para o manejo reprodutivo e melhoramento genético dos animais, visto que é ferramenta de controle de enfermidades reprodutivas, possibilita a dispersão de material genético, favorece testes de progênie, implanta programas de controle zootécnico e melhor utiliza reprodutores de relevância produtiva (HAFEZ; HAFEZ 2004). A necessidade de se inseminar grande número de ovelhas com sêmen de

carneiros oriundos de criatórios distantes estimulou o desenvolvimento de técnicas de transporte e estocagem de sêmen (SALAMON et al., 2000). Para se obter resultados produtivos satisfatórios, faz-se necessário o emprego de biotecnologias como a inseminação artificial e para que esta tecnologia tenha sucesso é preciso o controle de fatores limitantes, como o sêmen (RODRIGUES, 2012).

Dentre as possibilidades de conservação de sêmen, a refrigeração permite a utilização do mesmo por até 24 horas após sua colheita, com excelente resultado de fertilidade (BICUDO; SOUSA; TAKADA, 2003).

Segundo Cardoso et al. (2009) a inseminação artificial via cervical com sêmen fresco apresenta menor custo por cordeiro produzido, quando comparada às demais técnicas. A inseminação cervical com sêmen congelado, em função das baixas taxas de fertilidade proporcionadas, apresenta-se economicamente inviável, enquanto que a inseminação artificial por laparoscopia, apesar de proporcionar taxas de fertilidade satisfatórias, contribui para elevação do custo do cordeiro produzido.

Em comparação ao sêmen congelado, a IA com sêmen refrigerado apresenta maiores chances de popularização, por necessitar de técnicas menos sofisticadas de deposição do sêmen no genital feminino, equipamentos menos onerosos e menor rigor na cronologia do momento de inseminação (BICUDO; SOUSA; TAKADA, 2003). No entanto, tanto para o sêmen criopreservado como refrigerado, é fundamental o desenvolvimento de diluidores que permitam uma maior viabilidade do sêmen até o momento da utilização.

Os diluidores de sêmen são soluções destinadas a proteger os espermatozoides de condições desfavoráveis e prolongar sua sobrevivência durante a refrigeração e o transporte, além de apresentarem a vantagem de aumentar o volume da dose inseminante e auxiliarem na análise do sêmen (BALL, 1998).

Devido à ausência de diluidores disponíveis para ovinos, uma alternativa seria a utilização de diluidores desenvolvidos para outras espécies. Os diluidores mais utilizados para sêmen equino em todo o mundo, assim como no Brasil, são derivados do diluente de Kenney, que é a base de leite em pó desnatado, glicose, penicilina e estreptomicina.

Por outro lado, a gema de ovo têm sido utilizada como base de diluidores para sêmen, tanto para refrigeração como para criopreservação em diversas espécies (BARROS, 2007). Esta substância minimiza os efeitos do choque térmico,

provavelmente pela ação protetora das lipoproteínas de baixa densidade (GRAHAM e FOOTE, 1987), que permanecem firmemente ligadas aos espermatozóides, em especial a lipoproteína 3 (FOULKES, 1980). Assim, uma alternativa para melhorar a qualidade do sêmen refrigerado de ovinos, seria a utilização de diluidores a base de leite acrescidos da gema de ovo, o que poderia conferir uma proteção adicional aos espermatozóides.



# **REVISÃO DE LITERATURA**

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A ovinocultura brasileira está amadurecendo. Há um crescente interesse na produção de carne de cordeiro e não apenas, na produção de animais de elite. A falta de planejamento ainda é uma das principais características de quem inicia a criação. O modismo já foi mais evidente em anos anteriores, mas ele ainda marca presença. O mercado está aquecido e o produtor precisa ter em mente que iniciar uma produção animal é equivalente à abertura de um novo empreendimento e todos os detalhes e minúcias devem ser anotados e contabilizados. A mão de obra especializada não é um problema apenas para a ovinocultura. Cada dia que passa o número de pessoas dispostas a trabalhar no campo diminui. Esse problema é agravado pelo fato de o Brasil não possuir uma cultura forte para essa produção (RODRIGUES, 2012).

### 2.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM OVELHAS

A ovelha apresenta excelente competência no fechamento do canal cervical (BICUDO et al., 2005). O lúmen é bastante contorcido, possuindo de 4 a 7 anéis cervicais que funcionam como barreira física de contaminantes externos (FERRA; SERENO, 2006).

A biotécnica da inseminação artificial (IA) tem sido utilizada como um instrumento rápido e seguro para promoção do melhoramento genético (CARDOSO, 2009).

As inseminações envolvendo sêmen fresco ou resfriado são feitas pela técnica cervical superficial (BICUDO et al., 2005).

A técnica cervical consiste em depositar o sêmen dentro da cérvix. Utiliza-se um espéculo para visualização da cérvix. É uma técnica rápida e de fácil aplicação, com custos relativamente baixos. Podendo ser utilizada com sêmen refrigerado.

A inseminação via cervical com sêmen diluído é o método mais utilizado em ovelhas, por ser uma técnica de aplicação fácil e rápida, por apresentar custos

relativamente baixos e ainda, por possibilitar a obtenção de resultados satisfatórios de fertilidade (CARDOSO, 2009).

## 2.2 EFEITO DO ARMAZENAMENTO

Independentemente do diluente, a taxa de diluição, a temperatura e as condições de armazenamento, este deteriora os espermatozóides, sendo este efeito mais pronunciado com o aumento da duração de armazenamento (SALAMON; MAXWELL, 2000). Estudos têm sido realizados sobre o armazenamento de sêmen ovino na forma líquida, avaliando os efeitos dos diluidores sobre a qualidade do sêmen armazenado a 5°C (GUNDOGAN et al., 2010; LOPEZ-SAEZ et al., 2000).

Quando o sêmen é diluído e armazenado, a sua utilização prática no estado líquido sob condições de exploração pode ser facilitada. O sêmen ovino tem sido amplamente diluído com Tris acrescido de gema de ovo destinada a proteger e manter o espermatozóide durante o processamento e armazenamento do sêmen (GUNDOGAN et al., 2010). Sempre que possível, a inseminação cervical deve ser realizada dentro de 24 h após a colheita do sêmen para se obter taxas de prenhez aceitáveis. Em situações onde isso não é possível, o sêmen armazenado a 5°C ainda pode ser usado para a inseminação cervical até 3 dias pós colheita, embora as taxas de prenhez diminuam (O'HARA et al., 2010).

Em teste de campo Colas et al. (1968 apud MAXWELL; SALAMON, 1993) compararam diluentes à base de gema de ovo e à base de leite em diferentes temperaturas. Neste estudo o resultado obtido foi uma melhor taxa de prenhez quando o sêmen estava diluído com diluente à base de leite e armazenado na temperatura de 15°C por até 26 hs.

Para Cseh, Faigl e Amiridis (2012) a inseminação por via cervical deve ser realizada dentro de até 24h após a colheita do sêmen para se obter taxas de prenhez aceitáveis, mas em situações especiais, o sêmen de carneiros armazenados à 5°C ainda pode ser usado para a inseminação cervical mesmo passado 3 dias após a colheita.

Segundo Chang e Walton (1940) e alguns pesquisadores soviéticos a temperatura de 10-15°C foi a "temperatura" ideal para preservar o sêmen em estado



líquido. Quanto ao leite desnatado reconstituído, pesquisadores franceses descobriram que a viabilidade e fertilidade dos espermatozóides de carneiro foi melhor após o armazenamento por 8-16 horas a 15°C do que em 5°C (SALAMON; MAXWELL, 2000).

Langford e Fiser (1980) também relataram que o armazenamento de sêmen ovino em diluente à base de leite desnatado à 15°C foi mais satisfatório do que quando armazenado a 4°C.

Nos estudos realizados, na Irlanda (GORDON 1975), no Reino Unido (REED et al. 1977) e na Austrália (MAXWELL, 1984), onde foram inseminadas ovelhas em estro natural com sêmen armazenado por até 16 hs, a 15°C e diluído em diluente a base de leite desnatado, foram obtidas taxas de nascimento entre 65% e 75% (MAXWELL; SALAMON, 1993).

Gundogan et al. (2010), comparando o sêmen fresco, com o sêmen resfriado de ovino observou que ocorre uma diminuição na motilidade e integridade morfológica, acompanhada por um declínio na capacidade de sobrevivência no trato reprodutivo da fêmea, com redução da fecundidade e aumento da perda embrionária. Nos estudos de López-Pérez e Pérez-Clariget (2012) foi concluído que o sêmen ovino adicionado de plasma seminal ao tampão TRIS-gema e armazenado a 5°C durante 24 h pode ser usado e se obtém boas taxas de prenhez.

Menchaca, Pinczak e Queirolo (2005) também concluíram que é possível obter taxas de prenhez aceitáveis com ovelhas inseminadas artificialmente, após a detecção do estro utilizando sêmen diluído e armazenado à 5°C durante 12 horas, quando comparado com IA usando sêmen fresco.

Os resultados de Gundogan et al. (2010) demonstraram que a concentração espermática e os dias de armazenamento foram significativamente associados com a deterioração da motilidade, morfologia, membrana e integridade do DNA. Esses resultados foram semelhantes com os estudos anteriores de O'Hara et al. (2010), Paulenz et al. (2003) e Salamon e Maxwell (2000), onde foi relatado que a qualidade do sêmen ovino caiu drasticamente quando armazenado entre 3 e 5 dias no estado líquido.

Os resultados do estudo de O'Hara et al. (2010) indicaram que o sêmen ovino resfriado e armazenado a 15°C tem uma vida mais curta do que o sêmen resfriado a 5°C. Além disso, os diluentes comerciais testados por ele não diferiram

significativamente em termos de desempenho com o sêmen fresco *in vitro*, quando armazenados à 5°C.

Olivera-Muzante, Fierro e Gil (2011) obtiveram bons resultados de prenhez com sêmen ovino armazenado por 24h ou 48h em diluente a base de leite e gema (49 vs 47%,  $p > 0,05$ ).

Os resultados de Paulenz et al. (2005) indicaram que os diluentes a base de leite, preservaram a motilidade do espermatozóide e integridade acrossomal quando o sêmen de bode foi armazenado a 20°C durante até 28 hs.

### 2.3 DILUENTE À BASE DE GEMA DE OVO

A gema de ovo é um constituinte comum dos diluentes de sêmen, protegendo o espermatozóide contra o choque frio e conferindo proteção durante o congelamento e descongelamento. Acredita-se atuar na membrana celular, e tem um efeito melhor para espermatozóide de touro do que para espermatozóide de carneiro (SALAMON; MAXWELL, 2000).

A gema de ovo é geralmente utilizada na concentração de 20 % no diluente e evidências indicam que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são os constituintes da gema de ovo responsáveis pela proteção do espermatozóide (BERGERON; MANJUNATH, 2006).

Várias concentrações de gema de ovo já foram estudadas em diluentes para congelamento de sêmen ovino. Inicialmente os pesquisadores utilizavam de 30 à 50%, mas atualmente as concentrações incluídas no diluente são mais baixas. Para o congelamento de sêmen em palhetas a concentração ótima é de 15%, embora o efeito dependa da composição do diluente (SALAMON; MAXWELL, 2000).

Segundo Salamon e Maxwell (1995) a gema de ovo fornece proteção contra o choque frio, preserva a motilidade dos espermatozóides, reduz a perda de enzimas acrossomal e mantém a membrana mitocondrial.

Para Bergeron e Manjunath (2006) a associação do LDL com a membrana do espermatozóide proporciona proteção através da estabilização da membrana, mas não há provas suficientes sobre a estabilidade da associação do LDL com a membrana. Uma segunda hipótese sugere que os fosfolipídeos presente no LDL

protegem o espermatozóide através da formação de uma película de proteção sobre a superfície do espermatozóide ou através da substituição dos fosfolipídios de membrana do espermatozóide que são perdidos ou danificados durante o processo de criopreservação (FOULKES et al., 1980; GRAHAM; FOOTE, 1987). Uma terceira hipótese sugere que o LDL compete com os peptídeos prejudiciais do plasma seminal na ligação com a membrana do espermatozóide e assim protegendo-o. (VISHWANATH et al., 1992).

Segundo Moustacas et al. (2011) o efeito crioprotetor da gema de ovo é derivado da baixa densidade das lipoproteínas (LDL). Com isso objetivou avaliar a eficácia de substituição da gema de ovo do diluente tris-glucose com várias concentrações de LDL purificado extraídos a partir da gema de ovo. Concluindo que LDL, não foi suficientemente bom para substituir a gema de ovo inteira nos diluentes testados para congelamento de semen ovino.

Jiménez et al. (2004) concluiu que a gema de ovo em pó pode ser utilizada nos diluentes para criopreservação de sêmen ovino. No entanto, a fertilidade *in vivo* do espermatozóide criopreservado em diluente contendo gema de ovo em pó deve ser testada. Pois não se sabe se o processo de pasteurização é uma garantia suficiente contra o crescimento microbiológico no diluente. Além disso, as altas temperaturas necessárias para a pasteurização pode induzir modificações bioquímicas nas proteínas da gema de ovo, que podem induzir a coagulação ou a sedimentação dos componentes do diluente como a lipoproteína. (LANDFELD et al., 2002).

Em estudo comparando a gema de ovo, a proteína de soja e os diluentes à base de leite. Kasimanickam et al. (2011) verificaram não existir diferença significativa durante os primeiros quatro dias de armazenamento entre os diferentes diluentes em relação ao índice de fragmentação do DNA.

No estudo de Paulenz et al. (2003) os diluentes à base de gema de ovo tiveram uma melhor capacidade de proteção do espermatozóide em relação aos diluidores à base de leite após 30 h de armazenamento. Em relação a motilidade espermática, integridade da membrana plasmática e a taxa de capacitação.

Em outro estudo, uma melhor taxa de não-retorno ao cio após 25 dias da IA e melhor taxa de parição foram relatada quando se utilizou um diluente à base de leite, em comparação com o diluente Tris gema de ovo (PAULENZ et al., 2002)

Maia et al. (2005), observaram que a adição de Equex-STM apresentou um efeito benéfico à motilidade espermática, quando adicionado ao meio Tris-gema, nas concentrações de 0,5 ou 1%, aumentando significativamente ( $p < 0,05$ ) a motilidade total e progressiva do espermatozóide em relação ao meio sem detergente.

## 2.4 DILUENTE À BASE DE LEITE

O leite integral, desnatado ou reconstituído também têm sido utilizado por muitos anos como diluente de sêmen ovino. O sucesso deste diluente tem sido atribuído à sua fração proteica, que pode atuar como um tampão contra a variação do pH e como um agente quelante contra quaisquer metais pesados presentes. Também pode parcialmente proteger o espermatozóide durante a redução da temperatura para o armazenamento (SALAMON; MAXWELL, 2000).

Os diluentes à base de leite desnatado têm um desempenho aceitável in vitro e in vivo para a preservação de sêmen no estado líquido (MAXWELL; SALAMON 1993; PAULENZ et al., 2003).

Os primeiros relatos sobre o uso de leite como um diluente para sêmen ovino foram feitos por Emmens e Robinson em 1962, onde concluíram que o diluente à base de leite foi superior quando comparado com o diluente à base de gema de ovo (MAXWELL; SALAMON, 1993).

Para Colas et al. (1968 apud MAXWELL; SALAMON, 1993) nos seus estudos comparando tipos de diluente e temperatura de armazenamento, o diluente com leite desnatado reconstituído para o armazenamento de sêmen ovino foi melhor no armazenamento à 15°C do que à temperatura de 4°C.

Mampouya (1973 apud MAXWELL; SALAMON, 1993) mostrou que a motilidade dos espermatozóides diminuiu mais rapidamente na presença de diluentes contendo gema de ovo do que em diluentes de leite em pó desnatado.

Colas (1975 apud MAXWELL; SALAMON, 1993) em seu estudo afirmou que os diluentes à base de gema de ovo eram menos adequados do que os diluentes à base de leite desnatado reconstituído para a diluição do sêmen de carneiro e posterior inseminação de ovelhas em cio sincronizado.

O leite desnatado é tão eficiente quanto o leite integral em proteger o espermatozóide durante o armazenamento a 4°C ou durante a criopreservação (FOOTE et al., 2002). Os lipídios não parecem ser o componente responsável pela proteção conferida pelo leite (BERGERON; MANJUNATH, 2006).

Nos estudos de Kasimanickam et al. (2011) o potencial da membrana mitocondrial e motilidade progressiva total permaneceram, sem diferença estatística entre o diluente com gema de ovo e o diluente com leite para dois dias de armazenamento à 4°C.

Tem sido mostrado que as micelas de caseína isoladas a partir do leite podem proteger o sêmen de garanhão, bode, carneiro e touro durante o armazenamento entre 4°C e 5°C. No entanto, o mecanismo pelo qual as micelas de caseína protegem o espermatozóide durante o armazenamento não está bem elucidado (BERGERON; MANJUNATH, 2006).

Nos estudos de Olivera-Muzante, Fierro e Gil (2011), a taxa de concepção de ovelhas inseminadas com sêmen preservado por 24 h com leite UHT acrescido de gema não diferiu ( $p > 0,05$ ) do grupo controle leite-UHT (ultra-high temperature).

Paulenz et al. (2009) não encontraram diferenças de fertilidade após 12 ou 24 h de preservação ao usar extensores à base de leite. O'Hara et al. (2010) também relataram resultados semelhantes em 24 e 48 horas de preservação utilizando o INRA-96 que também é um diluente à base de leite.

Paulenz et al. (2003) inseminando ovelhas por via vaginal com sêmen refrigerado em diluente à base de leite obtiveram um aumento estatisticamente significativo de 10% na fertilidade ( $P < 0,01$ ), comparando a taxa de não retorno ao cio aos 25 dias pós IA e taxa de parição, em comparação com o sêmen diluído no TRIS.

**HIPÓTESES**



### **3 HIPÓTESES**

O diluente de Kenney pode ser usado na conservação do sêmen ovino resfriado.

O diluente de Kenney acrescido de gema de ovo melhora a qualidade espermática do sêmen ovino resfriado ao longo do tempo.



# **OBJETIVOS**

#### **4 OBJETIVOS**

Este trabalho teve por objetivo avaliar a conservação de sêmen ovino resfriado com diluente de Kenney ou diluente de Kenney acrescido de gema de ovo por um período de 48 horas. Buscar um diluente para sêmen ovino de baixo custo e de fácil manipulação, capaz de preservar o sêmen ovino resfriado com bons resultados nas análises subjetivas usuais por até 48 horas. O diluente de Kenney poderá se constituir em um eficiente diluente capaz de resfriar e preservar o sêmen ovino, tornando-se mais uma alternativa mercadológica para a área de reprodução animal, uma vez que este apresenta relação custo/benefício equiparável aos diluentes tradicionais.

# **MATERIAIS E MÉTODOS**

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo obedeceu aos princípios éticos da experimentação animal da comissão de ética da faculdade de medicina veterinária e zootecnia da Universidade de São Paulo, sendo aprovado sob o protocolo nº 2620/2012 e intitulado “Efeito da adição de gema de ovo no diluente de Kenney para o resfriamento de sêmen ovino”.

### 5.1 LOCAL

O presente experimento foi realizado nas instalações da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Campus de Poços de Caldas e no Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no período de julho a setembro de 2011.

### 5.2 ANIMAIS

Foram utilizados quatro carneiros (*Ovis aries*) sem raça definida. Estes animais tinham dieta à base de silagem de milho e concentrado comercial, com água *ad libitum*, mantidos em baias com dimensão 3x3m forradas com serragem de maravalha. Todos os animais apresentavam-se com bom escore de condição corporal.

### 5.3 COLHEITA E PROCESSAMENTO DO SÊMEN

As colheitas foram feitas uma ou até duas vezes por semana para cada animal sempre nas segundas ou terças-feiras, possibilitando a realização do estudo, sem aplicar um regime de colheita exagerado aos animais, totalizando 40 colheitas. Todas feitas em vagina artificial com água a 50°C acoplada a tubos de centrífuga de 50 ml, utilizando como manequim uma fêmea ovina, pois segundo Jiménez, (2004), a colheita de sêmen ovino deve ser, preferencialmente, realizada pelo método de vagina artificial, em virtude desta metodologia se aproximar das condições de monta natural, influenciando positivamente a libido do macho e os parâmetros espermáticos do ejaculado.

Após a colheita, os ejaculados obtidos de um animal eram divididos em duas alíquotas iguais, distribuídas em tubos de ensaio de 15mL. Após esta distribuição, o sêmen era submetido aos tratamentos de resfriamentos com Kenney ou Kenney mais gema de ovo de galinha e as amostras, acondicionadas em caixas de transportes.

O diluente de Kenney et al. (1975), é à base de leite em pó desnatado, glicose, penicilina e estreptomicina.

Para este estudo, foram utilizados diluentes de Kenney (Equimix®, Nutricell Diluentes Celulares Ltda.) de um único lote. O diluente Kenney com gema de galinha foi preparado a partir do Kenney misturado com gema de ovo de galinha. A concentração de gema de ovo foi de 20%. Para este tratamento foi adicionado o detergente *orvus as paste* à mistura de forma que correspondesse a 1% do diluente final.

### 5.4 DILUIÇÃO

O sêmen proveniente de cada colheita foi submetido aos dois tratamentos logo após a análise de turbilhonamento. Inicialmente, uma alíquota dos ejaculados foi pré-diluída em cada tratamento. A partir daí, realizou-se a concentração de forma

que o sêmen fosse conservado a concentração de  $150 \times 10^6$  espermatozoides totais por ml.

## 5.5 ARMAZENAGEM

As amostras foram resfriadas em caixas de transporte, que tiveram as temperaturas interna e ambiente acompanhadas a cada 24 horas com termômetro de máxima e mínima. O gelo reciclável foi trocado, dadas 24 horas do início do resfriamento. A temperatura interna foi mantida entre 8°C e 12°C.

## 5.6 AVALIAÇÃO

O sêmen foi analisado nos tempos 0, 24 e 48 horas após o resfriamento. Como avaliação convencional utilizou-se a motilidade e o vigor. Usualmente, a motilidade e vigor espermáticos são estimados de forma subjetiva, sendo analisados sob microscopia de luz, com uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula, estimando-se a porcentagem, apenas visualmente. (ARRUDA; CELEGHINI; ANDRADE, 2004).

A estimativa da porcentagem de células espermáticas exibindo movimento progressivo é a avaliação mais utilizada durante a análise seminal e deve ser superior a 70%, quando se trata de amostra seminal fresca (FONSECA et al., 1997). Logo após a análise de motilidade e vigor, as amostras foram lavadas para a retirada do diluidor que poderia influenciar nos testes posteriores. Para isso, 500 µl de cada amostra foi centrifugada numa rotação de 400 G por 10 minutos duas vezes. Para tanto, as alíquotas foram adicionadas e homogeneizadas a um volume de 5 ml de DMPBS para a centrifugação ambas as vezes. A ressuspensão final foi feita num volume de 500 µl de DMPBS e esta alíquota foi utilizada para a realização das avaliações funcionais do sêmen.

### 5.6.1 Integridade da membrana plasmática

Para avaliação funcional da membrana plasmática, foi usada a coloração de Eosina-Nigrosina (E/N) segundo Barth e Oko (1989). Pois apesar de existirem vários testes que podem ser empregados para a determinação da integridade da membrana plasmática, como as colorações supravitais, incluindo Tripan-Blue-Giensa, testes hiposmóticos e, mais recentemente, o uso das sondas fluorescentes que atuam através de reações com enzimas citoplasmáticas ou de ligação com o DNA espermático (ARRUDA et al., 2005), mas é uma técnica pouco aplicável a campo pois há necessidade de equipamentos de custo muito alto como um microscópio de epifluorescência ou um citômetro de fluxo. Enquanto o teste de eosina-nigrosina (HANCOCK, 1951). É um teste muito prático e de baixo custo, podendo ser rotineiramente utilizado à campo para avaliar a integridade da membrana espermática (JEYENDRAN et al., 1984; KUMI-DIAKA; BADTRAM, 1994). Nesta coloração, por alterações na permeabilidade das membranas dos espermatozoides, a eosina consegue penetrar nas células corando-as de rosa. Os espermatozoides com membranas íntegras não permitem a entrada do corante, portanto, contrastando com o plano de fundo tomado pela coloração escura da nigrosina, as células aparecem brancas. Desta maneira, uma alíquota de sêmen (5 µl) é misturada ao corante, na proporção de 1:1 e realizados esfregaços sobre lâminas de microscopia. Foram contadas 200 células do esfregaço em microscópio convencional sob aumento de 1000 vezes (NICHI, 2009).

Teoricamente, a integridade da membrana em uma célula viva impede a impregnação de colorações, o que não acontece em células mortas cujas membranas estão alteradas (RODRIGUÊS, 2009).

### 5.6.2 Integridade da membrana acrossomal

A avaliação da integridade da membrana acrossomal pode ser feita observando suas alterações morfológicas (microscopia eletrônica) ou através de testes funcionais, lançando-se mão do uso de corantes ou de sondas fluorescentes

(POPE; ZHANG; DRESSER, 1991). As sondas fluorescentes, para avaliação das membranas espermáticas, já têm sido empregadas nas pesquisas realizadas nos últimos anos. (CELEGHINI, 2005). Porém Pope, Zhang e Dresser (1991) desenvolveram um método simples e rápido para a coloração desta organela, comprovando sua eficácia para a avaliação da integridade acrossomal do espermatozóide de gato doméstico (*F. catus*), gato-do-deserto-indiano (*F. silvestris ornata*), do gato selvagem (*F. chaus*) e do leopardo-das-neves (*P. uncia*). Desde então, esta coloração vem sendo cada vez mais utilizada para avaliação da integridade acrossomal de espermatozoides de diversas espécies (SPINDLER et al., 2004). Com esta técnica basta uma alíquota de cada amostra (5 µl) ser adicionada ao Corante Simples de Pope (5 µl). Para serem feitos esfregaços sobre lâminas de microscopia, os quais foram analisados contando 200 células em microscópio convencional sob aumento de 1000 vezes (NICHI, 2009).

### 5.6.3 Atividade mitocondrial

A avaliação da atividade mitocondrial pode ser realizada utilizando-se testes tais como a Rodamina 123, o JC-1 e o Mito-tracker®, entre outros. No entanto, na maioria das vezes, estes testes, por utilizarem fluorescência, se tornam muito dispendiosos e pouco práticos para sua utilização rotineira, visto que o material precisa ser analisado num curto espaço de tempo (CELEGHINI et al., 2007). Diante disto, é de grande valia utilizar técnicas mais práticas, como a desenvolvida por Hrudka (1987), a qual se trata de um ensaio citoquímico para demonstração qualitativa e quantitativa da atividade da enzima Citocromo C-Oxidase (CCO) (RODRIGUÊS, 2009).

Segundo Hrudka (1987), a enzima Citocromo C-Oxidase (CCO) tem um papel fundamental no processo de respiração celular e metabolismo energético das células, além disso, é pré-requisito para as funções osmótica e sintética, motilidade e manutenção da estrutura celular. A técnica citoquímica desenvolvida por este autor é baseada na oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) pelo Complexo Citocromo C, o que inclui a CCO, através de uma reação em cadeia na qual o reagente é polimerizado e se deposita nos locais onde ocorre a reação, ou seja, se restringe à



mitocôndria. Esta deposição pode ser identificada através de microscopia em microscópio de contraste de fase, sob aumento de 1000 vezes, em imersão. Foram contados 200 espermatozoides por lâmina, e classificados de acordo com o grau de coloração da peça intermediária em 4 classes: Classe I quando as células espermáticas com peça intermediária foram totalmente corada indicando alta atividade mitocondrial (DAB I). Classe II quando as células espermáticas com mais da metade dos segmentos corados (ativos) indicando atividade mitocondrial média a alta (DAB II). Classe III quando as células espermáticas com menos da metade dos segmentos corados (ativos) indicando alto comprometimento da atividade mitocondrial (DAB III). Classe IV quando as células espermáticas com peça intermediária estavam totalmente descoradas indicando ausência de atividade mitocondrial (DAB IV). (NICHI, 2009).

#### 5.6.4 Susceptibilidade ao estresse oxidativo (TBARS)

Entre os diferentes métodos analíticos estabelecidos, a reação com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) é o mais utilizado, sendo que nesta reação, o composto formado pela reação entre o MDA e o TBA pode ser mensurado através de sua absorvância ou fluorescência (NICHI, 2003). Esta a avaliação da resistência ao estresse oxidativo foi feita com base na metodologia proposta por Ohkawa et al. (1979) e recentemente é utilizada por Nichi et al. (2006). Esta técnica visa verificar a susceptibilidade de uma amostra espermática ao estresse oxidativo. Assim, uma amostra apresentando uma quantidade alta de TBARS indicaria uma amostra bastante susceptível ao estresse oxidativo.

A dosagem de componentes oxidados, que se mantêm nos fluidos corporais, é uma técnica mais específica, sendo um destes componentes o malondialdeído (MDA), que pode ser usado como um índice de peroxidação lipídica (SLATER, 1984; JANERO, 1990; AITKEN et al., 1993; SIDHU et al., 1998). A ocorrência da peroxidação lipídica em espermatozoides leva a um acúmulo progressivo de hidroperóxidos lipídicos na membrana plasmática espermática que, posteriormente, se decompõem para formar o MDA. A avaliação dos níveis de MDA tem sido extensivamente utilizada, nas últimas quatro décadas, como marcador da

peroxidação lipídica (SLATER, 1984; JANERO, 1990). Entre os diferentes métodos analíticos estabelecidos, a reação com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) é o mais utilizado. Nesta reação, o composto formado pela reação entre o MDA e o TBA pode ser mensurado através de absorvância ou fluorescência. Estes produtos são então chamados de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs). Este método possui algumas desvantagens visto que, a alta temperatura e o baixo pH durante a reação podem causar a formação de alguns produtos de peroxidação relacionados à técnica. Além disso, diferentes substâncias, outras que não o MDA, podem reagir com o TBA, resultando em produtos de similar absorvância (JANERO, 1990).

Para esta avaliação, 400 µl da amostra foi incubada (60 minutos à 37°C) com um sistema de geração de ROS, constituído por ácido ascórbico (100 µl; 20mM) e o sulfato de ferro (100 µl; 4mM). Após o período de incubação, foram adicionados 1200µL de solução de ácido tricloroacético a 10% (TCA; 1:2) e centrifugadas por 15 minutos, a 5.000g, com a finalidade de separar as proteínas precipitadas e alíquotas de 1000µL do sobrenadante foram colocadas em tubos de ensaio juntamente com 1000 µL de ácido tiobarbitúrico a 1% (TBA). Os tubos contendo esta mistura foram incubados em banho-maria (100°C) por 15 minutos e resfriados imediatamente em banho de gelo, com a finalidade de interrupção da reação termo-dependente. As amostras foram então lidas em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 532 nm. Os valores de concentração foram calculados baseando-se em uma curva padrão previamente estabelecida.

## 5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados através do programa SAS System for Windows (SAS, 2000).

Através do aplicativo Guided Data Analysis, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos (distribuição normal) e homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem a estas premissas, foram transformados (logaritmo na base 10 -  $\text{Log}_{10}X$ ; Raiz quadrada - RQ X; Quadrado -  $X^2$ ) e se a normalidade não fosse obtida, empregava-se, então, o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica (Teste de Wilcoxon). Para as análises paramétricas foi utilizado o

teste t de Student para a comparação entre os meios e o teste Least Significant Differences (LSD) para a comparação entre os tempos.

Para descrição dos resultados, foram empregadas as médias, seus respectivos desvios padrões e seus intervalos de confiança dos dados originais e os níveis de significância ( $p$ ) dos dados originais, quando obedecessem às premissas; dos dados transformados, quando necessária a transformação; e dos dados analisados através da análise não paramétrica, quando não obedecessem às premissas e não houvessem transformações possíveis.

As variáveis resposta foram submetidas à análise de correlação de Pearson e Spearman para variáveis paramétricas e não paramétricas, respectivamente.

O nível de significância utilizado para rejeitar  $H_0$  (hipótese de nulidade) será de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerar-se-á que ocorreram diferenças estatísticas entre os diferentes grupos.

# RESULTADOS

## 6 RESULTADOS

De acordo com as análises estatísticas realizadas neste trabalho foi possível observar não haver interação dos meios de refrigeração com os tempos de refrigeração para nenhuma das variáveis (motilidade, vigor, integridade de membrana plasmática, DABI, DABII, DABIII, DABIV e TBARS) analisadas neste estudo com mostra a tabela 1. Isto indica que, independente dos tempos, as variáveis se comportaram de forma semelhante nos dois meios e, independente dos meios as variáveis se comportaram de forma semelhante nos diferentes tempos avaliados. Desta forma, todas as variáveis foram avaliadas quanto ao efeito dos meios e ao efeito dos tempos separadamente.

Tabela 1 - Efeito do meio de refrigeração (Kenney e Kenney com gema de ovo) e do tempo de refrigeração (0, 24 e 48hs) e da interação entre meio e tempo sobre as variáveis motilidade, vigor, integridade de membrana, potencial de atividade mitocondrial (DAB I, II, III e IV), integridade de acrossomo e TBARS de amostras seminais refrigeradas à 10°C, de carneiros SRD. Poços de Caldas, 2012.

Interação	Meio	Tempo	Tempo*Meio
Motilidade	0.7982	0.0001	0.8084
Vigor	0.0021	0.0001	0.5610
Membrana	0.8210	0.0001	0.7724
DAB I	0.3910	0.0001	0.6460
DAB II	0.0004	0.0209	0.7867
DAB III	0.4818	0.0001	0.8721
DAB IV	0.0002	0.0001	0.1816
Acrossomo	0.0405	0.0001	0.6421
TBARS	0.5754	0.0664	0.3788

Analisando as variáveis motilidade e vigor, foi visto que não houve efeito ( $P=0,8482$ ) dos diluentes sobre a motilidade ( $K=58,76 \pm 22,57$  e  $KG=59,35 \pm 25,11$ ) conforme mostra a tabela 2, mas que o tempo afetou significativamente a motilidade

que era de  $79,16 \pm 1,41$  no tempo 0hs, diminuindo para  $57,75 \pm 1,91$  no tempo 24hs, terminando com  $40,25 \pm 2,55$  no tempo 48hs como mostra a tabela 3.

Tabela 2 - Efeito dos meios Kenney (K) e Kenney com gema de ovo (KG) nas variáveis: motilidade e vigor de amostras seminais refrigeradas de carneiros SRD, mantidas por até 48hs à 10°C. Poços de Caldas, 2012.

Efeito MEIO	K	KG	P
Motilidade	$58,76 \pm 22,57$	$59,35 \pm 25,11$	0,8482
Vigor	$3,37 \pm 0,86$	$3,08 \pm 0,93$	0,0144

Na avaliação do vigor verificou-se que o meio Kenney apresentou maiores valores quando comparado ao meio Kenney acrescido de ovo ( $3,37 \pm 0,86$  e  $3,08 \pm 0,93$ , respectivamente;  $p=0,0144$ ) conforme mostra a tabela 2 e também foi observado que o tempo de armazenamento exerceu um efeito significativo e negativo no vigor (0hs= $3,92 \pm 0,06$ , 24hs= $3,18 \pm 0,06$  e 48hs= $2,57 \pm 0,10$ ) demonstrado na tabela 3.

Tabela 3 - Efeito do tempo de armazenamento (0, 24 e 48hs) nas variáveis: motilidade e vigor de amostras seminais de carneiros SRD, refrigeradas à 10°C em meios Kenney e Kenney com gema de ovo. Poços de Caldas, 2012.

Efeito TEMPO	0hs	24hs	48hs
Motilidade	$79,16 \pm 1,41^a$	$57,75 \pm 1,91^b$	$40,25 \pm 2,55^c$
Vigor	$3,92 \pm 0,06^a$	$3,18 \pm 0,06^b$	$2,57 \pm 0,10^c$

<sup>a,b,c</sup>: letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ; teste LSD)

A integridade da membrana plasmática (K= $90,71 \pm 8,40$  e KG= $90,99 \pm 11,34$ ) e da membrana acrossomal (K= $85,34 \pm 11,43$  e KG= $82,21 \pm 14,05$ ) foi mantida em ambos os meios conforme descrito na tabela 4. Havendo apenas uma tendência do meio K em preservar melhor a integridade da membrana acrossomal em relação ao meio KG (P=0.0640).

Tabela 4 - Efeito dos meios Kenney (K) e Kenney com gema de ovo (KG) nas variáveis: membrana plasmática e membrana acrossomal de amostras seminais refrigeradas de carneiros SRD, mantidas por até 48hs à 10°C. Poços de Caldas, 2012.

Efeito MEIO	K	KG	P
Membrana	90,71 ± 8,40	90,99 ± 11,34	0,8342
Acrossomo	85,34 ± 11,43	82,21 ± 14,05	0.0640

O tempo de armazenamento influenciou a integridade das membranas plasmática e acrossomal, fazendo com que houvesse uma queda gradativa na integridade da membrana plasmática (0hs=95,75±0,36, 24hs=90,69±0,99, 48hs=86,11±1,45) e uma queda um pouco mais acentuada na integridade da acrossomal (0hs=90,34 ± 0,80, 24hs=84,33 ± 1,30, 48hs=76.67 ± 1,69). Dados estes demonstrado na tabela 5.

Tabela 5 - Efeito do tempo de armazenamento (0, 24 e 48hs) nas variáveis: membrana plasmática e membrana acrossomal de amostras seminais de carneiros SRD, refrigeradas à 10°C em meios Kenney e Kenney com gema de ovo. Poços de Caldas, 2012.

Efeito TEMPO	0hs	24hs	48hs
Membrana	95,75 ± 0,36 <sup>a</sup>	90,69 ± 0,99 <sup>b</sup>	86,11 ± 1,45 <sup>c</sup>
Acrossomo	90,34 ± 0,80 <sup>a</sup>	84,33 ± 1,30 <sup>b</sup>	76.67 ± 1,69 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup>: letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05; teste LSD)

O potencial de atividade mitocondrial DABI e DABIII não sofreram nenhuma influencia dos meios K e KG (P=0,4722 e P=0,5407, respectivamente). A atividade mitocondrial avaliada pelo DABII sofreu influência dos meios K e KG. Sendo que o meio K preservou melhor a atividade mitocondrial DABIII (K=30,76±11,91) em relação ao meio KG (KG=24,80±13,76) com P=0,0005. O meio KG não foi capaz de preservar a atividade mitocondrial. Por isso a variável DABIV foi maior (14,24±20,47) do que a variável DABIV do meio K (6,94±8,02), com o P=0,0004 conforme mostra a tabela 6.

Tabela 6 - Efeito dos meios Kenney (K) e Kenney com gema de ovo (KG) nas variáveis de potencial de atividade mitocondrial: DABI, DABII, DABIII, DABIV de amostras seminais refrigeradas de carneiros SRD, mantidas por até 48hs à 10°C. Poços de Caldas, 2012.

Efeito MEIO	K	KG	P
DABI	46,16 ± 18,95	44,09 ± 24,61	0,4722
DABII	30,76 ± 11,91	24,80 ± 13,76	0,0005
DABIII	16,18 ± 10,39	15,28 ± 12,15	0,5407
DABIV	6,94 ± 8,02	14,24 ± 20,47	0,0004

A variável DABI sofreu efeito do tempo de armazenamento (0hs=60,98±2,01, 24hs=42,84±2,32 e 48hs=31,55±1,87) ocorrendo uma queda gradativa ao longo das quarenta e oito horas de experimento. Não houve efeito significativo no potencial de atividade mitocondrial (DABII) nos tempos 0 e 24 hs mas houve efeito do tempo de 24 para 48hs (26,25±1,30 e 31,08±1,66 respectivamente). Para DABIII é evidente que ocorre um decréscimo (7,92±0,62, 17,92±1,28 e 21,35±1,27) da atividade mitocondrial ao longo dos tempos 0, 24 e 48hs respectivamente. O mesmo ocorre com o DABIV do tempo 0hs (3,92±0,54) para o tempo 24hs (11,66±1,89). Havendo um aumento numérico do DAB, mas uma diminuição biológica da atividade mitocondrial. Com relação ao DAB IV de 24hs para 48hs não foi encontrada diferença estatística (24hs=11,66±1,89 e 48hs=16,20±2,23), dados estes mostrados na tabela 7.

Tabela 7 - Efeito do tempo de armazenamento (0, 24 e 48hs) nas variáveis de potencial de atividade mitocondrial: DABI, DABII, DABIII, DABIV de amostras seminais de carneiros SRD, refrigeradas à 10°C em meios Kenney e Kenney com gema de ovo. Poços de Caldas, 2012.

Efeito TEMPO	0hs	24hs	48hs
DAB I	60,98 ± 2,01 <sup>a</sup>	42,84 ± 2,32 <sup>b</sup>	31,55 ± 1,87 <sup>c</sup>
DAB II	26,01 ± 1,44 <sup>a</sup>	26,25 ± 1,30 <sup>a</sup>	31,08 ± 1,66 <sup>b</sup>
DAB III	7,92 ± 0,62 <sup>a</sup>	17,92 ± 1,28 <sup>b</sup>	21,35 ± 1,27 <sup>c</sup>
DAB IV	3,92 ± 0,54 <sup>a</sup>	11,66 ± 1,89 <sup>b</sup>	16,20 ± 2,23 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup>: letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05; teste LSD)

Os meios Kenney e Kenney acrescido de gema de ovo não diferiram estatisticamente na produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (K=844±339,0 e KG=871,3±372,5) como mostra a tabela 8.



Tabela 8 - Efeito dos meios Kenney (K) e Kenney com gema de ovo (KG) na variável: TBARS de amostras seminais refrigeradas de carneiros SRD, mantidas por até 48hs à 10°C. Poços de Caldas, 2012.

Efeito MEIO	K	KG	P
TBARS	844 ± 339,0	871,3 ± 372,5	0,5784

O tempo de armazenamento influenciou o aumento nas espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que diferiu do tempo 0hs para o tempo 48hs (807,42±39.22 e 937,76 ± 41,87) respectivamente. Não havendo diferença na produção de TBARS dos tempos 0hs para 24hs e não havendo diferença também da produção dos tempos 24hs para 48hs, conforme demonstrado abaixo na tabela 9.

Tabela 9 - Efeito do tempo de armazenamento (0, 24 e 48hs) na variável: TBARS de amostras seminais de carneiros SRD, refrigeradas à 10°C em meios Kenney e Kenney com gema de ovo. Poços de Caldas, 2012.

Efeito TEMPO	0hs	24hs	48hs
TBARS	807,42 ± 39.22 <sup>a</sup>	832,07 ± 43,71 <sup>ab</sup>	937,76 ± 41,87 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup>: letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05; teste LSD)

As correlações entre o meio K com as variáveis de motilidade, vigor, integridade de membrana plasmática, potencial de atividade mitocondrial (DABI, DABII, DABIII e DABIV), integridade de membrana acrossomal e TBARS estão apresentadas na tabelas 10. A correlação da motilidade com o DABI, também foi alta e positiva (r=0,67), conforme mostra a tabela 10. Uma correlação apesar de baixa e negativa (r= -0,26), mas interessante encontrada neste estudo foi entre motilidade e TBARS. As demais correlações são de média à baixa e estão demonstrada abaixo na tabela 10.

Tabela 10 – Coeficientes de correlação e respectivos níveis de significância das variáveis: motilidade, vigor, integridade de membrana, potencial de atividade mitocondrial (DAB I, II, III e IV), integridade de acrossomo e Tbars de amostras seminais refrigeradas, de carneiros SRD no meio de Kenney.

Meio K	Vigor	MI	DABI	DABII	DABIII	DABIV	Acro	TBARS
Mot	0,82 <0.0001	0,35 <0.001	0,67 <0.0001	-0,24 0.0070	-0,59 <0.0001	-0,57 <0.0001	0,32 <0.0003	-0,26 0.0053
Vigor	1	0,43 <0.0001	0,56 <0.0001	-0,16 0.0787	-0,52 <0.0001	-0,48 <0.0001	0,29 <0.001	-0,25 0.0084
MI		1	0,33 0.0002	-0,15 0.0966	-0,35 0.0001	-0,10 0.2743	0,36 <0.0001	-0,20 0.0332
DABI			1	-0,65 <0.0001	-0,72 <0.0001	-0,49 <0.0001	0,24 0.0071	-0,18 0.0514
DABII				1	0,19 0.0373	-0,08 0.3376	-0,12 0.1926	0,08 0.3837
DABIII					1	0,44 <0.0001	-0,20 0.0259	0,18 0.0521
DABIV						1	-0,19 0.0370	0,11 0.2468
Acro							1	-0,30 0.0014
TBARS								1

Mot: Motilidade; MI: Membrana íntegra; Acro: Acrossomo; TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

No que tange as correlações entre o meio KG com as variáveis de motilidade e vigor foi alta ( $r=0,81$ ) e muito significativa ( $P=0.0001$ ). Assim como a correlação da motilidade com o DABI também foi alta e positiva ( $r=0,68$ ), conforme mostra a tabela 11. Ainda na tabela 11 foi visto que a correlação entre o vigor e o DABI foi alta, positiva ( $r=0,65$ ) e bastante significativa ( $P=0.0001$ ). As demais correlações são de média à baixa e estão descritas na tabela 11.

Tabela 11 – Coeficientes de correlação e respectivos níveis de significância das variáveis: motilidade, vigor, integridade de membrana, potencial de atividade mitocondrial (DAB I, II, III e IV), integridade de acrossomo e Tbars de amostras seminais refrigeradas, de carneiros SRD no meio de Kenney acrescido de gema de ovo.

Meio KG	Vigor	MI	DABI	DABII	DABIII	DABIV	Acro	TBARS
Mot	0,81 <0.0001	0,31 0.0006	0,68 <0.0001	0,13 0.1439	-0,50 <0.0001	-0,53 <0.0001	0,23 0.0104	-0,01 0.8928
Vigor	1	0,28 0.0022	0,65 <0.0001	0,05 0.05908	-0,41 <0.0001	-0,50 <0.0001	0,14 0.1109	-0,01 0.8482
MI		1	0,38 <0.0001	-0,00 0.9326	-0,47 <0.0001	-0,33 0.0002	0,36 <0.0001	-0,11 0.2427
DABI			1	-0,06 0.4909	-0,61 <0.0001	-0,67 <0.0001	0,21 0.0192	-0,00 0.9616
DABII				1	0,12 0.1898	-0,20 0.0240	0,03 0.6874	0,01 0.8528
DABIII					1	0,56 <0.0001	-0,37 <0.0001	0,35 0.0001
DABIV						1	-0,26 0.0048	0,10 0.2998
Acro							1	-0,40 <0.0001
TBARS								1

Mot: Motilidade; MI: Membrana íntegra; Acro: Acrossomo; TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

# **DISCUSSÃO**

## 7 DISCUSSÃO

Os diluentes permitem o aumento do volume total do ejaculado, facilitando sua divisão em doses inseminantes e proporcionando um meio favorável para a sobrevivência dos espermatozóides *in vitro*. Alguns diluentes mantêm a viabilidade do sêmen à temperatura ambiente, enquanto que outros são apropriados para o resfriamento para ajudar a controlar o crescimento bacteriano e reduzir a taxa metabólica das células espermáticas.

Hafez e Hafez (2004) sugerem que um diluente deve proporcionar nutrientes como fontes de energia; proteger os espermatozóides do efeito deletério do frio; proporcionar um meio tampão; manter a pressão osmótica adequada; inibir o crescimento bacteriano; aumentar o volume do ejaculado e proteger as células espermáticas durante congelamento. A dose inseminante ótima para sêmen de ovinos por inseminação cervical é de 400 milhões espermatozóides, em um volume de 0,25 a 0.50 mL (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

### 7.1 TEMPO DE ARMAZENAMENTO

Segundo Salamon e Maxwell (2000), independente do diluente e temperatura de armazenamento, observa-se maior redução da qualidade espermática à medida que aumenta o tempo de armazenamento, sendo que as principais ocorrências observadas são a diminuição da motilidade e integridade morfológica, eventos provavelmente estimulados pelo acúmulo de produtos do metabolismo.

#### 7.1.1 Motilidade e vigor

No presente estudo foi encontrado um efeito deletério significativo do tempo de armazenamento à 10°C sobre a motilidade (0h=79,16±1,41<sup>a</sup>; 24hs=57,75±1.91<sup>b</sup>; 48hs=40,25±2,55<sup>c</sup>). Também foi observado que o tempo de armazenamento exerceu

um efeito significativo e negativo sobre o vigor (0hs=3,92±0,06<sup>a</sup>, 24hs=3,18±0,06<sup>b</sup> e 48hs=2,57±0,10<sup>c</sup>). Estes resultados estão de acordo com os estudos de O'Hara et al. (2010) que utilizaram os diluentes à base de leite-gema e os comerciais Andromed (à base de lecitina de soja) e INRA 96 (à base de leite) para conservação do sêmen à 15°C, por até 72 horas. No estudo de O'Hara et al. (2010) com sêmen ovino o armazenamento do sêmen à 15°C também resultou em um efeito negativo significativo na motilidade espermática, independente do diluente utilizado. O'Hara et al. (2010) observaram também um declínio linear de acordo com o tempo de armazenamento por até 74 horas após a colheita.

Nossos resultados contrariam o de Sousa et al. (2010) onde todavia, o meio de Kenney obteve o menor valor de motilidade avaliados nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48hs, com acentuada queda já nas 12 primeiras horas de refrigeração (P<0,001), sugerindo que o meio diluente composto apenas por leite não foi favorável à preservação das células espermáticas de ovinos à temperatura de 4°C por longo período.

Essa queda na motilidade observada por Sousa et al. (2010) provavelmente ocorreu por causa da temperatura de armazenamento que pode ter causado um choque frio na amostra. Esse tipo de mudança causada nas células espermáticas pelo frio são irreversíveis e ocorrem em temperaturas perto dos 0°C. Deve-se considerar também que pesquisadores como Chang e Walton, 1940, afirmaram que a temperatura de 10<sup>o</sup>-15<sup>o</sup>C é a ideal para armazenar o sêmen ovino resfriado (SALAMON; MAXWELL 2000).

A queda brusca da motilidade observada por esse autor pode ter ocorrido pelo excesso de manipulação também, pois segundo Salamon e Maxwell (1995) ocorre redução da motilidade com a diminuição e o posterior aumento da temperatura, por várias vezes, bem como com a própria manipulação do sêmen no transcorrer do processo de conservação.

Paulenz et al. (2002) também obtiveram redução nos parâmetros de motilidade e vigor avaliados ao longo do período de armazenamento (até 30hs), independente do diluente utilizado.

### 7.1.2 Integridade de membrana plasmática e acrossomal

O tempo de armazenamento influenciou a integridade das membranas plasmática e acrossomal, fazendo com que houvesse uma queda gradativa na integridade da membrana plasmática (0hs=95,75±0,36<sup>a</sup>, 24hs=90,69±0,99<sup>b</sup>, 48hs=86,11±1,45<sup>c</sup>) e uma queda um pouco mais acentuada na integridade da acrossomal (0hs=90,34±0,80<sup>a</sup> 24hs=84,33±1,30<sup>b</sup> 48hs=76,67±1,69<sup>c</sup>), dados estes apresentados na tabela 5.

Yániz et al. (2008) em seu estudo explorando os efeitos dos diluentes à base de leite, citrato e Tris-base no sêmen ovino armazenado à 15°C durante até 48h, também observou uma queda gradativa da integridade de membrana plasmática ao longo do tempo.

No estudo de O'Hara et al. (2010) com sêmen ovino o armazenamento do sêmen à 15°C também resultou em um efeito negativo significativo na integridade da membrana espermática, independente do diluente utilizado.

Por outro lado, Sousa et al. (2010) não observaram queda elevada na porcentagem de células espermáticas com acrossoma íntegro nos tempos por ele avaliado ( zero, 12, 24, 36 e 48h), variando de 96,3% à 97,7% de integridade no meio contendo gema de ovo e de 95,2% à 90,7% de integridade no meio à base de leite.

### 7.1.3 Potencial de atividade mitocondrial

A principal função da mitocôndria nas células vivas é realizar a fosforilação oxidativa e produzir adenosina trifosfato (ATP), fonte energética indispensável para a motilidade espermática (CELEGHINI et al., 2007).

Segundo Tsakmakidis (2010), a lesão mitocondrial pode ser causada pelo choque frio que se torna mais evidente quando o espermatozóide é rapidamente resfriado abaixo de 10°C (P<0,05).

A variável DABI sofreu efeito do tempo de armazenamento (0hs=60,98±2,01<sup>a</sup>, 24hs=42,84±2,32<sup>b</sup> e 48hs=31,55±1,87<sup>c</sup>) ocorrendo uma queda gradativa ao longo

das quarenta e oito horas de experimento. Essa queda gradativa de DABI e o aumento do DABIII ( $7,92\pm 0,62^a$ ,  $17,92\pm 1,28^b$  e  $21,35\pm 1,27^c$ ) e DABIV ( $3,92\pm 0,54^a$ ,  $11,66\pm 1,89^b$  e  $16,20\pm 2,23^b$ ) são evidentes, mostrando que a atividade mitocondrial ao longo dos tempos 0, 24 e 48hs sofreram uma diminuição biológica da atividade mitocondrial.

No estudo de Kasimanickam (2011) usando JC1 para avaliar o potencial de membrana mitocondrial foi encontrada diferença significativa ( $P<0,05$ ) entre os quatro dias de armazenamento do sêmen ovino. Havendo uma queda gradativa do potencial de atividade mitocondrial ao longo do tempo, estando de acordo com os resultados encontrados em nosso estudo.

#### **7.1.4 Tbars**

Para Salamon e Maxwell (2000) as principais alterações que ocorrem durante o armazenamento incluem redução na motilidade e integridade morfológica dos espermatozoides. Estas alterações podem contribuir para o acúmulo de produtos tóxicos do metabolismo, principalmente das espécies reativas de oxigênio (ROS). Formadas através da peroxidação lipídica das membranas dos espermatozoides.

O tempo de armazenamento influenciou o aumento nas espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que diferiu do tempo 0hs para o tempo 48hs ( $807,42\pm 39,22^a$  e  $937,76\pm 41,87^b$ ) respectivamente. Não havendo diferença na produção de TBARS dos tempos 0hs para 24hs e não havendo diferença também da produção dos tempos 24hs para 48hs, conforme demonstrado abaixo na tabela 9.

O resultado encontrado neste estudo está de acordo com os resultados encontrados por Gundogan, (2010) onde os parâmetros de estresse oxidativo foram influenciados pelo período de armazenamento ( $P<0,05$ ) de até cinco dias, aumentando ao longo do tempo.

Barros (2007) estudando o estresse oxidativo em sêmen resfriado de gato-do-mato-pequeno, observou diferença na resistência das células a peroxidação lipídica em função dos tempos 2, 12 e 24 horas ( $820,18\pm 174,47$ ,  $778,11\pm 214,89$  e  $1172,91\pm 308,67$ , respectivamente;  $p>0,05$ ).



Nair et al. (2006) mantiveram sêmen de bovinos e bubalinos sob refrigeração (4-8°C) e verificaram que, ao longo do tempo, estas espécies comportaram-se de maneira distinta. Enquanto que os bubalinos apresentaram um aumento significativo nos níveis de malondialdeído (MDA), entre os tempos 0, 12 e 24 horas ( $1,99 \pm 0,26$ ;  $4,62 \pm 0,07$  e  $7,12 \pm 0,12$ , respectivamente;  $p < 0,05$ ), para os bovinos não foi possível verificar diferenças nos mesmo tempos ( $1,17 \pm 0,29$ ;  $2,50 \pm 0,28$  e  $4,33 \pm 0,56$ , respectivamente;  $p > 0,05$ ). Para estes autores, essas diferenças podem ter ocorrido por variações interespecíficas no perfil lipídico da membrana espermática dos bubalinos possivelmente apresentando uma maior quantidade de PUFA, sendo, conseqüentemente, mais susceptíveis aos ataques das ROS.

## 7.2 EFEITO DO DILUENTE

A maioria dos extensores seminais é a base de leite ou gema de ovo. O maior problema dos extensores contendo essas bases é que, por suas substâncias biológicas, podem diferir entre lotes/partidas.

Segundo Pugliesi (2009) os diluidores à base de leite desnatado já são usados rotineiramente na diluição, centrifugação e no resfriamento do sêmen eqüino. Podendo também ser utilizado para outras espécies. Vários estudos indicam que os componentes ativos envolvidos na proteção do espermatozóide pelo leite são as micelas de caseína, que interagem com as proteínas de membrana, que, por sua vez, podem promover a retirada de fosfolípidios e colesterol da membrana plasmática (BERGERON; MANJUNATH, 2006).

A gema de ovo em associação a outros componentes do diluidor pode ajudar os espermatozoides a resistir ao choque térmico (BOGART; MAYER, 1950; AMIRAT et al., 2004). Esse efeito pode ser atribuído principalmente à lipoproteína de baixa densidade, LDL – (BERGERON; MANJUNATH, 2006), que interage principalmente com as proteínas de membrana, constituindo o principal mecanismo de proteção no sêmen bovino (BERGERON et al., 2004). Entretanto, na sua composição, a gema de ovo possui substâncias indesejáveis e tem algumas desvantagens quando utilizada na forma integral nos diluidores – opacidade óptica, causada pelos grânulos formados, que dificultam o exame imediato à avaliação microscópica; prejuízo

causado à respiração do espermatozóide (TOSIC; WALTON, 1946); diminuição da motilidade espermática (PACE; GRAHAM, 1974) –, pois pode transportar microrganismos patogênicos (BOSSEAU et al., 1998).

### 7.2.1 Motilidade e vigor

No presente estudo, não foi observado efeito dos diluentes sobre a motilidade ( $P=0,8482$ ), mas foi encontrada uma diferença significativa ( $P= 0,0144$ ) entre os meios testados ( $K=3,37\pm0,86$  e  $KG=3,08\pm0,93$ ) com relação ao vigor espermático, sendo que o meio contendo gema obteve valores inferiores ao meio sem a adição de gema de ovo.

Estes resultados estão de acordo com os achados de Pugliesi (2009) onde avaliando o sêmen eqüino resfriado com diluente de Kenney (à base de leite) e diluente de Foote (à base de ovo) também não encontrou diferença estatística na avaliação de motilidade, encontrando diferença significativa quanto ao vigor espermático. Sendo que o vigor foi de  $3,4\pm0,4$  com o diluente de Kenney e  $3,1\pm0,3$  para o diluente de Foote ( $P<0,05$ ).

Milczewski et al. (2000) ao avaliarem sêmen ovino diluído no Tris-gema e refrigerado a  $5^{\circ}\text{C}$  por 8h, observaram valores de 42,2% para motilidade e 2,46 para o vigor, sendo estes valores muito aquém do encontrado no intervalo de 24h em nosso estudo. Também obtiveram para o meio constituído de leite desnatado UHT-gema 67,8% de motilidade e 2,8 de vigor, valores estes maiores que os verificados em nosso estudo no momento de 24h.

Jiménez et al. (2004) observaram uma maior porcentagem de espermatozoides móveis (9%) quando o sêmen foi congelado no diluente contendo gema de ovo em pó em comparação com a gema de ovo total. Várias substâncias da gema de ovo podem inibir a respiração celular e, por conseguinte, levar a uma diminuição no número de células móveis (PACE; GRAHAM, 1974).

A diminuição nos parâmetros de motilidade do ejaculado no estudo de Jiménez et al. (2004) pode ser também devido ao aumento na viscosidade do meio. Pois Payawal et al. (1946) relataram que as altas temperaturas atingidas durante o

processo de pasteurização da gema de ovo pode levar a desnaturação das proteínas levando o meio a ter uma maior consistência após reconstituição.

Sousa et al. (2010), comparando diferentes diluentes, observaram que os meios contendo gema de ovo apresentaram uma superfície oleosa com alta viscosidade do meio, podendo este fato ter implicado na menor mobilidade dos espermatozoides e inclusive dificultado a visualização dos espermatozoides no momento das avaliações, quando comparado ao diluente contendo leite em pó.

O maior vigor espermático obtido ( $P < 0,05$ ) no sêmen com o diluidor Kenney por Pugliesi (2009) pode ser em decorrência da melhor disponibilidade de substrato (ATP) desse diluidor (à base de leite desnatado) em comparação ao diluidor com gema de ovo, uma característica que lhe confere maior suporte energético para sobrevivência e movimentação da célula espermática.

Essa energia extra pode ser utilizada pelas estruturas locomotoras do espermatozoide, promovendo maior frequência e batimento do flagelo desencadeando maior velocidade (CELEGHINI, 2005).

Além disso, os diluidores à base de gema de ovo podem dificultar a movimentação espermática, uma vez que seus constituintes promovem uma barreira física à célula espermática e dificultam a respiração do espermatozoide (TOSIC e WALTON, 1946), diminuindo a motilidade, promovendo assim redução do vigor espermático (PACE; GRAHAM, 1974).

### **7.2.2 Integridade de membrana plasmática e acrossomal**

Em nosso estudo a integridade da membrana acrossomal ( $K=85,34 \pm 11,43$  e  $KG=82,21 \pm 14,05$ ) e da membrana plasmática ( $K=90,71 \pm 8,40$  e  $KG=90,99 \pm 11,34$ ) foi mantida em ambos os meios, havendo, no entanto, uma tendência do meio K em preservar melhor a integridade da membrana acrossomal em relação ao meio KG ( $P=0.0640$ ).

Estes resultados estão de acordo com os Sousa et al. (2010) que não verificou diferença significativa entre os diluente à base de leite e à base de gema de ovo, para integridade de membrana plasmática e membrana acrossomal ( $P > 0,05$ ), nos tempos por ele avaliado ( zero, 12, 24, 36 e 48h), variando de 96,3% à 97,7% de

integridade no meio contendo gema de ovo e de 95,2% à 90,7% de integridade no meio à base de leite.

Pugliesi (2009) na avaliação do efeito de ambos diluidores (à base de leite e à base de gema) sobre a integridade e funcionalidade da membrana plasmática de espermatozoides eqüinos resfriados, também não verificou diferença ( $P>0,05$ ) entre os diluidores pelo teste da eosina nigrosina.

Por outro lado Yániz et al. (2008) em seu estudo explorando os efeitos dos diluentes à base de leite e gema no sêmen ovino armazenado por até 48h à 15°C, observou que o diluente á base de leite preservou melhor a integridade da membrana plasmática do espermatozóide ovino.

### **7.2.3 Potencial de atividade mitocondrial**

O potencial da atividade mitocondrial avaliada pelo DABII sofreu influência dos meios K e KG. Sendo que o meio K preservou melhor a atividade mitocondrial ( $K=30,76\pm 11,91$ ) em relação ao meio KG ( $KG=24,80\pm 13,76$ ) com  $P=0,0005$ . O meio K foi mais eficiente que o meio KG em preservar a atividade mitocondrial, sendo observado que o DABIV foi maior ( $14,24\pm 20,47$ ) do que a variável DABIV do meio K ( $6,94\pm 8,02$ ), com o  $P=0,0004$ .

Semelhante aos dados de Celeghini et al. (2007), foi observado que o potencial de mitocôndria se comportou de forma semelhante ao vigor. Sendo a atividade mitocondrial também melhor preservada no diluente de Kenney.

Karabinus et al. (1991) obtiveram resultados semelhante utilizando a citometria de fluxo para avaliar o potencial de membrana mitocondrial em semen bovino, incubado por até 180 minutos, encontrando uma atividade mitocondrial no semen bovino diluído em diluente à base de leite maior quando comparado com diluente à base de gema de ovo.

Nossos resultados contrariam os de Kasimanickam et al. (2011), onde o potencial de membrana mitocondrial avaliado por sonda fluorescente (JC-1) foi significativamente ( $P<0,05$ ) diferente entre os diluentes. Sendo os valores do potencial da membrana mitocondrial para o meio à base de leite (+/-45%) menor do que a base de gema de ovo (+/-72%) para dois dias de armazenamento ( $P<0,05$ ).

#### 7.2.4 TBARS

Os meios Kenney e Kenney acrescido de gema de ovo não diferiram estatisticamente na produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico ( $K=844\pm339,0$  e  $KG=871,3\pm372,5$ ).

Barros (2007) estudando o estresse oxidativo em sêmen resfriado de gato-do-mato-pequeno observou uma maior produção de TBARS pelos espermatozóides mantidos no meio contendo gema de ovo (TGC), mas segundo o autor isto provavelmente ocorreu devido a incorporação de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) provenientes da gema de ovo na membrana espermática. Sendo assim, os valores elevados de TBARS não indicam necessariamente uma menor resistência dos espermatozóides a este estresse, com o emprego deste diluidor.

Podendo então se inferir que esta incorporação não ocorreu com o espermatozóide de ovino, por isso não foi encontrada diferença estatística no presente estudo.

A comparação entre os resultados obtidos no presente experimento e os resultados obtidos por outros pesquisadores torna-se complicada visto que poucos são os estudos sobre o nível de TBARS (induzido) no sêmen de ovinos, estudando os referidos diluentes.

#### 7.2.5 Correlações

As correlações entre o meio K com as variáveis de motilidade, vigor, integridade de membrana plasmática, potencial de atividade mitocondrial (DABI, DABII, DABIII e DABIV), integridade de membrana acrossomal e TBARS estão apresentadas na tabela 10. Algumas correlações existentes neste meio foram entre TBARS e motilidade, TBARS e vigor, TBARS e integridade de membrana tanto plasmática como acrossomal.

As correlações encontradas indicam uma relação entre a integridade de membrana, a integridade acrossomal e as variáveis relacionadas a mobilidade do espermatozóide. Isto não indica que estas variáveis sejam necessariamente

dependentes uma da outra. Estas correlações matemáticas podem ter sido por causa do próprio diluidor. Segundo estudo de Baumber et al. (2000) em sêmen de eqüinos, uma diminuição na motilidade pós descongelamento pode ocorrer sem alterações detectáveis na viabilidade e integridade acrossomal.

A concentração de TBARS correlacionou-se negativamente com as variáveis motilidade, vigor, integridade de membrana plasmática e acrossomal, mostrando que quanto mais TBARS, menor a porcentagem de células com membranas integras. Com o passar do tempo de armazenamento agentes pro-oxidantes são liberados promovendo uma serie de eventos que, em cadeia, vão atacar as membranas celulares, acrossomal e plasmática. Conseqüentemente, estes eventos seriam responsáveis pela queda da motilidade e vigor (A).

No que tange as correlações entre o diluente KG com as variáveis avaliadas, diferentemente das correlações encontradas no diluente K, foi visto que o TBARS se correlacionou com o DABIII, que apesar de ser uma correlação baixa, foi muito significativa ( $P=0.0001$ ).

A correlação do TBARS com o DAB III foi positiva ( $r=0,35$ ), demonstrando que quanto maior a quantidade de células com baixa atividade mitocondrial, maior a concentração de TBARS. Foi também encontrada uma correlação negativa entre a variável integridade de acrossomo (ACRO) e TBARS ( $r=-0,40$ ;  $P=0,0001$ ), mostrando que quanto menor a porcentagem de células com acrossomo integro, maior a concentração de substancias reativas ao acido tiobarbitúrico. As correlações encontradas entre TBARS e as variáveis DABIII e ACRO, podem ser resultado de um efeito causado pela presença da gema de ovo no diluidor. Provavelmente, com a incorporação de PUFA pela membrana espermática, esta passou a ser mais susceptível ao ataque das ROS. Como resultado da peroxidação de lipídeos (PUFAS) formam-se os aldeídos, como o MDA, por exemplo, conhecidamente citotóxicos (BARROS, 2007). Assim, os efeitos prejudiciais do estresse oxidativo são potencializados, refletindo-se na integridade da membrana acrossomal.

Corroborando com estes resultados, Wang et al. (2003) demonstraram, em seus experimentos com sêmen humano, uma correlação negativa entre o potencial da membrana mitocondrial e a produção espermática de ROS ( $r=0.45$ ,  $p<0,05$ ). A presença de pequenas quantidades de ROS no plasma seminal sugere que a mitocôndria é a maior fonte de ROS no espermatozóide de homens inférteis (SHARMA; AGARWAL, 1996). Com a perda da integridade mitocondrial, agentes

pro-oxidantes são liberados promovendo uma serie de eventos que, em cadeia, atacam outras membranas celulares, dentre elas, as membranas acrossomal e plasmática.

# CONCLUSÕES



## 8 CONCLUSÕES

O diluidor seminal à base de leite em pó proposto por Kenney é eficaz em preservar as características seminais (motilidade, vigor espermático, integridade de membrana plasmática e acrossomal e a atividade mitocondrial) utilizando-se sêmen ovino resfriado à 10°C por até 48 horas. O diluidor Kenney se constitui uma ótima opção para ser utilizado em programas de inseminação artificial com sêmen resfriado de carneiros.

A adição da gema de ovo ao diluente de Kenney não foi capaz de melhorar as características seminais avaliadas neste estudo.

## **REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS

- AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. W. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 35, p. 302-315, 1993.
- AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GERARD, O.; COURTENS, J.L.; ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with optidyl, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, v. 61, p. 895-907, 2004.
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, anais... 2004 Londrina, PR. 2004. p. 166-179.
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; SOUZA, L. W. O.; NASCIMENTO, J.; ANDRADE, A. F.C.; RAPHAEL, C. F.; GARCIA, A. R. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 1, p. 145-150, 2005.
- BARROS, P. M. H. **Estresse oxidativo e integridade do DNA em sêmen resfriado de gato-do-mato-pequeno (Leopardus tigrinus, SCHREBER, 1775)**. 2007. 120f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária e Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2007.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: University Press, 1989, p. 285.
- BAUMBER, J.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M. C. G. The Effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 6, p. 895-902, 2000.

BERGERON, A.; CRETE, M. H.; BRINDLE, Y.; MANJUNATH, P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins from bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 708-717, 2004.

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

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

BICUDO, S. D.; SOUSA, D. B.; TAKADA, L. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, p.120-127, 2003.

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

BOSSEAU, S.; BRILLARD, J. P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GUÉRIN, B.;

CARDOSO, E.; CRUZ, J. F.; FERRAZ, R. C. N.; TEIXEIRA NETO, M. R.; SANTOS, R. S. Avaliação econômica de diferentes técnicas de inseminação artificial em ovinos da raça Santa Inês. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 4, n. 2, p. 217-222, 2009.

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária e Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005.

CELEGHINI, E. C.; ARRUDA, R. P.; DE ANDRADE, A. F.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 5, p. 479-488, 2007.

CHANG, M. C.; WALTON, A. The effects of low temperature and acclimatization on the respiratory activity and survival of ram spermatozoa. **Proceedings Royal Society**, v. 129, p. 517–527, 1940.

CSEH, S.; FAIGL, V.; AMIRIDIS, G. S. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v. 130, p. 187-92, 2012.

FONSECA, C. O.; FILHO, V. R. V.; FILHO, A. M.; ABREU, J. J. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. Belo horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal; Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. CBRA N° 021/1997.

FOOTE, R. H.; BROCKETT, C. C.; KAPROTH, M. T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v. 71, p. 13–23, 2002.

FOULKES, J. A.; SWEASEY, D.; GOODEY, R. G. Fertility of bull spermatozoa in egg-yolk diluents of varied lipid fatty acid composition. **Journal Reproduction Fertility**, v. 60, p. 165–169, 1980.

GRAHAM, J. K.; FOOTE, R. H. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. **Cryobiology**, v. 24, p. 42–52, 1987.

GUNDOGAN, M.; YENI, D.; AVDATEK, F.; FIDAN, A. F. Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, v. 122, p. 200-207, 2010.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Anatomia da reprodução masculina. **Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. p. 03-12.

HANCOCK, J. L. A staining technique for the study of temperature shock in semen. **Nature**, v. 167, p. 323-324, 1951.

HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome-c oxidase in spermatozoa and dynamics of changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v. 10, n. 6, p. 809-828, 1987.

JANERO, D. J. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity indices of lipid peroxidation and peroxidative injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 9, p. 515-540, 1990.

JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEM, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M.; GRAVO, B. G.; ZANEVELD, L. J. D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, n. 1, p. 219-228, 1984.

JIMÉNEZ, F. M.; PUCHADES, S.; MOCÉ, E.; VINDES-DE-CARTRO, M. P.; VICENTE J. S.; RODRIGUEZ, M. Use of powdered egg yolk vs fresh egg yolk for the cryopreservation of ovine semen. **Reproduction Domestic Animals**, v. 39, n. 6, p. 438-441, 2004.

KARABINUS, D. S.; EVENSON, D. P.; KAPROTH, M. T. Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull sperm. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 11, p. 3836-3848, 1991.

KASIMANICKAM, R.; KASIMANICKAM, V.; TIBARY, A.; PELZER, K. Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4 °C. **Small Ruminant Research**, v. 99, p. 208– 213, 2011.

KENNEY, R. M. et al. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. **In: ANNUAL CONVENTION, AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS**, 1975. v. 21, p. 327-335.

KOVÁS, A.; FOOTE, R. H. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 67, p. 119- 124, 1992.

KUMI-DIAKA, J.; BADTRAM, G. Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay for canine semen. **Theriogenology**, v. 41, p. 1355-366, 1994.

LANDFELD, A.; ZITNY, R.; HOUSKA, M.; KYHOS, K.; NOVOTNA, P. Residence time distribution during egg yolk pasteurization. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 20, p. 193–201, 2002.

LÓPEZ-PÉREZ, A.; PÉREZ-CLARIGET, R. Ram seminal plasma improves pregnancy rates in ewes cervically inseminated with ram semen stored at 5 °C for 24 hours. **Theriogenology**, v. 77, n. 2, p. 395-399, 2012.

LOPEZ-SAEZ, A.; ORTIZ, N.; GALLEGU, L.; GARDE, J. J. Liquids storage (5 °C) of ram semen in different diluents. **Archives of Andrology**, v. 44, p. 155–164, 2000.

MAIA, M.S.; AZEVEDO H.C.; BICUDO S.D.; SOUSA D.B.; RODELLO L. Efeito da adição de Equex - STM ao diluente Tris-gema na motilidade do espermatozóide criopreservado de carneiro. **Anais SBTE**, v. 33, p. 311, 2005.

MAXWELL, W. M. C.; SALAMON, S. Liquid Storage of Ram Semen: a Review *Reproduction Fertility Dev*, v.5, p. 613-38, 1993.

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**, v. 2, n. 3, p.195-198, 2005.

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

MOUSTACAS, V. S.; ZAFFALON, F.G.; LAGARES, M. A.; LOAIZA-ECHEVERRI, A. M.; VARAGO, F. C.; NEVES, M. M.; HENEINE, L. G. D.; ARRUDA, R. P.; HENRY, M. Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. **Theriogenology**, v. 75, p. 300–307, 2011.

NAIR, S. J.; BRAR, A. S.; AHUJA, C. S.; SANGHA, S. P. S.; CHAUDHARY, K. C. A. Comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. **Animal Reproduction Science**, v. 96, n. 1 , p. 21–29, 2006.

NICHI, M. **Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas epididimárias de touros.** 2009. 122 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.

NICHI, M. **Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídeos seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS.** 2003, 101 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

NICHI, M.; BOLS, P. E. J.; ZÜGE, R. M.; BARNABE, V. H.; GOOVAERTS, I. G. F.; BARNABE, R. C.; CORTADA, C. N. M. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, v. 66, p. 822-828, 2006.

O'HARA, L.; HANRAHAN, J.P.; RICHARDSON L.; DONOVAN A.; FAIR S.; EVANS, A.C.O.; LONERGAN, P. Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. **Theriogenology**, v. 73, n. 4, p. 541-549, 2010.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OLIVERA-MUZANTE, J; FIERRO, S.; GIL, J. Conception rates in ewes after AI with ram semen preserved in milk – egg yolk extenders supplemented with glycerol. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 508–512, 2011.

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

PAULENZ, H.; ADNØY, T.; FOSSEN, O.; SODERQUIST, L. Effect on field fertility of addition of gelatine, different dilution rates and storage times of cooled ram semen after vaginal insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 10, p.1439-1531, 2009.

PAULENZ, H.; SODERQUIST, L.; ADNØY, T.; FOSSEN, O. H.; BERG, K. A. Effect of milk- and TRIS-based extenders on the fertility of sheep inseminated vaginally once or twice with liquid semen. **Theriogenology**, v. 60, p. 759–766, 2003.



PAULENZ, H.; SÖDERQUIST, L.; PÉREZ-PÉ, R.; BERG, K. A. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. **Theriogenology**, v. 57, n. 2, p. 823-836, 2002.

PAULENZ, H.; SOLTUN, K.; ÅDNØY, T.; ANDERSEN BERG, K.; SÖDERQUIST, L. Effect of different extenders on sperm viability of buck semen stored at room temperature. **Small Ruminant**, v. 59, n.1, p. 89-94, 2005.

POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, p. 87-95, 1991.

PUGLIESI, G. **Viabilidade e fertilidade do sêmen equino resfriado a 5 °c por 24 horas com dois diluidores**. 2009. 123f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de Viçosa, Minas Gerais, 2009.

RODRIGUES, M. P. **Perfil oxidativo e avaliação funcional de sêmen criopreservado de touros (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*) criados em clima tropical**. 2009. 145 f. Dissertação (Mestrado Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

RODRIGUES, R. M. C. Ovinocultura brasileira dando seus primeiros passos. **Farmpoint**, 2012. Disponível em: <<http://www.farmpoint.com.br/cadeia-produtiva/editorial/ovino-cultura-brasileira-dando-seus-primeiros-passos> - 77194.aspx>. Acesso em: 20 de junho 2012.

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

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

SHARMA, P. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 48, p. 835-850, 1996.

SIDHU, R. S.; SHARMA, R. K.; THOMAS JR., A. J.; AGARWAL, A. Relationship between creatinine kinase activity and semen characteristics in sub-fertile men. **International Journal of Fertility and Women's Medicine**, v. 43, p. 192-197, 1998.

SLATER, T. F. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 283-293, 1984.

SOUSA, B. P. A.; ANDRADE, J. C. O.; WISCHRAL, A.; GUERRA, M. M. P. Viabilidade in vitro de células espermáticas ovinas submetidas a diferentes diluentes e a refrigeração. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 528-535, 2010.

TOSIC, J. A.; WALTON. Formation of hydrogen peroxide by spermatozoa and its inhibitory effect on respiration. **Nature**, v. 158, p. 485-485, 1946.

TSAKMAKIDIS, I.A. Ram semen evaluation: Development and efficiency of modern Techniques. **Small Ruminant Research**, v. 92, p. 126- 130, 2010.

VIANA, J. G. A. Panorama geral da ovinocultura no mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, v. 4, n. 12, p. 1-9, 2008.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P.; CURSON, B. Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilizing ability of bull sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 29, p. 185-194, 1992.

WANG, X.; SHARMA, R. K.; GUPTA, A.; GEORGE, V.; THOMAS, A. J.; FALCONE, T.; AGARWAL, A. Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. **Fertility and Sterility**, v. 80, n. 2, p. 844-850, 2003.

YÁNIZ, J. L.; MARCO-AGUADO, M. A.; MATEOS, J. A.; SANTOLARIA, P. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15 °C. **Animal Reproduction Science**, v. 122, p. 142-149, 2010.

YÁNIZ, J. L.; SANTOLARIA, P.; MARCO-AGUADO, M. A.; LOPEZ-GATIUS, F. Use of image analysis to assess the plasma membrane integrity of ram spermatozoa in different diluents. **Theriogenology**, v. 70, p. 192–198, 2008.