



**Criopreservação de sêmen de carneiros nativos em Mato Grosso do Sul**

*Cryopreservation of native Ram semen in Mato Grosso do Sul, Brazil*

**Antonio Carlos Duenhas Monreal<sup>1</sup>, José Geraldo Souza de Paula<sup>1</sup>, Ricardo Freitas Schmid<sup>1</sup>, Mariana Adalgiza Gilberti Urt<sup>1</sup>, Albert Schiaveto de Souza<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Cidade Universitária, Laboratório BIOCAPRI, Avenida Senador Filinto Muller, 2430A, Campo Grande/MS, CEP: 79.070-900, E-mail: antonio.monreal@ufms.br

Recebido em: 13/02/2012

Aceito em: 05/10/2012

**Resumo.** A preservação do sêmen é uma importante ferramenta para o melhoramento genético animal. O presente trabalho teve como objetivo comparar os fatores motilidade e vigor na criopreservação manual de sêmen de carneiros nativos em MS, fazendo uso de dois diluidores: TRIS e Bovimix<sup>®</sup>. Para o estudo foram utilizados seis carneiros nativos, obtendo-se dois ejaculados por semana de cada animal até atingir um total de 30 doses de sêmen por diluidor por carneiro. O sêmen foi analisado em microscopia de campo claro. Comparando-se as médias obtidas, estatisticamente, foram observadas diferenças significativas entre os resultados dos dois diluidores quanto aos fatores analisados (motilidade e vigor) pós-descongelamento. Os resultados permitiram inferir que o meio diluidor Bovimix<sup>®</sup> apresentou eficiência superior em criopreservar o sêmen ovino pós-descongelamento em comparação ao diluidor Tris, quando somente os fatores motilidade e vigor foram analisados. Mais estudos serão necessários para avaliar a integridade de membrana dos espermatozoides.

**Palavras-chave.** Criopreservação, sêmen, ovino.

**Abstract.** The preservation of semen is important way for a breeding animal. This study aimed to compare the effect of factors and motility of sperm cryopreservation manual native sheep in two extenders: TRIS and Bovimix<sup>®</sup>. For the study were used six rams natives, obtaining two ejaculates per week of each animal until reach a total of 30 doses of semen per dilutive by ram. Semen was analyzed in bright field microscopy. Comparing the average values were statistically significant differences were observed between the results of two extenders as to the factors analyzed (motility and vigor) after thawing. Results showed that using thinner Bovimix<sup>®</sup> showed superior efficiency in the cryopreserved ram semen post-thaw compared to TRIS, when only the factors sperm motility was analyzed. More studies are needed to evaluated the membrane integrity o spermatozoa.

**Keywords.** Cryopreservation, semen, sheep.

### **Introdução**

Há várias biotecnologias sendo aplicadas nos dias de hoje em reprodução animal, dentre elas, a inseminação artificial se destaca principalmente por proporcionar aumento no mérito genético. O uso dessa biotecnologia também apresenta benefícios como melhor aproveitamento dos reprodutores, facilidade no comércio e no transporte do material genético, permitindo assim a introdução de novas linhagens nos rebanhos, com maior segurança sanitária. O congelamento de sêmen se torna indispensável para melhorar o rebanho geneticamente, otimizando a reprodução e

preservando por tempo indeterminado o genoma do reprodutor (Lima, 2008).

A criopreservação do sêmen, além de tudo, é uma maneira de beneficiar a reprodução dos animais de importância agropecuária. É uma forma de maximização do desempenho dos machos, proporcionando banco genético de fácil acesso, permitindo a melhor utilização dos animais com as melhores características de produção (Moura, 2009).

A espécie ovina possui particularidades, como a sazonalidade reprodutiva determinada pelo fotoperíodo. As fêmeas apresentam cérvix caracterizada por uma anatomia complexa com



pregas rígidas dispostas em diferentes planos e direções que dificultam sua transposição, aos machos a criopreservação causa sérios prejuízos ao sêmen, principalmente danos à membrana, reduzindo a viabilidade dos gametas masculinos no trato genital feminino (Barbas et al., 2005). Isso tudo impõe limitações para sua utilização quando inseminado por via vaginal, além disso, observa-se maturação excessiva das membranas espermáticas, que promove aumento na população de espermatozoides capacitados e acrossomos reagidos (Moura, 2009).

Em ovinos, a taxa de fertilidade após inseminação transvaginal com sêmen congelado é geralmente baixa (8 a 30 %) (Aisen et al., 2001). Dentro da problemática da IA ovina com sêmen congelado encontra-se o fato do sêmen de carneiro não possuir capacidade antioxidante adequada (diferença em relação a outras espécies), e também diferenças na composição da membrana do espermatozoide, nomeadamente nos lipídeos (Bucak et al., 2007), dificultando o sucesso da sua criopreservação (Valente, 2007). Por isso, o processo de criopreservação do sêmen ovino não apresenta resultados satisfatórios, considerando que 40 a 50 % da população espermática não sobrevive ao congelamento (Watson, 2000), levando à redução na motilidade, transporte prejudicado, diminuição da viabilidade dos espermatozoides no trato genital da fêmea e baixas taxas de fertilidade após a inseminação vaginal (Salamon & Maxwell, 1995).

Diferentemente do sêmen fresco que produz taxa de concepção melhor na inseminação transvaginal, o sêmen congelado, para alcançar uma fertilidade satisfatória, precisa ser depositado no interior do útero (Azevedo, 2002).

Como o sêmen ovino pós-descongelado, geralmente não vem se mostrando satisfatório, tenta-se a utilização de novos meios, com o propósito de melhorar as características de motilidade, vigor e viabilidade do sêmen pós-descongelamento.

Diante do exposto, evidencia-se a necessidade de realização de estudos para identificação de substâncias crioprotetoras e antioxidantes capazes de determinar menor estresse oxidativo e danos espermáticos, com conseqüente aumento na capacidade fecundante dos espermatozoides ovinos, possibilitando a elaboração de um diluente mais eficaz para esta espécie. Esse trabalho foi conduzido com o objetivo de verificar a eficiência dos diluidores TRIS e BOVIMIX<sup>®</sup>, por avaliação da motilidade e do vigor espermático pós-

descongelamento do sêmen de carneiros nativos de Mato Grosso do Sul.

### **Material e Métodos**

O experimento foi realizado no período de abril a junho de 2011 no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Pequenos Ruminantes (BIOCAPRI) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS na cidade de Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil (latitude 20° 30' 38,59" S, longitude 54° 37' 18,04" W).

Foram utilizados e condicionados à vagina artificial seis carneiros nativos de Mato Grosso do Sul com idade de 12 meses. Esses carneiros foram previamente submetidos a exame clínico geral e específico para comprovação de higidez, sob o ponto de vista sanitário e reprodutivo. Os animais foram mantidos em regime de confinamento, sob luminosidade natural, com manejo alimentar em silagem de milho fornecida duas vezes ao dia (início da manhã e final da tarde), suplementação protéica (18 % PB), na quantidade de 400g dia<sup>-1</sup> animal<sup>-1</sup> e sal mineral e água *ad libitum*. O experimento foi conduzido em condições naturais de temperatura, precipitação pluviométrica, umidade relativa e radiação solar.

As colheitas de sêmen foram realizadas com vagina artificial de modelo curto (Mies Filho, 1987), usando uma fêmea como manequim. A vagina artificial revestida com uma mucosa de borracha foi aquecida a 40 °C. Na sua extremidade foi acoplado um funil de silicone acoplado a um tubo de *falcon* de plástico graduado (15 mL). Esse mesmo tubo foi revestido externamente com material isotérmico, a fim de evitar mudanças bruscas de temperatura do sêmen com o meio ambiente. Em seguida, o tubo, com o sêmen, foi encaminhado ao laboratório, para análise e processamento das amostras.

Após as colheitas, cada ejaculado foi mantido em banho-maria a 37°C e submetido às avaliações macroscópicas: volume (mL), aspecto (aquoso, leitoso e cremoso), cor e microscópicas: motilidade (0-100%), vigor (0-5) e concentração (x 10<sup>6</sup>), de acordo com a metodologia empregada por Chemineau et al. (1991), sempre pelo mesmo técnico. Para o experimento em questão considerou-se apenas a motilidade, o vigor dos espermatozoides, e a concentração do ejaculado.

Depois de feito a leitura da concentração, realizado em câmara de Neubauer, procedeu-se os cálculos para diluição, sendo que a dose inseminante



utilizada foi de cem milhões de espermatozoides por palheta de 0,25 mL. Em seguida os diluidores, Tris ou Bovimix, foram adicionados ao sêmen. A solução composta por sêmen mais diluidor permaneceu por quatro horas em câmara de refrigeração sob 4°C para passar pelo processo de refrigeração. Após o período de refrigeração o meio foi envasado em palhetas de 0,25 mL e em seguida submetido ao vapor de nitrogênio por 15 minutos. Logo após as palhetas foram mergulhadas no nitrogênio líquido, raqueadas e armazenadas em botijão criogênico. Para a atendimento da análise estatística, foram congeladas trinta palhetas de 0,25 mL contendo o sêmen de cada carneiro, em cada meio diluidor, totalizando 360 palhetas congeladas.

O sêmen foi descongelado em banho-maria à 36 °C por 60 segundos, e em seguida foi submetido à avaliação de motilidade (0-100%) e vigor (0-5) em microscópio.

Nesse estudo, a comparação entre os momentos de análise, em relação à variável motilidade dos espermatozoides, foi realizada por meio do teste t-Student pareado. E a comparação entre os diferentes meios utilizados para a crioproteção, em relação às variáveis motilidade e

perda da motilidade, também foi realizada por meio do teste t-Student. A comparação entre os momentos de análise, em relação à variável vigor dos espermatozoides, foi realizada por meio do teste de Wilcoxon, enquanto que a comparação entre os diferentes meios utilizados para a crioproteção, em relação às variáveis vigor e perda do vigor, foi realizada por meio do teste de Mann-Whitney. Os demais resultados das variáveis avaliadas neste estudo foram apresentados na forma de estatística descritiva ou na forma de tabelas e figuras. A análise estatística foi realizada utilizando-se o “Software” SigmaStat, versão 2.0, considerando um nível de significância de 5% (Shott, 1990).

### Resultados e Discussão

O presente estudo avaliou a motilidade e o vigor dos espermatozoides em dois momentos: logo após a ejaculação e após o sêmen ter sido congelado e descongelado, nos dois meios diluidores, comparando qual dos dois meios diluidores apresentou melhor proteção aos efeitos do processamento à célula espermática. Os resultados são apresentados na Tabela 1 e Figuras 1 e 2.

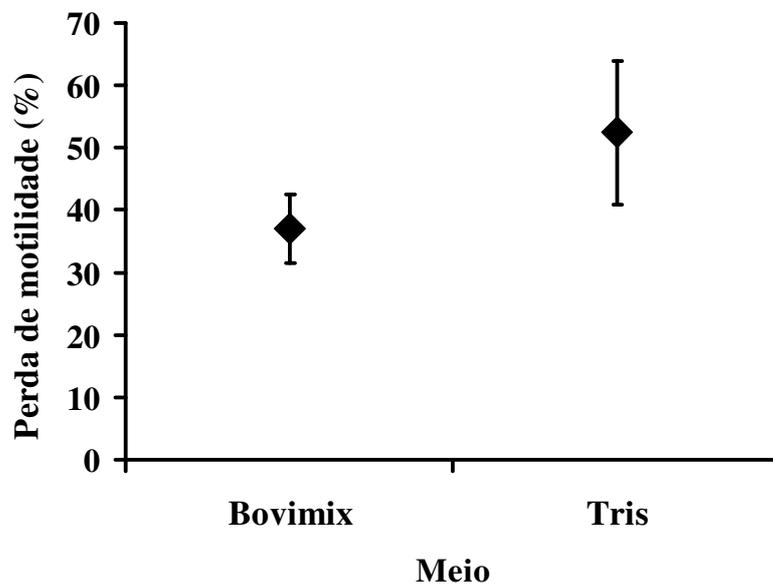
**Tabela 1.** Motilidade e vigor dos espermatozoides em dois diferentes meios para crioproteção, avaliados antes e após a crioproteção e a perda entre os dois momentos, Campo Grande, 2011.

Variável	Meio	Momento		Perda
		Antes	Depois	
Motilidade	Bovimix	76,67±1,83Aa	39,58±4,97Ab	37,08±5,44B
	Tris	76,72±2,65Aa	24,28±12,48Bb	52,44±11,45A
Vigor	Bovimix	4 (4-4)Aa	2,25 (2-3)Ab	1,75 (1-2)A
	Tris	4 (3-4)Aa	1,5 (1-2)Bb	2,5 (1-3)A

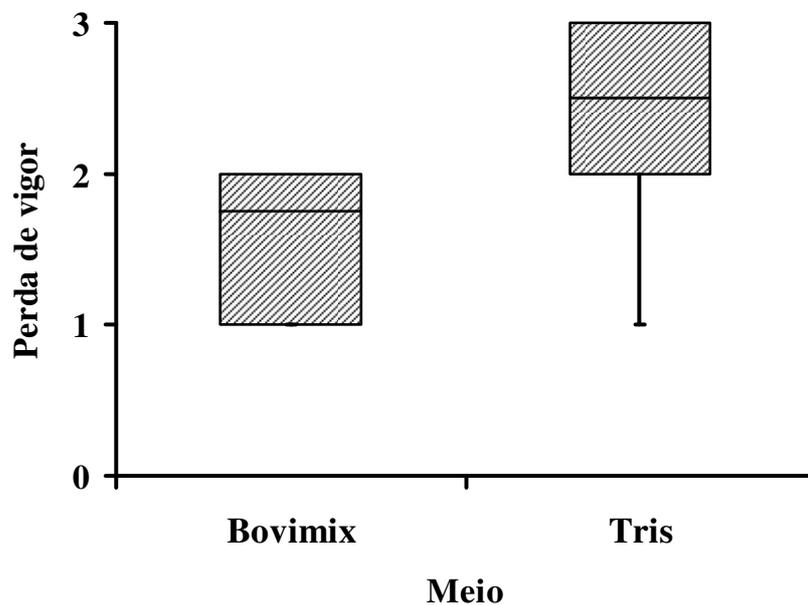
\*Antes = antes da congelação \* Depois = pós descongelação. Letras maiúsculas diferentes na coluna e minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística.

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam que o meio diluidor Bovimix se mostrou melhor para a criopreservação de sêmen de carneiros nativos, quando comparado com meio diluidor Tris. Isso fica claro, pois o meio Bovimix apresentou menor perda de motilidade e vigor entre os momentos avaliados (antes da congelação, pós -

descongelação), conforme observado na tabela e nas figuras acima. É importante ressaltar que a taxa ótima para refrigeração, congelação e descongelação podem diferir com a composição do diluidor (Maxwell et al., 1995) e é possível dizer que o procedimento de criopreservação adotado não seja o protocolo ótimo para cada diluidor.



**Figura 1.** Perda de motilidade dos espermatozóides criopreservados em meio contendo Bovimix ou Tris, Campo Grande, 2011.



**Figura 2.** Perda de vigor dos espermatozóides criopreservados em meio contendo Bovimix ou Tris. A linha horizontal representa a mediana, a caixa representa o intervalo interquartil (25 e 75 %) e a barra representa a faixa de variação (mínimo ao máximo), Campo Grande, 2011.

De acordo com Lima (2008), não ocorre diferença significativa na motilidade e no vigor espermático antes da congelação, ou seja, no momento da refrigeração, com quedas mais rápidas ou mais lentas da temperatura. Isso só reforça que o

momento crítico na criopreservação é a congelação, sendo o momento em que ocorrem as alterações nas características de movimento dos espermatozóides. Segundo Sallamon & Maxwell (2000), a motilidade espermática pode variar entre 40 a 60% após o



processo de criopreservação. O presente trabalho mostrou, no entanto, que essa variação pode ser maior, indo de 30 até 70%, tais resultados sugerem que o meio diluidor utilizado exerce grande influência na proteção e na manutenção da motilidade após o processo de criopreservação.

Cavalcante (2008) verificou os efeitos da criopreservação de sêmen ovino, nos parâmetros de motilidade, utilizando como diluente água de coco e Tris, sendo que os valores de motilidade foram sempre maiores para sêmen fresco, e que a água de coco mostrou valores superiores aos do Tris. Também concluiu que a redução nos parâmetros de motilidade entre o sêmen fresco e criopreservado, pode ser atribuída ao próprio congelamento. As alterações ultra-estruturais, bioquímicas e funcionais, ocorridas durante o processo de criopreservação, levam à redução da motilidade e perda de viabilidade espermática (Sallamon & Maxwell, 1995). Estes dados corroboram com o presente estudo, onde o diluidor Tris também demonstrou menor eficiência na criopreservação de sêmen ovino.

Durante o processo de congelamento Carvalho et al. (2008), verificaram a redução da motilidade progressiva dos espermatozoides, porém nesse experimento só observou-se esta redução no pós descongelamento, não havendo diferença entre a motilidade do sêmen fresco, diluído e refrigerado. Os mesmos autores verificaram ainda melhor motilidade dos espermatozoides de sêmen ovino pós - descongelamento na utilização de Tris-Gema como diluidor ( $52,5 \pm 12,7\%$ ), quando comparado com Leite-Gema ( $41,4 \pm 12,8\%$ ). Isso demonstra que o bom diluidor inicia seus efeitos benéficos antes das células espermáticas serem submetidas ao vapor de nitrogênio líquido, mantendo-se até o pós - descongelamento.

A adição de antioxidante, trealose, para a criopreservação juntamente com o diluente (nesse caso Tris-Gema), não se mostrou eficaz, conforme demonstrado por Cajueiro et al (2009), pois as amostras com altas concentrações de trealose apresentaram os menores valores para motilidade espermática, quando comparadas com o grupo controle. Essa queda na motilidade pode ser atribuída ao aumento da osmolaridade do meio diluente (Bucak et al., 2007). Segundo Tonieto et al. (2007) o uso da trealose fornece um efeito benéfico sobre a integridade de membrana após o descongelamento, contudo não sobre a motilidade, não exerce nenhum efeito de melhora nesse

parâmetro. A utilização de antioxidantes não contribui na preservação da motilidade dos espermatozoides nos processos de congelação/descongelação, sendo que neste experimento este artifício não foi utilizado.

Ainda sobre a adição de componentes para melhorar os resultados da criopreservação, Tilburg et al (2008) fez a adição de insulina ao meio sêmen ovino + diluente. Sendo a insulina uma fonte de energia, ela poderia ajudar a manter a motilidade progressiva dos espermatozoides no pós - descongelamento. Esse fato não foi comprovado, já que não houve diferença significativa na motilidade pós - descongelamento entre o grupo controle (Tris-gema), e o grupo no qual adicionou-se insulina. No presente trabalho não se fez adição de componentes aos diluidores, avaliando-se apenas os diluentes Tris (manipulado em laboratório) e o Bovimix® (produto comercial).

Outro tratamento foi realizado por Pradiee et al. (2010), onde avaliou-se a motilidade progressiva dos espermatozoides após o descongelamento, em meios diluente de Tris-gema mais adição do antioxidante  $\beta$ -mercaptoetanol (BME). Mais uma vez o uso de antioxidantes não mostrou interferência na qualidade do sêmen congelado. Já a adição de lectina da soja comprometeu a viabilidade da célula espermática. Esta atividade de membrana necessita ser avaliada com esses diluidores.

Em estudo feito sobre a caracterização bidimensional de proteínas do plasma seminal de carneiros Moura (2009) evidenciou que com maior concentração de proteínas totais no plasma seminal, melhores os resultados quanto à integridade de membrana, e que com a menor concentração de proteínas, melhora os resultados para motilidade espermática pós - descongelamento.

Pradiee et al. (2010) demonstraram que quanto ao vigor dos espermatozoides no pós - descongelamento, não há diferença significativa entre o sêmen congelado com crioprotetor (Tris Gema), e o congelado com crioprotetor mais antioxidante (etileno glicol e acetamina). Esse resultado também só reforça o que já foi dito anteriormente, quanto à criopreservação de sêmen ovino levando-se em consideração somente motilidade e vigor, a adição de outros componentes não se mostra eficiente, sendo o importante é o crioprotetor. Diferentemente do que ocorre na viabilidade dos espermatozoides, pois os antioxidantes possuem efeito benéfico sobre a integridade de membrana.



Em estudo feito por Cavalcante (2008), comparando os meios diluidores Tris e água de coco em pó (ACP), houve diferença significativa entre os dois meios, onde o primeiro apresentou percentual de espermatozoides móveis totais com valores superiores ao ACP. Em dados numéricos o Tris apresentou  $63,1 \pm 2,6$  % de espermatozoides móveis totais, e o ACP,  $39,0 \pm 2,8$  %. Apesar de no presente trabalho, o Tris se mostrar inferior ao Bovimix, ele ainda pode ser usado como uma boa alternativa, já que em comparação com outros meios (água de coco, leite me pó), apresenta melhores resultados.

Outro resultado que não pode deixar de ser considerado é o efeito individual de cada animal. Assim sendo, se o carneiro reprodutor apresenta um sêmen de boa qualidade à fresco, a probabilidade de se obter sucesso no processo de criopreservação é maior.

### Conclusão

O diluidor Bovimix apresentou maior eficiência na criopreservação de sêmen ovino quando comparado ao diluidor Tris para os parâmetros seminais de motilidade e vigor pós-descongelamento.

Projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de ética da CEUA/UFMS em experimentação animal, sob protocolo nº 271 de 19 de agosto de 2010 e com recursos da FUNDECT-MS.

### Referências

AISEN, E.G.; MEDINA, V.H.; VENTURINO, A. **Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations**. Rio Negro, Argentina 2001. Laboratório de Teriogeneologia, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue.

AZEVEDO, H.C. Métodos e técnicas para viabilizar a inseminação artificial transcervical com sêmen congelado em ovinos. Botucatu-SP 2002. Monografia apresentada ao programa de pós graduação em medicina veterinária, área de Reprodução Animal, da UNESP – Botucatu.

BARBAS, J.P.; BAPTISTA, C.C.; HORTA, A.E.M. Comparação entre dois métodos de congelamento de sêmen de carneiros Merino Regional e Serra da Estrela ao longo do ano. Vale do Satarém – Portugal 2005. Departamento de Reprodução Animal,

Estação Zootécnica Nacional. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.104, p. 61-79.

BUCAK, M.N.; ATESSAHIN, A.; VARISLI, O. et al. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan in ram semen: Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**, v. 67, p. 1060–1067, 2007.

CAJUEIRO, J.F.P.; SILVA, E.C.B.; VIDAL, A.H.; ALMEIDA, F.C.; BATISTA, A.M.; SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Efeito da adição de trealose, taurina e cisteína ao sêmen criopreservado de ovinos. IX Jornada de ensino, pesquisa e extensão-JEPEX VI Semana Nacional de Ciência e Tecnologia-Recife-PE, outubro, 2009 <http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009>.

CARVALHO, F.P.; SILVA, J.F.S.; SOUZA, G.V.; QUIRINO, C.R.; CARVALHO, C.S.P. Diferentes diluentes sobre a motilidade e integridade de membrana plasmática após o congelamento e descongelamento de sêmen ovino. 2008. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.3, p. 612-620, jul/set, 2008.

CAVALCANTE, J.M.M. Avaliação do sêmen ovino diluído e congelado em meio à base de água de coco em pó (ACP-102c) ou tris. Fortaleza-CE 2008. Em Dissertação de pós graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará - 2008.

CHEAMINEAU, P.; COGNIE, Y.; GUERIN, Y.; ORGEUR, P.; VALLET, J.C. **Training manual on artificial insemination in sheep and goats**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 1991, 223p.

LIMA, L.F. Influências dos sistemas de refrigeração sobre a qualidade do sêmen ovino criopreservado em palhetas. Brasília-DF 2008. Dissertação de mestrado em ciências agrárias. Universidade de Brasília. Faculdade de Agronomia e Veterinária – 2008.

MAXWELL, W. M. C.; WELCH, R.; JOHNSON, L. A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction and Fertility** v. 8, p. 1165-78. 1995



- MIES FILHO, A. **Inseminação artificial**. Porto Alegre: Sulina, 1987. v. 2, p.701.
- MOURA, P.P. **Caracterização bidimensional de proteínas do plasma seminal como subsídio para incremento da eficácia da inseminação artificial com sêmen congelado em ovinos**. Brasília-DF 2009. Dissertação de Mestrado em Ciências Animais UnB.
- PRADIEE, J.; FERREIRA, C.E.R.; GOULART, K.L.; SILVA, A.R.; LUCIA, T.J. **Preservação de sêmen de ovinos da raça crioula lanada usando diferentes aditivos crioprotetores**. Pelotas-RS 2010. Grupo de pesquisa ReproPel – Faculdade de Veterinária – Universidade Federal de Pelotas. II Mostra Científica 2010.
- SALAMON, S., MAXWELL W. M. C. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 37, p. 185-249, 1995.
- SHOTT, S. **Statistics for health professionals**. London: W.B. Saunders Company, 1990.
- TIRLBURG, M.F.van; SILVA, J.F.S.; DIAS, A.J.B.; QUIRINO, C.R.; FAGUNDES, B. Influência da insulina na congelabilidade do sêmen ovino. 2008. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 731-739, jul./set. 2008.
- TONIETO, R.A.; GOULARTE, K.L.; SCHIAVON, R.; GASTAL, D.; LUCIA, T.J. Uso de trealose como crioprotetor para sêmen ovino congelado. Pelotas-RS 2007. Laboratório de Biotécnicas da Reprodução. UFPel. XVI Congresso de Iniciação Científica.
- VALENTE, S.I.S. Criopreservação de sêmen ovino: comparação entre dois diluentes. 2007. Apresentação científica. Estação Zootécnica Nacional, Departamento de Reprodução Animal, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal and Reproduction Science** v.. 60, p. 481-92. 2000.