

**INFLUENCIA DO TEMPO DA COLETA À DILUIÇÃO SOBRE A
VIABILIDADE DO SÊMEN OVINO DESCONGELADO**

INFLUENCE OF TIME BETWEEN THE COLLECTION AND DILUTION ON THE
THAWED SHEEP SEMEN VIABILITY

*SANTOS, Ivo Walter

Universidade Federal do Paraná, Departamento de Medicina Veterinária, Palotina-PR,
Brasil.

NÓBREGA Jr., Janduí Escarião

Universidade Federal de Santa Maria, Pós-Doutorado do Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária – Laboratório BioRep, Santa Maria-RS. Brasil.

KOZICKI, Luiz Ernandes

Universidade Pontifícia Católica do Paraná, Professor do Mestrado de Ciência
Animal, Curitiba-PR, Brasil.

WEISS, Romildo Romualdo

Universidade Federal do Paraná, Departamento de Medicina Veterinária, Curitiba-PR,
Brasil.

BINSFELD, Luiz Carlos

Universidade Federal do Paraná, Departamento de Medicina Veterinária, Palotina-PR,
Brasil.

*iwalterdossantos@yahoo.com.br ou santosiw@ufpr.br



Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tempo após a coleta à diluição sobre o espermatozoide de carneiro, visando à integridade das membranas plasmática e acrossomal e da motilidade espermática após descongelamento. Foram utilizados sete Carneiros das raças Ille de France com idade média de três anos. As coletas de sêmen foram realizadas com uso de vagina artificial uma vez por semana, perfazendo 3 coletas por animal, totalizando 21 ejaculados. O diluidor usado foi Tris-gema. Imediatamente após a colheita o ejaculado foi dividido em quatro alíquotas iguais, sendo a primeira diluída em tempo 0 (T0), a segunda 5 minutos (T5), a terceira dez minutos (T10) e a quarta 15 minutos (T15) após a primeira respectivamente a 35°C em banho maria numa concentração de aproximadamente 200×10^6 spz/mL. Após a diluição empregando o método “OneStep”, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5mL previamente identificadas, na concentração de 100×10^6 spz/palhetas. Mantidas por 2h a 5°C, em seguida, foram expostas ao vapor de nitrogênio líquido por 15 min. Decorrido esse tempo, as palhetas foram armazenadas em botijão com nitrogênio líquido a -196 °C. A viabilidade das membranas plasmática e acrossomal foram avaliadas pela coloração supravital tripan blue-giemsa hiposmótica (TBGH). Não houve variação significativa dos parâmetros seminais nos diferentes intervalos de tempo ($P > 0,05$) na diluição. No sêmen descongelado houve diferença significativa na motilidade entre T0 e T15.



($P < 0,009$) e na integridade da membrana plasmática entre T0 a T10 ($P < 0,02$), e T15 ($P < 0,009$), com redução significativa nos mesmos tempos para o acrossoma ($P < 0,01$) e ($P < 0,006$) respectivamente. Conclui-se que quanto mais breve a exposição do sêmen ovino ao meio diluidor, menor será o dano ao espermatozoide.

Palavras chaves: Ovino, sêmen, tempo de diluição.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of time after semen collection until dilution on sheep spermatozoa, aiming to the integrity of plasmatic and acrosome membranes and semen motility after thawing. Seven ram Ile de France breeds three years old were used. The semen collections were collected using an artificial vagina once a week, 3 ejaculates per animal. The extender used was Tris-yolk. Immediately after collection the ejaculate was divided into four equal aliquots, diluted in the first time 0 (T0), the second, 5 minutes (T5), the third, ten minutes (T10) and fourth, 15 minutes (T15) being respectively after the first at 35 ° C in a water bath at a concentration of approximately 200×10^6 sperm / ml. After dilution, employing the "One Step" method, the semen was packaged in 0.5 mL straws, previously identified and the concentration of 100×10^6 sperm / straws. Maintained for 2 h at 5 ° C, then, were exposed to nitrogen vapor for 15 min. After this time, the straws were stored in liquid nitrogen cylinder at -196 °C. The viability of plasmatic and acrosome membranes were evaluated by hyposmotic trypan blue-Giemsa staining (HTBG). There was no



significant variation of seminal parameters in different time intervals ($P > 0.05$) in dilution. In thawed semen was detected significant difference in motility between times T0 and T15 ($P < 0.009$) and plasma membrane integrity between T0 to T10 ($P < 0.02$), and T15 ($P < 0.009$), with significant reductions at the same times for the acrosome ($P < 0.01$) and ($P < 0.006$) respectively. We conclude that the faster dilution of semen after collection, fewer injuries occur to the sperm.

Key words: Ovine, semen, dilution time.

Introdução

A criopreservação afeta a membrana plasmática, principalmente a bicamada lipídica do espermatozoide Bergeron e Manjunath, (2006). A baixa eficiência do congelamento do sêmen ovino pode ser atribuída ao choque térmico, ao estresse osmótico e ao efeito citotóxico decorrente da adição e remoção de substâncias (Salamon&Maxwell, 2000). O'Meara et al (2007), adicionaram plasma seminal no sêmen descongelado de ovino e observaram efeitos negativos na motilidade e viabilidade do mesmo, quando utilizado na inseminação artificial cervical. Santos et al. (2013), sugerem uma correlação positiva entre o tempo de diluição com a integridade da membrana plasmática e acrossoma do sêmen ovino descongelado.

A gema de ovo é composta por grânulos e lipoproteínas de baixa densidade (LDL), (NISSON et al., 2006). A LDL presente na gema de ovo é uma das substâncias



com papel importante para proteção dos espermatozoides durante a criopreservação (MOUSSA et al., 2002; AMIRAT et al., 2004, 2005). De outra forma, a LDL competem com os peptídeos catiônicos presentes no plasma seminal, os quais são prejudiciais à membrana espermática, além de formar um complexo contra as proteínas do plasma seminal (PPS) (MANJUNATH et al., 2002; MANJUNATH & THÉRIEN, 2002; BERGERON & MANJUNATH, 2006). MOUSTACAS et al., (2011) e BOHLOOLI et al. (2012), congelaram sêmen ovino em diluidor Tris adicionado de 20% de gema natural. Estes autores obtiveram $20,2 \pm 8,7$ e $31,52 \pm 1,16$ de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal intactas após descengelamento respectivamente.

A coloração Azul Trypan-giemsa para avaliação da integridade do espermatozoide canino mostrou-se eficiente quando correlacionada ao teste de termorresistência lento e taxas de fertilidade na inseminação artificial de cadelas em cio natural (SANTOS et al., 2007).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tempo após a coleta à diluição sobre o espermatozoide de carneiro, visando à integridade das membranas plasmática e acrossomal e da motilidade espermática após descongelamento.

Material e Métodos

Animais e coleta de sêmen

O experimento foi realizado em criatórios de ovinos no município de Curitiba-SC., e Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina no município de Palotina, PR, Brasil, durante os meses de janeiro a março de 2014. Foram utilizados sete Carneiros das raças Ille de France com idade



média de três anos, mantidos em piquetes com pastagens formadas por aruana e tifton, suplementados com concentrado comercial, sal mineral e água à vontade durante a estação reprodutiva. As coletas de sêmen foram realizadas com vagina artificial uma vez por semana, perfazendo 3 coletas por animal, totalizando 21 ejaculados. Após a coleta, cada ejaculado foi avaliado quanto ao volume (medido em tubo graduado), concentração (câmara de Neubauer), motilidade massal, percentual de espermatozoides móveis e vigor, de acordo com HENRY & NEVES (1998), SALAMON & MAXWELL (2000). Foram utilizados apenas ejaculados com volume superior a 0,5 mL, concentração mínima de espermatozoides de $2,5 \times 10^9$ células/mL, motilidade massal e vigor mínimo de 3 (escore 0 – 5), percentual de espermatozoides móveis superior a 80% e percentual de patologias espermáticas inferior a 15%.

Preparação do diluidor

O diluidor Tris-gema (TG) composto de 3,63g de Tris (Merck - 1.08382 - Germany), 1g de glicose (Merck - 1.0024 - Germany), 1,96g de ácido cítrico (Merck - 1.05323 - Germany), 0,06g de penicilina G (Sigma - P 3032 -USA), 0,1g de estreptomicina (Sigma - S 6501 - USA), 5 mL de glicerol (Merck - 1.04094 - Germany), 15mL de gema de ovo e 100mL água bidestilada (SALAMON & MAXWELL, 2000).

Imediatamente após a colheita o ejaculado foi dividido em quatro alíquotas iguais, sendo a primeira diluída em tempo 0 (T0), a segunda 5 minutos (T5), a terceira dez minutos (T10) e a quarta 15 minutos (T15) após a coleta. O sêmen foi mantido à temperatura de 35°C em banho maria numa concentração de aproximadamente 200×10^6 espermatozoides (sptz)/mL. Após a diluição empregando o método “OneStep”, o sêmen



foi envasado em palhetas de 0,5mL previamente identificadas, na concentração de 100×10^6 spz/palhetas. As palhetas foram lacradas e mantidas à temperatura de 5°C/2h para estabilização da temperatura, em seguida, foram expostas ao vapor de nitrogênio líquido por 15 min. Decorrido esse tempo, as palhetas foram armazenadas em botijão com nitrogênio líquido a -196 °C.

Avaliação do sêmen pós-descongelamento

Após a criopreservação, uma palheta de sêmen de cada ejaculado/animal foi descongelada em banho-maria a 37°C. O sêmen foi analisado quanto a motilidade e o vigor em microscópio de contraste de fase (CF) e aumento de 100x. O restante da palheta foi incubada em banho-maria à temperatura de 38°C/4h para o teste de termo resistência lento (TTRL) objetivando analisar a longevidade e resistência dos espermatozoides para as mesmas características de avaliação.

Avaliação da viabilidade da membrana plasmática e acrossomal

A coloração supravital tripan blue-giemsa hiposmótica (TBGH) foi realizada conforme descrita por Dias (2002) e Santos (2007; 2013). Brevemente, uma alíquota de 20 µL de sêmen foi adicionada a 20 µL da solução azul Tripan 0,2% (0,5 mL água destilada + 0,5 mL 0,4% azul Tripan (Sigma, T 8154 - USA) = 120 mOsm/L (Osmomat®030, Gonotec, Berlin, Germany)) em um microtubo de 1,5 mL e incubados em banho-maria por 60 min a 37 ° C. Em seguida, adicionou-se 1 mL de água bidestilada e a amostra foi centrifugada a 700xg/5 min para remover excesso de corante. O sobrenadante foi descartado e ressuspendeu-se a amostra em 0,5 mL de água bidestilada. Três esfregaços foram preparados, secos em um fluxo de ar e fixados em



metanol por 5 min. Após secagem, os esfregaços foram corados com Giemsa 10% “overnight”. Após a lavagem em água bidestilada, as lâminas foram secas em mesa aquecedora. Em cada lâmina foram contados 200 espermatozóides em aumento de 1000x registrando-se a percentagem dos que apresentaram endosmose positiva (cauda enrolada) segundo proposto por Revell & Mrode (1994). O cálculo do número de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico (HO) foi feito por intermédio da fórmula citada por Melo & Henry (1999), onde: $HO (\%) = (\% \text{ de alterações na região da cauda após HO}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda antes do HO})$. Os espermatozóides foram classificados do seguinte modo:

- Membrana plasmática intacta, reativo ao HO e acrossoma intacto: cabeça rosa ou incolor, cauda enrolada e acrossoma rosa;
- Membrana plasmática intacta, reativo ao HO e acrossoma lesado: cabeça rosa ou incolor, cauda enrolada e acrossoma incolor ou fragmentado;
- Membrana plasmática lesada, não reativo ao HO e acrossoma intacto: cabeça azul ou roxa, cauda estendida e acrossoma rosa;
- Membrana plasmática lesada, não reativo ao HO e acrossomo lesado: cabeça azul ou roxa, cauda estendida e acrossoma incolor ou fragmentado.

Os resultados foram analisados e os dados transformados em arco-seno para melhorar a distribuição dos mesmos. A média e o desvio padrão foram usados para apresentação dos parâmetros do sêmen fresco. Para a avaliação do sêmen congelado foi utilizado análise de variância (ANOVA) avaliando os parâmetros entre os tratamentos



T0, T5, T10 e T15 por ocasião da diluição e descongelamento, considerando um nível de significância de $P < 0,05$.

Resultados e Discussão

As médias e desvios padrão dos parâmetros do sêmen fresco de carneiros, totalizando 21 ejaculados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros de sêmen fresco de carneiros colhidos com vagina artificial durante estação reprodutiva nos meses de fevereiro e março de 2014. (n= 21 ejaculados)

Parâmetros	Média e desvio padrão
Volume (mL)	1,1±0,4
Turbilhão (0 – 5)	3,8±1,1
Motilidade (%)	83,8±10,2
Vigor (0 – 5)	4,1±1,6
Concentração (10^9)	2,4±0,4
Patologias (%)	12,9±0,9

Os resultados conforme tabela 2, demonstram não haver variação significativa dos parâmetros seminais nos diferentes intervalos de tempo ($P > 0,05$) na diluição.

Tabela 2. Parâmetros seminais avaliados em diferentes intervalos de tempo pós-coleta. Motilidade (Mot), membrana plasmática (MP) e acrossoma (AC). n= 21 ejaculados.

Parâmetros	Tempo (minuto) de diluição do sêmen pós-coleta			
	T0	T5	T10	T15
Mot (%)	83,8± 1,2	83,1± 1,3	82,6± 1,5	81,2± 1,6
MP (%)	87,1± 1,6	86,8± 1,8	85,7± 1,9	82,8± 1,7
AC (%)	88,2± 2,0	87,2± 1,9	85,9± 2,1	84,5± 2,3



A tabela 3, demonstra que houve diferença significativa na motilidade entre os tempos 0 e 15min. ($P<0,009$). Houve uma diminuição significativa da integridade da membrana plasmática entre os tempos 0 a 10 ($P<0,02$), e 15min. ($P<0,009$). com redução significativa nos mesmos tempos no AC ($P<0,01$) e ($P<0,006$) respectivamente. As alterações observadas podem ser devido ao tempo de ação do plasma seminal sobre os espermatozoides, da coleta até a diluição. Estes resultados corroboram com os relatos de Manjunath et al., (2002), Manjunath & Thérien, (2002), Bergeron & Manjunath, (2006) e Santos et al. (2013), os quais descrevem que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) presentes na gema de ovo competem com os peptídeos catiônicos presentes no plasma seminal, os quais são prejudiciais à membrana espermática, além de formar um complexo contra as proteínas do plasma seminal (PPS).

Tabela 3. Parâmetros seminais avaliados em diferentes intervalos de tempo pós-descongelamento. Motilidade (Mot), membrana plasmática (MP) e acrossoma (AC). n= 21 ejaculados.

Parâmetros	Tempo (minuto) pós-descongelamento do sêmen			
	T0	T5	T10	T15
Mot (%)	61,2± 2,3 ^a	59,4± 2,5 ^a	56,1± 2,7 ^a	51,2± 2,9 ^b
MP (%)	82,5± 2,2 ^a	78,8± 2,3 ^a	71,2± 2,8 ^b	59,5± 2,7 ^c
AC (%)	83,6± 2,1 ^a	78,4± 2,8 ^a	70,5± 2,4 ^b	58,3± 3,1 ^c

Letras diferentes na mesma linha (^{a,b,c}) indicam diferença significativa ($P<0,05$).

A motilidade espermática é um parâmetro inicial que norteia a viabilidade do sêmen descongelado, porém, não significa que o mesmo seja viável para a fecundação. De 61,2± 2,3 de espermatozoides móveis apenas 82,5± 2,2 apresentaram MP e 83,6± 2,1



AC intactas em T0. Estes resultados assemelham-se aos encontrados por Moustacas et al., (2011) e Bohlooli et al. (2012). Neste sentido a tabela 3 mostra que houve diferença significativa entre os tempos T0 e T15. Estes achados reforçam o trabalho de O'Meara et al. (2007), os quais, adicionaram plasma seminal no sêmen descongelado de ovino e observaram efeitos negativos na motilidade e viabilidade do mesmo, quando utilizado na inseminação artificial cervical de ovelhas.

Esses resultados sugerem uma correlação positiva entre tempo de coleta e diluição influenciando na motilidade e integridade da MP e AC do sêmen descongelado. Desta forma, quanto mais breve a exposição do sêmen ovino ao meio diluidor, menor será o dano ao espermatozoide.

Referências Bibliográficas

AMIRAT, L. TAINTURIER, D. JEANNEAU, L. THORIN, D. CHATAGNON, G. 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.

AMIRAT, L. ANTON, M. TAINTURIER, D. CHATAGNON, G. BATTUT, I. COURTENS, J.L. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos®, low density lipoprotein and Triladyl®, before, during and after freezing and thawing. **Research Reproduction**. v.4, p. 535-43, 2005.

BERGERON, A. CRÊTE, M.H. BRINDLE, Y. MANJUNATH, P. Low-density lipoprotein fraction from hen`s egg yolk decreases the binding of the major protein of 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.

BOHLOOLI, S. , CEDDEN, F., PISHJANG, J., RAZZAGHZADEH, S., BOZOĞLU, S. The effect of different extenders on post-thaw sperm viability, motility and membrane integrity in cryopreserved semen of zandi ram. **Journal of Basic and Applied Scientific Research**. v.2, n.2, p.1120-1123, 2012.

HENRY, M.; NEVES, J.P. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49p.

MANJUNATH, P.; NAUC,V.; BERGERON,A.; MÉNARD,M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology of Reproduction**. v.67, p.1250 – 1258, 2002.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipids-binding proteins *Reproductive Immunology*, v.53, p.109-119, 2002.

MELO, M.I.V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.1, p.71-78, 1999.

MOUSTACAS, V.S.; ZAFFALON, F.G.; LAGARES M.A.; LOAIZA-ECHEVERRIA, 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.



MOUSSA, M. MARTINET, V. TRIMECHE, A. TAINTURIER, D. ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**. V.57, p. 1695-1706. 2002.

NILSSON, L.; OSMARK, P.; FERNANDEZ, et al. Competitive adsorption of water soluble plasma proteins from egg yolk at the water/oil interface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 6881- 6887, 2006.

REVELL, S.G.; MRODE, R.A. Anosmotic resistance test for bovine semen. **Animal Reproduction Science**, v.36, p.77-86, 1994.

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

SANTOS, I.W. NOBREGA Jr, J.E.; GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, J.F.C. Tempo de diluição pós-coleta sobre a qualidade do sêmen ovino descongelado. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 20, 2013, Uberlândia, MG. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, 2013.

SANTOS, I. W.; BINSFELD, L. C.; WEISS, R.R.R.; KOZICKI, L. E.; ROCHADELLI, R.; RESENDE, M.V.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. Cryopreservation of dog spermatozoa: effect of bovine serum albumin on acrosomal integrity and pregnancy rates after artificial insemination. **Archives of Veterinary Science**, v 11, n.2. p.47-54, 2007.

O'MEARA, C.M.; DONOVAN A.; HANRAHAN, J.P.; DUFFY, P.; FAIR, S.; EVANS, A.C.O.; LONERGAN, P. Resuspending ram spermatozoa in seminal plasma after Cryopreservation, does not improve pregnancy rate in cervically inseminated ewes. **Theriogenology**, v. 67, p.1262–1268. 2007.

