

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Utilização de diversas soluções hiposmóticas, na avaliação de sêmen ovino refrigerado diluído em água de coco em pó e leite em pó desnatado.

Marquiliano Farias de Moura

2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

MONOGRAFIA

Utilização de diversas soluções hiposmóticas, na avaliação de sêmen ovino refrigerado diluído em água de coco em pó e leite em pó desnatado.

**Marquiliano Farias de Moura
Graduando**


**Carlos Enrique Peña Alfaro
Orientador**

**Patos
Abril de 2010**



Biblioteca Setorial do CDSA. Maio de 2022.

Sumé - PB

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO CAMPUS DE PATOS -
UFCG

M929u
2010

Moura, Marquiliano Farias de

Utilização de diversas soluções hiposmóticas, na avaliação de sêmen ovino refrigerado diluído em água de coco em pó e leite em pó desnatado / Marquiliano Farias de Moura - Patos - PB: CSTR, UFCG, 2010.

26p.

Inclui bibliografia.

Orientador: Carlos Enrique Pena Alfaro

Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

1 – Reprodução Animal - Monografia. 2 –Ovino - Reprodução3 – Sêmen – ovino - avaliação. I – Título.

CDU: 636.082

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MARQUILIANO FARIAS DE MOURA
Graduando

Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para
obtenção do grau de Medico Veterinário.

ENTREGUE EM 20 / 07 / 2001

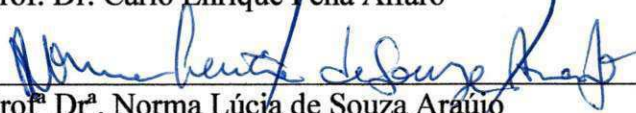
MÉDIA: 9,5

BANCA EXAMINADORA



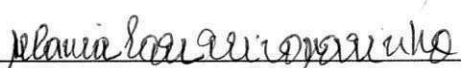
Prof. Dr. Carlo Enrique Peña Alfaro

Nota 10,0



Prof. Dr. Norma Lúcia de Souza Araújo

Nota 9,0



Prof. Dr. Melânia Loureiro Marinho

Nota 9,5

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MARQUILIANO FARIAS DE MOURA
Graduando

Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para
obtenção do grau de Medico Veterinário.

APROVADO EM/...../.....

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Carlos Enrique Peña Alfaro (Orientador)

Profª Drª. Norma Lúcia de Souza Araújo (Examinador I)

Profª Drª. Melânia Loureiro Marinho (Examinador II)

*Aquele que tem ele só, a imortalidade, e
habita na luz inacessível, a quem nenhum
dos homens viu nem pode ver: ao qual seja
hora e poder sempiterno. Amém.*

Dedico

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Fotografia mostrando o aluno avaliando o sêmen.....	16
Figura 2. Fotografia mostrando coleta de Sêmen.....	16
Figura 3. Fotografia mostrando o diluidor padronizado à base de água de coco em pó (ACP-102®).....	17
Figura 4. Fotografia mostrando o diluidor padronizado à base de leite em pó desnatado (Molico®).....	17

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1. Motilidade dos espermatozóides de carneiros Santa Inês diluídos em água de coco em pó e leite em pó desnatado.	18
Tabela 2. Vigor dos espermatozóides de carneiros Santa Inês diluídos em água de coco em pó e leite em pó desnatado.....	19
Tabela 3. Reação morfológica dos espermatozóides submetidos a duas soluções hiposmóticas no sêmen de carneiros Santa Inês diluído em água de coco em pó e leite em pó desnatado e refrigerado a 5 °C.....	20

SUMÁRIO

	Pag.
LISTA DE FIGURAS.....	05
LISTA DE TABELAS.....	06
RESUMO.....	08
ABSTRACT.....	09
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1- Sêmen resfriado.....	11
2.2- Diluentes de sêmen	12
2.2.1- Diluentes a base de água de coco em pó.....	12
2.2.2- Diluente a base de leite.....	12
2.3- Teste de avaliação de integridade da membrana.....	13
2.3.1- Teste Hiposmótico	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1- Coleta e avaliação do sêmen.....	15
3.2- Diluição e resfriamento do sêmen.....	16
3.3- Teste hiposmótico (HOST).....	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1- Motilidade dos espermatozóides	18
4.2- Vigor espermático.....	18
4.3- Reações ao teste hiposmótico.....	19
5 CONCLUSÕES	23
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

RESUMO

MOURA, MARQUILIANO FARIAS. Utilização de diversas soluções hiposmóticas, na avaliação de sêmen ovino refrigerado diluído em água de coco em pó e leite em pó desnatado. 2010 26 p. Monografia (Conclusão do curso de Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande – UFCG. Patos, 2008.

O presente trabalho teve por objetivo estudar a eficácia de diferentes soluções hiposmóticas utilizando sêmen de dois carneiros da raça Santa Inês, diluídos em água de coco em pó e leite em pó desnatado e refrigerado a 5°C. As soluções hiposmóticas foram à base de citrato de sódio e frutose, com concentrações de 150 mOsmol/L e 300 mOsmol/L (milimolis por litro). Foram realizadas dez coletas por reprodutor e o sêmen imediatamente avaliado e submetido ao teste hiposmótico nos períodos de 12, 24 e 48 horas pós-diluição. Nos resultados verificou-se *in vitro* a viabilidade espermática após a diluição utilizando os dois diluentes, sendo satisfatória sua conservação a 5°C nas primeiras 24 h. Concluindo-se que o teste hiposmótico mostrou eficácia na avaliação da membrana plasmática dos espermatozoides nos diferentes períodos.

Palavras-chave: semen, ovino, teste hiposmótico

ABSTRACT

MOURA, MARQUILIANO FARIAS. Use of various solutions hypoosmotic semen evaluation of sheep in refrigerated watered de coco powder and milk powder 2010 26 p. Monografia (Conclusão do curso de Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande – UFCG. Patos, 2008.

This work aimed to study the effectiveness of different solutions using hyposmotic semen from two rams of the Santa Inês breed, diluted in water, coco powder and milk powder and cooled to 5 °C. The solutions were made hyposmotic sodium citrate and fructose, at concentrations of 150 mOsmol/L and 300 mOsmol/L. Ten samples were made by breeding and semen immediately evaluated and submitted to the hyposmotic test periods of 12, 24 and 48 hours after dilution. The results it was found in vitro sperm viability after dilution using the two solvents, and their conservation satisfactory to 5 °C in the first 24 h. Concluding that the hyposmotic test was effective in evaluating the plasma membrane of spermatozoa in different periods.

Keywords: semen, ram, hiposmotic test

1 INTRODUÇÃO

A criação de ovinos de raças deslanadas apresenta grande importância sócio-econômica para a região nordeste, apresentando cerca de 16.628.571 cabeças espalhadas em todo o território brasileiro, deste efetivo 57,2% dos ovinos estão concentrados nesta região (IBGE, 2008).

Apesar do significativo crescimento da ovinocultura, a região nordeste ainda não desfruta de grandes benefícios oriundos do plantel ovino, pois a qualidade dos animais não corresponde às expectativas reprodutivas.

Observa-se que os sistemas de produção têm-se caracterizado por apresentar baixos índices produtivos, em decorrência, principalmente, de práticas de manejo inadequado, má condição sanitária, baixa capacidade de investimentos dos pequenos produtores, reduzida disponibilidade de alimentos nas épocas secas e pouco uso de tecnologias massificadas que contribuem para a melhoria dos índices produtivos e reprodutivos (PENA-ALFARO, 2006).

O desempenho reprodutivo determina, em grande parte, a quantidade a ser comercializada e é através dela que o melhoramento genético se efetiva. Encontram-se nessa situação a inseminação artificial e a transferência de embriões.

Neste sentido surge a necessidade de aperfeiçoar os processos de tecnologia de sêmen quanto ao uso de diluentes e suas concentrações, bem como avaliar as alterações da integridade espermática e sua viabilidade, na relação com as diferentes soluções hiposmóticas.

O teste hiposmótico (HOST) tem sido apontado como método prático para prever a fertilidade dos reprodutores e eficácia de protocolos de tecnologia de sêmen, por possibilitar uma análise das lesões da membrana plasmática.

Desta forma o presente trabalho teve como objetivos: comparar os diluentes a base de leite em pó desnatado com água de coco em pó e avaliar a eficácia de diferentes soluções hiposmóticas utilizando sêmen ovino refrigerado e diluído em água de coco em pó e leite em pó desnatado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Sêmen resfriado

A adoção de técnicas de manejo nutricional e sanitário adequado (NUNES, 1998) aliados à utilização de tecnologias reprodutivas, a exemplo da inseminação artificial apresenta uma importante ferramenta na melhoria do potencial produtivo dos rebanhos ovinos, principalmente com a utilização de raças especializadas para a produção de carne e peles (PEÑA-ALFARO, 2006).

A técnica de inseminação artificial utilizando sêmen fresco e refrigerado, apesar das vantagens inerentes ao melhoramento genético, apresenta como principal limitante o curto período de viabilidade do sêmen, por outro lado o sêmen congelado de ovino apresenta como fatores limitantes os baixos índices de fertilidade na inseminação intracervical, em decorrência da dificuldade de transposição do cérvix, falhas no transporte espermático e dano da membrana plasmática dos espermatozóides nos protocolos de congelamento utilizados na atualidade.

A temperatura do sêmen no momento da ejaculação é de aproximadamente 37,5°C. A exposição do sêmen a temperaturas superiores a essa aumenta o ritmo metabólico e esgota suas reservas energéticas, ocorrendo decréscimo da viabilidade média do espermatozóide. Por outro lado, a diminuição da temperatura contribui para a redução do metabolismo espermático, porém a diminuição dessa temperatura de forma abrupta produzirá a perda da viabilidade celular (WATSON, 1981).

O sêmen pode ser resfriado em temperaturas entre 2° e 5°C sendo de 4° a 5°C as mais comumente utilizadas (LEBOEUF et al.,2000). MIES FILHOS (1987) relatou que o frio é o agente mais eficaz na promoção da diminuição das atividades metabólicas dos espermatozóides, podendo o sêmen ser conservado em estado líquido por várias horas e com taxas de fertilidade aceitáveis.

A inseminação artificial com sêmen refrigerado apresenta como fator positivo a facilidade de preparação e os melhores resultados de fertilidade alcançados a campo. Neste sentido surge a necessidade de aperfeiçoar os processos de tecnologia de sêmen quanto ao uso de diluentes, assim como avaliar alterações da integridade espermática na relação com os diferentes períodos de manutenção de forma refrigerada.

2.2- Diluentes de sêmen

Os diluentes de sêmen destinam-se a prolongar a vida fértil do espermatozóide e a protegê-lo de condições ambientais desfavoráveis (PICKETT e AMANN, 1987; BRINSKO e VARNER, 1992).

2.2.1- Diluentes a base de água de coco em pó

Vários pesquisadores têm demonstrado o uso satisfatório de diluentes à base de água de coco na fertilidade de sêmen de caprinos e ovinos (NUNES, 1986; FREITAS, 1988; NUNES e SALGUEIRO, 1999). Esses efeitos podem ser devidos à rica composição em açúcares, aminoácidos, proteínas, etc., presentes na água de coco. No entanto, a vulgarização do uso da água de coco está limitada, em primeiro lugar, à inexistência de padronização de insumo tão importante e a uma série de fatores como variedade, tipo de cultivar, idade, sanidade e fatores ambientais, influenciam substancialmente sua complexa composição (NUNES e SALGUEIRO, 2006).

A padronização e estabilização da água de coco na forma de pó foram realizadas por Nunes e Salgueiro (2006), visando a sua utilização em processos biotecnológicos reprodutivos. O produto (ACP-102®) tem apresentado a manutenção das características físicoquímicas do produto, o que garante a simplificação de sua utilização, podendo representar uma alternativa para a difusão de várias biotecnologias.

De acordo com esses autores, o produto básico (líquido endospermico do coco), em sua forma processada, confere estabilidade e longevidade de prateleira, sem problemas de acondicionamento, e supera toda e qualquer tecnologia de conservação, uma vez que mantém as propriedades inerentes do produto original.

2.2.2- Diluente a base de leite

Outro diluente amplamente utilizado para preservação de sêmen é a base de leite desnatado (VOSS e PICKETT, 1976).

O leite é um líquido orgânico com importante propriedade biológica para a conservação dos espermatozóides por possuir certa capacidade tampão, ação bactericida, viscosidade adequada para manutenção dos espermatozóides no meio líquido, e

abundância de carboidratos que seriam utilizados pelos espermatozóides na produção de energia. Sabe-se que duas substâncias responsáveis por esta característica são: a lactose, que age como elemento energético, e a caseína que é uma substância capaz de potencializar a atividade cinética dos espermatozóides (CUNHA, 2002).

O sucesso desse diluente tem sido atribuído à sua fração protéica, que pode atuar como tampão, contra mudanças do pH e, como agente quelante, contra a presença de metais pesados no meio (SALAMON e MAXWELL, 2000). Acredita-se que as proteínas do leite agem estabilizando as membranas plasmáticas dos espermatozóides (AMANN e GRAHAM, 1993) e os fosfolipídios promovem modificações estruturais na mesma, permitindo desse modo, sua adaptação a baixas temperaturas (VARNER et al., 1988).

2.3- Teste de avaliação de integridade da membrana

A integridade da membrana plasmática do espermatozóide é um fator importante no estudo da qualidade seminal em razão da inabilidade dos espermatozóides em restuará-la. A membrana interfere tanto no metabolismo celular como na capacitação do espermatozóide, na reação acrossômica e na união do espermatozóide à superfície do óvulo (DE LEEUW et al., 1991).

2.3.1- Teste Hiposmótico

Na tentativa de melhorar a preservação de sêmen ovino durante o resfriamento, diversos diluidores têm sido testados. Para isso, alguns testes laboratoriais, como o teste hiposmótico (HOST), pode ser usado para predizer a fertilidade do sêmen processado em meios de conservação.

A habilidade do teste hiposmótico (HOST) em avaliar a integridade funcional da membrana plasmática torna-o um teste complementar importante na avaliação *in vitro* do sêmen criopreservado, uma vez que tanto a congelação quanto o resfriamento podem levar a efeitos deletérios sobre a membrana (MELO et al., 2005).

O teste hiposmótico, apresenta como princípio a observação de que um espermatozóide, com uma membrana celular íntegra, se colocado em solução hiposmótica, permite a passagem da água pela membrana celular até o restabelecimento do equilíbrio osmótico entre os fluidos extra e intracelulares (SANTOS et al., 2001). Com o influxo da

água para o interior da célula, há um aumento do volume celular (edema), com posterior dobramento da cauda (JEYENDRAN et al., 1984).

Este teste foi originalmente elaborado para avaliar a atividade bioquímica da membrana plasmática intacta em espermatozoides humanos (JEYENDRAN et al., 1984), mas atualmente tem sido utilizado como protocolo de avaliação da viabilidade funcional da membrana espermática de diversas espécies: humanos (JEYENDRAN et al., 1984), eqüinos (ALVES et al., 2004; MELO, 1999), caninos (KUMI-DIAKA, 1993), ovinos (OBERST et al., 2003) e caprinos (FONSECA et al., 2001; SANTOS et al., 2001; SALGUEIRO et al., 2003).

Apesar de ser um teste relativamente novo para avaliar a integridade funcional da membrana plasmática do espermatozóide, o HOST deve ser considerado como um indicador de fertilidade, já que a viabilidade da membrana é um requisito básico para que ocorra a fertilização. Além disso, este teste tem sido apontado como método prático para predizer a fertilidade dos reprodutores e a eficácia de protocolos de tecnologia de sêmen, por possibilitar uma análise das lesões da membrana plasmática (MELO, 1999).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal do Hospital Veterinário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos – PB. Foram utilizados dois reprodutores da raça Santa Inês com idade variando entre 18 e 24 meses e com fertilidade comprovada. Os animais foram vermifugados e mantidos em baias coletivas, recebendo alimentação a base de capim elefante (*Pennisetum purpureum*), suplementação balanceada com farelo de: soja, milho, caroço de algodão, trigo, milho triturado, uréia, calcário calcítico, fosfato bicálcico, mistura vitamínico-mineral, sal iodado e água *ad libitum*.

3.1- Coleta e avaliação do sêmen

Foram realizadas dez coletas de sêmen em cada reprodutor por meio de eletroejaculação (EE), (Figura 1) e em seguida o ejaculado foi mantido em banho-maria a 37°C, onde se avaliou uma amostra do ejaculado observando às características macroscópicas (volume, cor e aspecto) e microscópicas (motilidade de massa e progressiva, vigor, concentração espermática e morfologia), segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998). O turbilhonamento ou motilidade massal foi avaliado em microscópio óptico com objetiva 4x, considerou-se uma escala de 0 a 5. A motilidade individual progressiva foi estimada em microscópio óptico com objetiva de 10x, de forma percentual de 0 a 100% e o vigor foram atribuídos valores de 1 a 5. A morfologia espermática foi avaliada em preparação úmida (uma gota de sêmen em lâmina sob lamínula), em microscopia de contraste da fase, com objetiva de imersão, contando 200 células e a concentração espermática realizada em câmara de Neubauer (Figura 2), com amostra de sêmen diluída a uma proporção de 1:400 em solução de formol citrato. Utilizou-se ejaculados com volume de 0,5 ml, considerando a motilidade progressiva maior ou igual a 75% e a patologia espermática menor que 10%.



Figura 1. Fotografia mostrando coleta de sêmen.



Figura 2. Fotografia mostrando o aluno avaliando o sêmen

3.2- Diluição e resfriamento do sêmen

Após a avaliação do sêmen, os ejaculados dos dois reprodutores foram diluídos com diluidor padronizado à base de água de coco em pó (ACP-102®) (Figura 3) e leite em pó desnatado (Molico®) (Figura 4), utilizou-se 30 ml de leite em pó desnatado reconstituído a 10% e 0,057 g de glicose, diluído em 100 ml de água destilada. A diluição foi realizada na proporção de 1:9 (sêmen e diluente respectivamente). Após a diluição, o sêmen foi colocado na geladeira a 5°C, e avaliado quanto as característica de motilidade, vigor e teste hiposmótico as 12, 24 e 48 horas pós diluição.

3.3- Teste hiposmótico (HOST)

Para este exame foram colhidas alíquotas de 20µL de sêmen diluído e colocadas em tubos, ambos contendo 1 ml de cada solução. Foram utilizadas duas soluções: Solução 1 - 0.735 g de citrato de sódio e 1.351 g de frutose com osmolaridade de 150mOsmol/L, e Solução 2 - 1.470 g de citrato de sódio e 2.702 g de frutose com osmolaridade de 300mOsmol/L, sendo que cada solução foi diluída em 100 ml de água destilada, conforme proposto por Hoffmann (2003). Em seguida, esses tubos contendo a mistura foram incubados por 30 minutos em banho-maria à 37°C (MELO, 1999; HOFFMANN, 2003).

As avaliações das amostras foram realizadas, através da colocação de alíquotas dessa mistura entre lâmina e lamínula, para contagem de 200 células em microscopia de Contraste de Fase em objetiva de imersão.

As células foram classificadas quanto à presença ou não de cauda dobrada, segundo descrito por Kumi-Diaka (1993). O cálculo do número de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (HO) foi feito por intermédio da fórmula citada por Melo (1999), $HO\% = (\% \text{ de alterações na região da cauda após teste HOST}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda antes do teste HOST})$. Nesta fórmula de cálculo todas as alterações de cauda, associadas ou não a defeitos de outra região de espermatozóide, serão computadas antes e depois do HOST.

Para a análise estatística das características avaliadas foi utilizado o pacote estatístico Statistical Analysis System (SAS) – versão 6.1 (1996). A consistência dos dados e a análise descritiva (médias e desvio padrão) das características de interesse ao estudo foram realizadas mediante o emprego do PROC MEANS, e as variáveis estudadas comparadas por meio do PROC GLM, utilizando-se o teste de Student – Newman – Keuls (SNK).

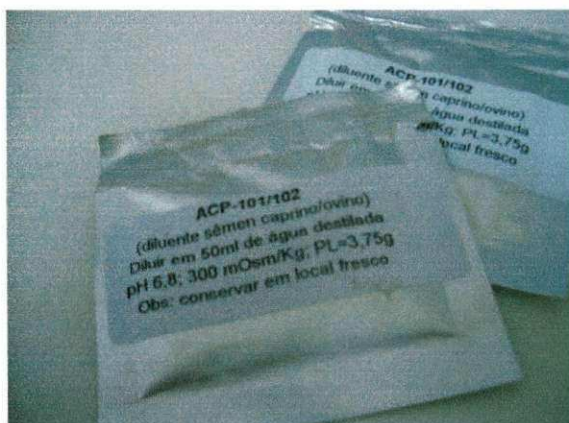


Figura 3. Fotografia mostrando o diluidor padronizado à base de água de coco em pó (ACP-102®)



Figura 4. Fotografia mostrando o diluidor padronizado à base de leite em pó desnatado (Molico®)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Motilidade dos espermatozóides

A Tabela 1 mostra a motilidade dos espermatozóides diluídos em água de coco em pó e leite em pó desnatado de carneiros da raça Santa Inês. Verifica-se na mesma que no diluente a base de água de coco em pó mostrou diferenças significativas entre o momento 0 h, imediatamente após a coleta ainda sem nenhuma diluição e no momento 48 h de conservação a 5° C, não havendo sido verificadas diferenças entre os outros horários. No leite em pó desnatado, verificou-se da mesma forma diferença entre os momentos 0 h e 48 h e ainda entre os momentos 24 h e 48 h. Ao comparar os diluentes nos diversos horários verifica-se que não houve diferença estatística entre os mesmos.

Tabela 1. Motilidade dos espermatozóides de carneiros Santa Inês diluídos em água de coco em pó e leite em pó desnatado.

Diluentes	HORÁRIOS			
	0 h	12 h	24 h	48 h
Água de coco em pó	90aA	82.5abA	75abA	67.5bA
Leite em pó desnatado	87.5acA	80acdA	70adfA	45bfA

Letras diferentes na mesma linha mostram diferença significativa (P<0.01)

Letras iguais maiúsculas na mesma coluna mostram diferença significativa (P<0.01)

4.2- Vigor espermático

Os resultados da avaliação do vigor espermático apresentados na Tabela 2 mostram que houve variações nos intervalos nos momentos 0 h - 24 h e 0 h - 48 h após diluição e refrigeração a 5 °C com diluente a base de água de coco em pó, e também nos períodos entre 12 h e 48 h com o mesmo diluente. Observou-se que no leite em pó desnatado comportou-se de forma semelhante ao diluente de água de coco em pó, já quando se

comparou os diluentes entre os horários, observou-se que não houve diferença entre ambos, em todos os horários.

Tabela 2. Vigor dos espermatozóides de carneiros Santa Inês diluídos em água de coco em pó e leite em pó desnatado.

Diluentes	HORÁRIOS			
	0 h	12 h	24 h	48 h
Água de coco em pó	4aA	3.5abA	3bcA	2.25cA
Leite em pó desnatado	4dA	3.25deA	2.7efA	1.5fA

Letras diferentes na mesma linha mostram diferença significativa ($P < 0.01$)

Letras iguais maiúsculas na mesma coluna mostram diferença significativa ($P < 0.01$)

4.3- Reações ao teste hiposmótico

Na tabela 3 estão presentes as reações ao teste hiposmótico (HOST) dos espermatozóides de carneiros em diferentes momentos pós-diluição, para os diluentes utilizados. Em relação ao teste hiposmótico observou-se ao comparar os horários de avaliação no diluente de água de coco em pó e solução hiposmótica 1, somente houve diferença entre os horários 12 e 48 h ($P < 0.01$), no mesmo diluente com solução hiposmótica 2 houve o mesmo comportamento, já os diluentes a base de leite em pó desnatado não mostraram diferenças entre as duas soluções. A comparação dos diluentes com o uso das duas soluções hiposmóticas não apresentaram variações significativas em todos os horários avaliados.

Tabela 3. Reação morfológica dos espermatozóides submetidos a duas soluções hiposmóticas no sêmen de carneiros Santa Inês diluído em água de coco em pó e leite em pó desnatado e refrigerado a 5 °C.

Diluyente	HORÁRIOS		
	12 h	24 h	48 h
Água de coco Sol. 1	77.5aA	72abA	65.7bA
Água de coco Sol. 2	71.75aA	67abA	60.25bA
Leite desnatado Sol. 1	78.75aA	74aA	67aA
Leite desnatado Sol. 2	72.75aA	65.25aA	62aA

Letras diferentes na mesma linha mostram diferença significativa ($P < 0.01$)

Letras iguais maiúsculas na mesma coluna mostram diferença significativa ($P < 0.01$)

A avaliação seminal pós-diluição assume grande importância na caracterização da qualidade espermática visando bons índices de fertilidade no uso da inseminação artificial com sêmen fresco, refrigerado ou congelado. Neste sentido a mensuração das variações nos parâmetros motilidade e vigor são de grande relevância, conforme ressalta Weitze (2001), o qual considera que a motilidade individual progressiva e o vigor dos espermatozóides são importantes parâmetros na avaliação da potencialidade da fertilidade, já que em condições normais somente os espermatozóides com movimento retilíneo e vigoroso batimento de cauda conseguem ultrapassar a cérvix e a junção útero-tubarica e atingir o local da fecundação no oviduto e penetrar as diversas camadas do *cumulus oophorus* e da zona pelúcida. O autor considera ainda que é fundamental a análise destes parâmetros nos trabalhos de comparação de diluyente, tempo de equilíbrio, e outros procedimentos que representem as características metabólicas das células, seja *in vitro* ou envolvendo teste de fertilidade a campo.

No presente trabalho, verificou-se que no diluyente a base de água de coco em pó houve diferença entre os momentos 0 h e 48 h, o que ressalta que o mesmo pode ser utilizado de forma satisfatória até as primeiras 24 h, no entanto o valor de motilidade obtido nas 48 h encontra-se dentro dos parâmetros de viabilidade espermática ao considerar que 67.5% de motilidade ainda oferece a possibilidade de alcançar uma fecundação, uma vez que os espermatozóides no processo de resfriamento não sofrem as injúrias verificadas com o

sêmen congelado. Coincidindo com as observações de Silva (1993) que considera a motilidade com valores acima de 50% para o sêmen refrigerado oferecendo resultados satisfatórios de fertilidade, uma vez que a população espermática é maior que aquela utilizada no sêmen congelado e as células não sofreram o impacto do processo de congelamento e descongelamento.

A observação de diferenças entre as 0 h e 48h e entre as 24 h e 48 h no uso do diluente a base de leite em pó direciona-se no sentido de uma comparação semelhante ao outro diluente, no entanto o valor obtido 48 h após a diluição mostra valores inferiores ao de água de coco em pó, fato este que pode trazer uma influência direta nos índices de fertilidade. Por outro lado a comparação entre os dois diluentes nos diversos horários observadas não sugerem diferenças entre ambos, mas que associado ao desempenho na comparação entre os horários no diluente sugere-se um melhor desempenho da motilidade da água de coco em pó ao comparar com o diluente de leite em pó desnatado.

A potencialidade do uso do sêmen refrigerado com manutenção da viabilidade em até 48 horas representa uma alternativa no uso sistemático da inseminação artificial em ovinos, pois apesar das limitações de tempo de conservação, seu uso pode ser expandido sem enfrentar as limitações inerentes ao uso do sêmen congelado, tais como necessidade do uso da laparoscopia e os índices de fertilidade sensivelmente inferiores na inseminação cervical na ovelha, conforme foi constatado por Menchaca et. al. (2005), que obtiveram bons resultados de inseminação com sêmen refrigerado por 12 h a 5°C e Milczewski et. al. (2000) com manutenção por 8 horas.

O uso satisfatório do diluente a base de leite desnatado foi constatado por Andrade (2007) que obteve melhores resultados com o uso desse diluente ao se comparar com o Tris-Gema.

Com relação ao vigor espermático observou-se nos dois diluentes, uma redução percentual após as primeiras 12 h o que leva a supor que apesar da motilidade individual progressiva estar presente, a força do movimento não acompanhava essa motilidade das células.

O uso do resfriamento do sêmen a 5°C é um procedimento consolidado (MAXWELL & WATSON, 1996). E no presente trabalho foi utilizado visando comparar o diluente água de coco em pó associando com a reação do teste hiposmótico das células espermáticas, como forma de avaliar o grau de comprometimento provocado pela técnica de resfriamento na relação com os dois diluentes testados.

Ao avaliar a reação hiposmótica nos espermatozóides diluídos nos diluentes de água de coco em pó e leite em pó desnatado, constatou-se que as variações entre os diluentes nos diversos horários mostraram-se não significativas, no entanto ao avaliar os diluentes de forma isolada nos diversos horários obtiveram-se melhores resultados de manutenção da integridade espermática no diluente de leite desnatado em pó.

A constatação que à medida que aumenta o tempo de conservação não aumentou o percentual de células que não reagem ao teste hiposmótico leva a relacionar a manutenção da integridade da membrana plasmática a medida que aumenta sua conservação no sêmen refrigerado a 4°C diluído em leite desnatado, conforme observou Andrade (2007). Assim, isto assume importância já que fica evidente que a diminuição da fertilidade pode-se observar entre no uso de sêmen conservado em diferentes períodos relaciona-se mais com a diminuição da motilidade e o vigor do que com os danos que a membrana plasmática pode sofrer nessa conservação.

Este trabalho coincide com as observações de Andrade (2007) que constatou o uso da solução hiposmótica contendo 150 mOsMol/L que foi satisfatória na reação hiposmótica dos espermatozóides ovinos e permitiu comparar esta nos diferentes períodos de avaliação para os diluentes utilizados, nas soluções testadas no referido trabalho (150 mOsMol/L e 300 mOsMol/L). Ficou demonstrado que as duas soluções possibilitaram resultados satisfatórios, não havendo diferenças entre elas em relação aos diluentes usados, sugerindo sua utilização para trabalhos com ovinos.

5 CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados pode-se concluir que:

- A utilização dos diluentes a base de água de coco em pó e de leite em pó desnatado possibilitaram a obtenção de motilidade e vigor satisfatórios, com manutenção dessas características nas primeiras 24 h;
- As soluções hiposmóticas utilizadas possibilitaram avaliar as alterações da membrana plasmática nas células espermáticas, recomendando seu uso de forma rotineira nos processos de tecnologia de sêmen em ovinos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S.G.G.; SNOECK, P.P.N.; RIBEIRO FILHO, A. de L. et al. Effects of solution, incubation time and sperm fixation on equine cryopreserved sperm cells submitted to the hypoosmotic swelling test. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., Porto Seguro, Brasil. **Abstracts...** Belo Horizonte: CBRA, 2004. p. 508.

AMANN, R. O.; GRAHAM, J.K. Spermatozoa function. In: Equine Reproduction. Malvern: Lea e Febiger, p. 715-745, 1993.

ANDRADE, A. K. G de. **Utilização do teste hiposmótico na avaliação de sêmen ovino refrigerado com diluentes a base de tris-gema e leite desnatado**, Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária, UFCG. Patos - PB, 32 p. 2007.

BRINSKO, S. P.; VARNER, D. D. Artificial insemination and preservation of semen. In: BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D. Stallion management. **Vet Clin North America: Equine Practice**, v. 8, n. 1. p. 205-218, 1992.

CAIZA DE LA CUEVA, F.I.; RIGAU, T.; BONET, S. Subjecting horse spermatozoa to hypoosmotic incubation: effect of ouabain. **Theriogenology**, v. 47, p. 765-784, 1997.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte, p. 25-27, 1998.

CUNHA, I.C.N. **Criopreservação do sêmen de cães**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 149p. 2002.

DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.G.; WOELDERS, H. The fix stain method. **Jour Androl**. V.12, p. 112-118, 1991

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

HOFFMANN, B. **Andrologie – Physiologie, Pathologie und biotechnologie der männlichen fortpflanzung**. Berlin: Lehmanns media, 2003. 122 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário, 2007**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 31 mar. 2010.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN H.H., PEREZ-PELAEZ, M.; et al., Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal Reproduction Fertility**, v. 70, p. 219-228, 1984.

KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriogenology**, v. 39, p. 1279-1289, 1993.

MELO, M.I.V. de. **Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 1999. 67p.

MELO, M.I.V.; HENRY, M.; BEKER, A.R.C.L. **Teste hiposmótico para avaliação do sêmen eqüino resfriado com diferentes diluidores**. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.57, n.6, p.757-763, 2005.

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

MILCZEWSKI, V.; KOZICKI, L.E.; LUZ, S.L.N.; NEVES, J.P. Inseminação Artificial Intrauterina e Cervical em Ovelhas Utilizando Sêmen Refrigerado. **Archives of Veterinary Science**, v.5, p.35-39, 2000.

NUNES, J.F. Biotecnologia da reprodução na espécie caprina. In: I Congresso Nordestino de Produção Animal. **Anais...** Fortaleza – CE, dezembro de 1998.

OBERST, E.R.; JOBIM, M.I.M.; MATTOS, R.C. et al. Teste hiposmótico e sua relação com outros métodos para avaliação da integridade da membrana plasmática do carneiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 375-376, 2003.

PENA-ALFARO, C.E.; SOUZA, N.L. **Curso de Biotecnologias da Reprodução nos Animais Domésticos**. UFCG. Patos, 60 p. 2006.

PICKETT, B.W., AMANN, R. P. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. **Journal Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 5, p. 289-302, 1987.

ROTA, A.; PENZO, N.; VINCENTI, L.; et al.. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 53, p. 1415- 1420, 2000.

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

SALGUEIRO, C.C. de M.; NUNES, J.F.; MATEOS-REX, E.; CORDEIRO et al. Avaliação da qualidade do sêmen caprino pós-descongelamento através do teste hiposmótico. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, 2003.

SANTOS, A.D.F; TORRES, C.A.A.; FONSECA, Uso do teste hiposmótico (HOST) para avaliar a congelabilidade do sêmen de caprinos das raças Alpina e Saanen, jovens e adultos, submetidos ao manejo com luz artificial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, 2001.

SAS. **User's guide: statistics**, version 6.1. Cary: SAS Institute Inc., 1996. 956p.

SILVA, M.A.V. **Efeito de diferentes diluentes de congelamento e de duas temperaturas de descongelamento sobre a integridade acrossomica, vigor e motilidade espermática do sêmen caprino.** 1993. 89p. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária). Universidade Federal Rural do Pernambuco, Recife.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L. et al. Effects of cooling rates and storage temperature on equine spermatozoa motility. **Theriogenology**, v. 29, p. 143-154, 1988.

VOSS, J.L.; PICKETT, B.W. **Reproductive management of the broodmare.** Colorado state University Exp. Stat. Anim. Reprod. Lab. p.22. 1976.

WEITZE, K.F. Spermatologische Untersuchung in: Busch, W.; Holzmann, A. **Veterinärmedizinische Andrologie.** Stuttgart: Schattauer, 2001. 561p.