

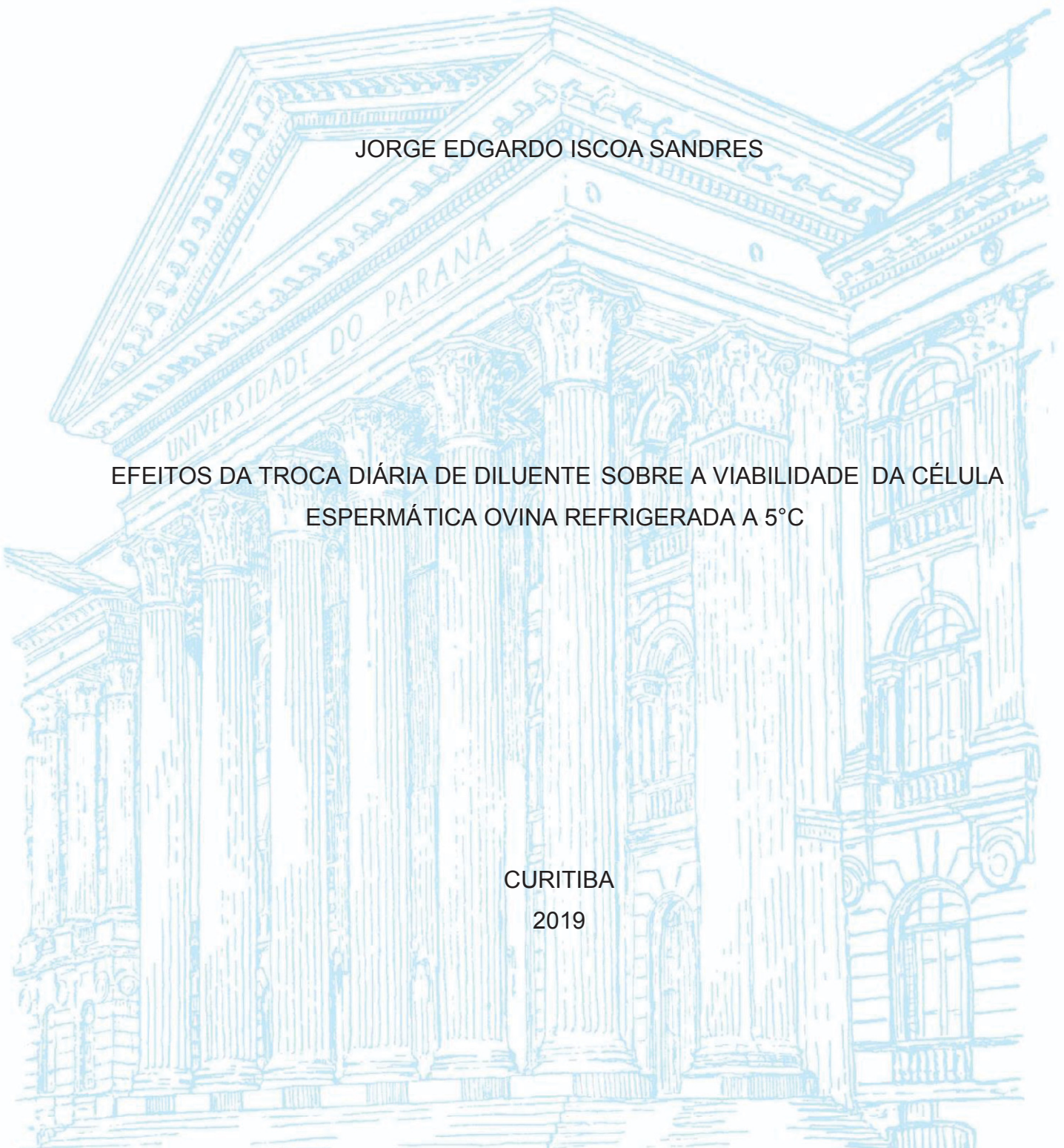
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JORGE EDGARDO ISCOA SANDRES

EFEITOS DA TROCA DIÁRIA DE DILUENTE SOBRE A VIABILIDADE DA CÉLULA  
ESPERMÁTICA OVINA REFRIGERADA A 5°C

CURITIBA

2019



JORGE EDGARDO ISCOA SANDRES

EFEITOS DA TROCA DIÁRIA DE DILUENTE SOBRE A VIABILIDADE DA CÉLULA  
ESPERMÁTICA OVINA REFRIGERADA A 5°C.

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
Obtenção do grau de mestre em Ciências Veterinárias  
no Setor de ciências Agrarias, da Universidade Federal  
do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss.

**CURITIBA**

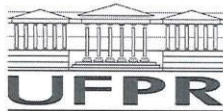
**2019**

Sandres, Jorge Edgardo Iscoa  
Efeitos da troca diária de diluente sobre a viabilidade da  
SA194e célula espermática ovina refrigerada a 5°C / Jorge Edgardo  
Iscoa Sandres. - Curitiba, 2019.  
75 p.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná.  
Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias.  
Orientador: Romildo Romualdo Weiss

1. Ovino - Reprodução. 2. Ovino - Sêmen. 3. Sêmen  
congelado. I. Weiss, Romildo Romualdo. II. Título. III.  
Universidade Federal do Paraná.

CDU 636.082



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRARIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
VETERINÁRIAS - 40001016023P3

## TERMO DE APROVAÇÃO

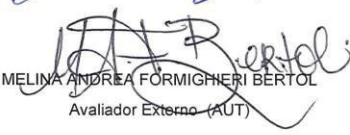
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **JORGE EDGARDO ISCOA SANDRES** intitulada: **EFEITOS DA TROCA DIÁRIA DE DILUENTE SOBRE A VIABILIDADE DA CÉLULA ESPERMÁTICA OVINA REFRIGERADA A 5°C**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 19 de Março de 2019.

  
ROMILDO ROMUALDO WEISS  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
LUIZ ERNANDES KOZICKI  
Avaliador Externo (PUC/PR)

  
MELINA ANDREA FORMIGHIERI BERTOL  
Avaliador Externo (AUT)

*A meus pais, Jose Manuel e Ana Leticia, exemplos de  
dedicação, humildade e amor que são minha fortaleza.*

## AGRADECIMENTOS

À DEUS, por permitir chegar até aqui e colocar pessoas maravilhosas no meu caminho.

Ao meus pais, Manuel (in memoriam) e Ana Leticia exemplo de caráter e dignidade, além de a confiança depositado em mim, pelo amor, educação e valores que me ensinaram. À meu querido Irmão e melhor amigo José Manuel que, apesar da distância enfrentada durante estes anos de mestrado, jamais deixou de dar força e apoio sempre que precisei. Amo muito vocês.

A minha Avó Clara Maria Sandres, por ser parte de minha inspiração e por sempre acreditar em mim. Obrigado mãe.

Ao Prof. Dr, Romildo Romualdo Weiss, pela orientação, ensinamentos, oportunidades profissionais concebidas, conselhos, conversas, paciência e até algumas discussões, inevitáveis com o convívio diário, mas que com toda certeza valeram para meu crescimento profissional e pessoal. Ficam aqui firmados minha grande admiração, respeito e gratidão.

Ao Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tacia Bergstein pela disposição em colaborar e ensinar, além de sempre me ajudar, tirando minhas dúvidas, e ajudando com o desenvolvimento do projeto. Também, agradeço por ter aberto a Central de Reprodução Álamos para a realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Ernandes Kozicki pela colaboração científica.

Ao Dr.<sup>a</sup> Melina Andrea Bertol pela colaboração e ajuda científica.

À Álamos Agronegócios, genética e Part LTDA, por fornecer suas instalações e os animais para o desenvolvimento deste projeto. Muito obrigado pela ajuda e colaboração.

As mestres, Ana Claudia Rangel de Abreu e Eduarda Busato, que com muita paciência me ensinaram a rotina do laboratório de reprodução animal, às vezes até deixando de fazer suas coisas para me ensinar. Foi com vocês que aprendi a maior parte das coisas aqui na UFPR. Serei eternamente grato por isso.

A Caroline Bortoleto mais que amiga, uma irmã, e uma pessoa maravilhosa. Obrigado pela companhia nas aulas, pela ajuda no meu projeto, pelas conversas e pelos cafés da manhã divertidos. Você foi muito importante nessa caminhada.

Aos amigos que encontrei em Curitiba, Ana Helen, Ansony Ronaldo, Julio, Henrrique, Barbara, Laiss, Fafa e muitos outros. Muito obrigado pelas amizade e conversas.

Aos Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Julia Arantes Galvão, Prof.Dr. Fabiano Montiani, Prof.Dr. Rafael Viera e o Prof. Dr. Juan Carlos Duques, muito obrigado pela ajuda e ensinamentos nestes dois anos. Além de todos os professores do programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da UFPR.

Aos profissionais do laboratório de patologia clínica da UFPR, que dedicaram parte do seu tempo para a realização de certas avaliações necessárias para o projeto. A CAPES pelo apoio financeiro na concessão da bolsa durante o mestrado.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“A inteligência e o caráter é o objetivo da verdadeira educação”.

Martin Luther King Junior



## RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da troca diária do diluente no sêmen refrigerado ovino, avaliando sua ação na viabilidade dos espermatozoides. Para o estudo, formou-se um *pool* de sêmen com três ejaculados, de três carneiros da raça Dorper, após a avaliação subjetivas dos parâmetros espermáticos. O pool de sêmen foi diluído no meio Glicina-Gema-Leite (GGL), na proporção 1:4, para posterior fracionamento nos grupos controle (controle GGL), grupo TGG (teste GGL) e grupo TDD (pós-ressuspensão). Após a diluição, submeteu-se as amostras ao processo de refrigeração a 5°C, em Botutainer®. No intervalo de 24 horas, realizou-se a avaliação de uma alíquota de cada amostra por 5 dias, agrupando-as em 6 momentos (0h), (24h), (48h), (72h), (96h) e (120h). O processo de ressuspensão do pellet de espermatozoides em diluente fresco foi repetido diariamente até o grupo TG atingisse o mínimo de  $\geq 30\%$  de MP, mediante análises subjetivas no microscópio óptico. O grupo controle apresentou menor motilidade e vigor espermático, e seus SPZ obtiveram maior percentual de defeitos morfológicos que os SPZ dos grupos TG e TDD. Também, apresentou maior concentração da enzima AST, que foi correlacionada com o aumento do percentual de lesão de acrossomo nos SPZ, e do menor consumo de frutose durante o processo. A adição do diluente novo cada 24 horas apresentou efeito positivo sobre os SPZ, uma vez que o grupo TG preservou os parâmetros espermáticos por 120 horas. No quinto dia de avaliação, sua MP foi equivalente a 32%, vigor 3,20, 67,30% de SPZ com membrana íntegra e concentração de  $184,3 \times 10^6$  de SPZ viáveis por mL antes da centrifugação. No grupo TDD, os valores apresentados foram de 37% de MP, vigor 4,40, 66% de SPZ com membrana íntegra e concentração de  $175,8 \times 10^6$  de SPZ viáveis por mL, e um consumo de frutose 19,00 mg/ml. Este foi maior durante o tempo de avaliação do estudo demonstrando um maior aproveitamento desse substrato pelos espermatozoides. Isso demonstrou que a troca diária de diluente foi eficiente para preservar a viabilidade espermática por um maior período de tempo.

**Palavras chaves:** ovinos, refrigeração, diluição, sêmen, durabilidade.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of daily diluent exchange on refrigerated sheep semen, evaluating its action on sperm viability for the study, a semen pool with three ejaculates of three Dorper rams was formed after the subjective evaluation of sperm parameters. The semen pool was diluted in Glycine-Milk-Yolk (GGL) medium, in a 1: 4 ratios, for subsequent fractionation in the control (GGL control), TGG (GGL test) and TDD (post-resuspension) groups. After dilution, the samples were subjected to refrigeration at 5°C in Botutainer®. Within 24 hours, an aliquot of each sample was evaluated for 5 days, grouping them into 6 moments (0h), (24h), (48h), (72h), (96h) and (120h). The process of resuspension of the sperm pellet in fresh diluent was repeated daily until the TG group reached a minimum of  $\geq 30\%$  of MP, by subjective analysis under the optical microscope. The control group had lower sperm motility and vigor, and their SPZ obtained a higher percentage of morphological defects than the SPZ of TG and TDD groups. Also, it presented higher concentration of AST enzyme, which was correlated with the increase in the percentage of acrosome lesion in the SPZ, and the lower consumption of fructose during the process. The addition of new diluent every 24 hours had a positive effect on SPZ, since TG group preserved sperm parameters for 120 hours. On the fifth day of evaluation, its MP was equivalent to 32%, vigor 3.20, 67.30% SPZ with intact membrane and concentration of  $184.3 \times 10^6$  viable SPZ per mL before centrifugation. In the TDD group, the values presented were 37% MP, vigor 4.40, 66% intact membrane SPZ and  $175.8 \times 10^6$  viable SPZ concentration per mL, and a fructose consumption 19.00 mg / ml. This was higher during the study evaluation time showing greater use of this substrate by sperm. This demonstrated that daily diluent exchange was efficient to preserve sperm viability for a longer period.

**Keywords: sheep, refrigeration, dilution, semen, durability**

## LISTA DE FIGURA

- FIGURA 1. COLETA DE SÊMEN POR VAGINA ARTIFICIAL EM CARNEIRO DA RAÇA DORPER; B, COLETA DE SÊMEN POR VAGINA ARTIFICIAL EM CARNEIRO DA RAÇA WHITE DORPER. .... 47
- FIGURA 2- A, DILUENTE GLICINA GEMA LEITE; B, ADIÇÃO DE DILUENTE GGL NA PROPORÇÃO 1:4 AO SÊMEN ..... 50
- FIGURA 3- VALOR MÉDIO DA MOTILIDADE TOTAL(MT) DOS GRUPOS CONTROLE (GC), TRATAMENTO GLICINA GEMA LEITE (TGG) E GRUPO TRATAMENTO POS CENTRIFUGAÇÃO E ADIÇÃO DE NOVO DILUENTE (TDD) MANTIDOS A 5°C POR 120 HORAS..... 52
- FIGURA 4- VALOR MÉDIO DA MOTILIDADE PROGRESSIVA DOS GRUPOS CONTROLE (GC), TRATAMENTO GLICINA GEMA LEITE (TGG) E GRUPO TRATAMENTO PÔS CENTRIFUGAÇÃO E ADIÇÃO DE NOVO DILUENTE (TDD) MANTIDOS A 5°C POR 120 HORAS.....53
- FIGURA 5- VALORES DE VIGOR (1-5) DURANTE A CENTRIFUGAÇÃO E TROCA DO DILUENTE POR 120 HORAS À TEMPERATURA DE 5°C ..... 55
- FIGURA 6. PERDA DE ESPERMATOZOIDES DURANTE A CENTRIFUGAÇÃO E RESSUSPENSÃO DO NOVO DILUENTE A 5°C, DURANTE 24, 48, 72, 96 E 120 HORAS. .... 58

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1. MÉDIA  $\pm$  DESVIO PADRÃO DO TESTE DE INTEGRIDADE DE MEMBRANA (%) DURANTE A CENTRIFUGAÇÃO DIÁRIA E RESUSPENSÃO DO DILUENTE NO SÊMEN OVINO REFRIGERADO NOS GRUPOS (GC), (TGG) E (TDD) POR 120 HORAS A 5°C. .... 54
- TABELA 2. MÉDIA  $\pm$  DESVIO PADRÃO DO CONSUMO DE FRUTOSE (MG/ML-1) NO SÊMEN OVINO REFRIGERADO DURANTE A TROCA DIÁRIA DE DILUENTE NOS MOMENTOS 0, 24, 48, 72, 96 E 120 HORAS, A 5°C. 54
- TABELA 3. MÉDIA  $\pm$  DESVIO PADRÃO DOS ESPERMATOZOIDES VIAVEIS DURANTE CENTRIFUGAÇÃO E RESSUSPENSÃO COM DILUENTE FRESCO DOS GRUPOS CONTROLE (GC), TRATAMENTO GLICINA GEMA LEITE (TGG) E GRUPO TRATAMENTO POS CENTRIFUGAÇÃO E ADIÇÃO DE NOVO DILUENTE (TDD) MANTIDOS A 5°C POR 120 HORAS. .... 56
- TABELA 4. MÉDIA  $\pm$  DESVIO PADRÃO DAS ENZIMAS AST (UI), ALT (UI), LDH (UI) DURANTE A CENTRIFUGAÇÃO DIÁRIA E RESSUSPENSÃO COM O DILUENTE EM SÊMEN OVINO NOS GRUPOS CONTROLE (GC), TRATAMENTO GLICINA GEMA LEITE (TGG) E GRUPO TRATAMENTO POS CENTRIFUGAÇÃO E ADIÇÃO DE NOVO DILUENTE (TDD) MANTIDOS A 5°C POR 120 HORAS. .... 57
- TABELA 5. MÉDIA  $\pm$  DESVIO PADRÃO DE LESÕES DE ACROSSOMO DURANTE A CENTRIFUGAÇÃO DIÁRIA E RESSUSPENSÃO COM O DILUENTE EM SÊMEN OVINO NOS GRUPOS CONTROLE (GC), TRATAMENTO GLICINA GEMA LEITE (TGG) E GRUPO TRATAMENTO POS CENTRIFUGAÇÃO E ADIÇÃO DE NOVO DILUENTE (TDD) MANTIDOS A 5°C POR 120 HORAS. .... 58

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C – graus Celsius  $\mu$ L-

microlitros

ADP - Adenosina Difosfato

ALT - Alanina Aminotransferase

ANOVA- Analises de Variância

AST - Aspartato Aminotransferase

ATP- Trisfosfato de Adenosina

AV - Vagina Artificial

CBRA- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal

CG - Grupo controle

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DMPBS- Dulbecco modificado Phosphate buffered saline

DNS- Dinitrosa-licílico

GG- Glicina Gema

GGL - Glicina Gema de ovo Leite

GPx - Glutathione Peroxidase

GR - Glutathione Redutase

HOST - teste hiposmótico

LBD - Lipoproteínas de Baixa Densidade

LDH- Lactato Desidrogenase

ML- mililitros

MP - Motilidade progressiva

MT-Motilidade total

OXPHOS - fosforilação oxidativa

ROS - Espécies Reativas do oxigênio

SOD - Superóxido Dismutase

SPZ - espermatozoides

TGG – grupo tratamento Glicina Gema de ovo Leite

TDD - grupo tratamento depois da troca de diluente

UTH - Ultra tratada termicamente

## SUMÁRIO

RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	10
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>17</b>
<b>3 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>17</b>
<b>CAPITULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>18</b>
4.1 Sêmen Refrigerado .....	19
4.2. Diluente para sêmen ovino refrigerado .....	20
4.3. Efeitos da centrifugação e taxa de diluição .....	23
4.4. Troca de diluente .....	24
4.5. Fatores bioquímicos no armazenamento de sêmen .....	27
4.5.1. Enzima Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT) .....	27
4.5.2. Enzima Lactato Desidrogenase LDH .....	27
4.5.3. Frutose .....	28
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>30</b>
<b>CAPITULO II AVALIAÇÃO DE ALGUNS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS POR 5 DIAS MEDIANTE A CENTRIFUGAÇÃO E RESSUSPENSÃO DIÁRIA DE DILUENTE NO SEMÊN OVINO REFRIGERADO A 5°C .....</b>	<b>42</b>
RESUMO .....	43
ABSTRACT .....	44
<b>6.1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>6.2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>46</b>
6.2.1 Local e animais .....	46
6.2.2 Coleta do sêmen .....	47
6.2.3 Análise do sêmen .....	47
6.2.4 Diluição do sêmen .....	49
6.2.5 Determinação de enzimas .....	50
6.2.6 Determinação de Frutose .....	51
6.2.7 Análise estatística .....	51
<b>6.3 RESULTADOS .....</b>	<b>52</b>
<b>6.4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>6.5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>6.6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>64</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil situa-se entre os maiores produtores de ovinos no mundo (FAO, 2016). De acordo com IBGE (2015), estima-se que há no país 18,41 milhões de cabeças de ovinos. Sendo a região Nordeste a principal criadora da espécie, e o estado do Rio Grande do Sul o maior produtor de lã, com 91,9% da produção nacional.

A ovinocultura é hoje uma das atividades agropecuárias de maior crescimento no país, devido ao aumento de consumo de produtos cárneos (FAO., 2016). Gerando aproximadamente 500 mil empregos (Piagentini et al., 2017).

Porém, como o Brasil não consegue suprir a demanda nacional de carne ovina, tornou-se necessário o aumento da produção com investimentos nas áreas de biotecnologias da reprodução animal, restabelecendo o mérito genético da espécie ovina. Podendo, assim, participar na comercialização de carne ovina com países mais desenvolvido do mundo (Aquino et al.,2016).

A utilização das biotecnologias da reprodução é fundamental para o melhoramento genético do rebanho (Salomon & Maxwell, 2000; Barbas et al., 2013; Najafi et al., 2014; Abella, 2015; Ataman et al., 2014; Masoudi, 2016). Sendo que as técnicas mais empregadas atualmente são a inseminação artificial, transferência de embriões, criopreservação das células espermáticas, fertilização *in vitro*, sexagem de espermatozoides e clonagem (Foote,1999).

A inseminação artificial é o instrumento de melhoramento genético mais utilizado no mundo (Najafi et al., 2014), sendo que os primeiros estudos para verificação de sua eficácia foram realizados em ovelhas no início do século XX por Elias Ivanov (Ivanoff,1922). Essa técnica possibilita a obtenção de um maior número de descendentes, acarretando melhores resultados econômicos aos produtores (Barbas et al., 2013). Sua eficácia foi comprovada com a utilização de sêmen fresco, criopreservado e refrigerado (Salomon e Maxwell, 2000).

A conservação do sêmen é outra biotecnologia da reprodução que foi desenvolvida concomitantemente com a inseminação artificial (Foote, 1999). O armazenamento do sêmen pode ser realizado a médio ou longo prazo, mediante refrigeração ou criopreservação (Câmara e Guerra, 2011).

O sêmen refrigerado apresenta melhores resultados quanto a manutenção de sua fertilidade e, ainda há redução dos danos ocasionados aos espermatozoides, quando



comparado ao sêmen congelado, além de possuir custo mais baixo para a sua obtenção (López-Sáez et al., 2000).

Para a refrigeração do sêmen, realiza-se o seu armazenamento a 5°C, que não inibe completamente o metabolismo espermático (Paulenz, 2002). À medida que aumenta o tempo de armazenamento nessa temperatura, a taxa de danos aos espermatozoides também se eleva, acarretando em diminuição da motilidade espermática e em perda de fertilidade no trato reprodutor da fêmea (Salomon e Maxwell, 2000; Mukherje, 2016). Além do estresse térmico, os espermatozoides de ovinos possuem altas concentrações de fosfolípidos e ácidos graxos poli-insaturados em sua membrana plasmática (Câmara e Guerra, 2011), tornando-os susceptíveis ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, a peroxidação lipídica (Maxwell e Watson, 1996), diminuindo sua viabilidade.

Entretanto, prologar a longevidade dos espermatozoides mediante refrigeração a 5°C é uma alternativa viável, sendo recomendável realizar a inseminação artificial em até 48 horas após sua coleta e diluição (O'hara et al., 2010; Bergsteing- Galan et al., 2016). Uma vez que a diminuição da qualidade do sêmen refrigerado ocorre a partir das primeiras 24 horas de armazenamento (Cardoso et al., 2010).

Na tentativa de reduzir essas conseqüências, recomenda-se a centrifugação e a adição de novo extensor diariamente, para prolongar a capacidade fertilizadora dos espermatozoides (Foste et al., 2011). A troca diária de diluente conserva a mobilidade dos espermatozoides por tempos prolongados, uma vez que o novo substrato fornecerá energia a células espermática e ajudará a manter sua fertilidade por um período prolongado (Verstegen et al., 2005).

Porém, quando se realiza a troca do diluente, é necessária que seja feita de maneira correta, visto que uma inadequada taxa de diluição impacta negativamente nos espermatozoides, ocasionando perda da integridade da membrana espermática, aglutinação de espermatozoides, capacitação e morte. Esse efeito é conhecido como “efeito diluição” (Maxwell e Johnson, 1999).

Diversos autores recomendam uma diluição de 1:4, para a refrigeração d sêmen (Pickett et al., 1975; Gil et al., 1999; Love et al., 2012), para que seja possível o fornecimento de quantidades suficientes de substrato aos espermatozoides, reduzindo, assim, os efeitos deletérios do processo de refrigeração (Samper, 2009).

Estudos prévios realizando a troca diária de diluente no sêmen refrigerado equino demonstrou que é uma prática viável e confiável, e que pode prolongar sua utilização por até 96 horas, sem comprometer a capacidade fertilizadora do sêmen (Love et al., 2012). Sabendo-se da importância da utilização de diluentes quando se submete os espermatozoides ao processo de resfriamento, objetivou-se neste trabalho avaliar o prolongamento da longevidade do sêmen refrigerado ovino por meio da troca diária de diluente, avaliando seus parâmetros espermáticos.

O presente trabalho foi desenvolvido conforme os propósitos estabelecidos e para efeitos didáticos será apresentada na forma de capítulos:

- CAPÍTULO I: Revisão bibliográfica

-CAPÍTULO II: Avaliação dos parâmetros espermáticos *in vitro* por 5 dias mediante a centrifugação diária e ressuspensão de diluente fresco no sêmen ovino refrigerado a 5°C.

## 2 JUSTIFICATIVA

A centrifugação e troca diária do diluente representa uma importante ferramenta para prolongar a viabilidade espermática e aproveitar por mais tempo o material genético de animais geneticamente importantes.

## 3 OBJETIVO GERAL

- Avaliar os efeitos da troca diária de diluente de sêmen ovino refrigerado sobre a longevidade dos espermatozoides.

### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar motilidade, morfologia espermática, concentração e integridade de membrana dos espermatozoides antes e após centrifugação e troca de meio diluidor;
- Determinar o efeito da centrifugação na concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides;
- Determinar o período máximo da viabilidade dos espermatozoides após troca e centrifugação diária do diluente no sêmen refrigerado a 5°C;
- Avaliar o consumo de frutose pelos espermatozoides;
- Dosar as enzimas AST, ALT e LDH no sobrenadante
- Determinar a perda espermática do sobrenadante na troca diária de diluente.

## **CAPITULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### 4.1 Sêmen Refrigerado

O sêmen refrigerado é tema de muitos estudos e vem sendo utilizado com frequência em ovinos (Ivanov, 1922; Maxwell e Watson, 2000), equinos (Love et al., 2012), bovinos (Raseona et al., 2017), caninos (Verstegen et al., 2005) & (Farstad, 1996) e caprinos (Seifi-Jamadi, 2016). Ainda, sua utilização também já foi descrita em dromedários (Wani et al., 2007), raposas (Farstad, 1996), bisões (Vilela, 2016) e cervos (Anel-Lopez, 2016) dentre outras espécies.

O armazenamento do sêmen refrigerado de ovinos pode ser feito em temperaturas entre 0 e 5°C ou 10 e 15° C (Maxwel e Watson, 2000). No entanto, o resfriamento a 5 °C apresenta melhores resultados em termos de fertilidade e redução de danos aos espermatozoides (López-Sáez et al., 2000).

Porém, quando as células espermáticas são armazenadas por períodos prolongados, sob temperaturas próximas a 0°C, essas células sofrem alterações físico-químicas (Maxwell e Watson, 2000) ocasionadas pelo estresse térmico e pelo estresse oxidativo produção de ROS e posterior peroxidação lipídica (Sati e Huszar, 2015) -, que afetam sua motilidade e capacidade de fertilização (Maxwell e Watson 2000). Entres os fatores que influenciam o armazenamento e transporte de sêmen refrigerado, ressaltam-se o número de espermatozoides viáveis por dose inseminante, a frequência de inseminação, o tipo de diluente utilizado com uso ou não de antibiótico e a fertilidade do macho e das fêmeas selecionadas para a reprodução (Brinsko et al.,2000).

Para obter sucesso no armazenamento do sêmen ovino, por períodos curtos, médios e longos, o processo deverá ser capaz de reduzir a atividade metabólica das células espermáticas (Morton et al., 2009; Ataman et al., 2014; Allai, 2015).

Desse modo, o resfriamento do sêmen a 5°C garante à redução na atividade metabólica das células espermáticas durante o processo tudo (Câmara e Guerra, 2011). Ainda, não se submete os espermatozoides ao estrese do congelamento e descongelamento, garantindo, assim, uma maior viabilidade (Rather et al., 2016). É muito importante considerar a composição do meio extensor e a temperatura de armazenamento, para que se obtenha bons resultados na conservação do sêmen ovino (Câmara e Guerra,2011).

Entre as vantagens do processo de refrigeração do sêmen, a principal é redução dos danos produzidos pelo choque térmico, em comparação com os danos irreversíveis causados aos espermatozoides pela criopreservação (Salamon e Maxwell, 1995). Ainda, apresenta melhores resultados em relação a fertilidade, mesmo com um menor número de espermatozoides por dose inseminante (Yoshida, 2000).

Na inseminação artificial utilizando-se sêmen refrigerado, observa-se características favoráveis em relação ao congelado, como uma melhor qualidade do plasma seminal e menor em custos econômicos, sendo mais eficiente quando utilizado a curto prazo (England e Ponzio, 1996).

Desse modo, é de grande importância o prolongamento da fertilidade dos espermatozoides durante os processos de refrigeração e congelamento, que contribuem para as outras técnicas de biotecnologias da reprodução animal e humana e, também, na conservação de espécies (Yoshida, 2000).

alguns efeitos deletérios na célula espermática são causados pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) ou radicais livres, que modificam as proteínas, o DNA, e os lipídios dos espermatozoides (Tortolero et al., 2005). Os radicais livres presentes nos espermatozoides de ruminantes incluem: peróxido de hidrogênio ( $H^2O^2$ ), ânion superóxido ( $O^2$ ), óxido nítrico e radical hidroxila ( $2OH$ ) (Juyena e Stelletta, 2012).

O primeiro parâmetro afetado no sêmen mediante estresse é a motilidade espermática, como resultado da peroxidação lipídica e do estresse oxidativo (Sati e Huszar, 2015). Os espermatozoides danificados e leucócitos são os principais responsáveis pelo acúmulo de ROS no sêmen (Maia e Bicudo, 2009).

É de suma importância a regulação dos níveis de espécies reativas de oxigênio, já que estas desempenham diversas funções nos espermatozoides, como a capacitação espermática, reação acrossômica, ativação da motilidade espermática e estabilização da cápsula na mitocôndria da peça intermediária (Juyena e Stelletta, 2012)

#### **4.2. Diluente para sêmen ovino refrigerado**

O sêmen ovino *in natura* possui uma capacidade fertilizante ótima de 8 horas

(Morrier et al., 2002). Quando os espermatozoides deixam o epidídimo ocorre a interrupção da síntese lipídica e proteica na membrana plasmática, por isso os espermatozoides não sobrevivem por longos períodos (Barrios et al., 2000). Para ampliar a sobrevivência dos espermatozoides, é necessária a adição de meios diluidores que sejam capazes de prolongar sua viabilidade (Versteguen et al., 2005). Fornecendo energia, e atuando como agentes tamponantes e protetores da membrana espermática (Azizunnesa, 2014; Versteguen et al., 2005).

Um excelente diluente deve ser capaz de fornecer às células espermáticas o substrato necessário para a produção de energia, proteção contra as oscilações de temperatura, efeito tampão, amenização das mudanças de pH, manutenção da pressão osmótica, ação contra o crescimento bacteriano e incrementar o volume do ejaculado, para otimizar a capacidade reprodutiva do macho (Salomon e Maxwell, 2000).

Assim, a longevidade dos espermatozoides no sêmen refrigerado é influenciada pela composição do extensor, pela temperatura de armazenamento, pela curva da velocidade do resfriamento, pela exposição ao oxigênio, pela presença ou não de micro-organismos, pelos tipos de antibióticos utilizados no diluente e pela concentração do plasma seminal (Aurich, 2011).

Existem muitos diluentes disponíveis no mercado utilizados para o resfriamento e congelamento do sêmen ovino, entre eles ressaltam-se os extensores a base de glicinogema-leite (GGL) e glicina-gema (GG) (Gonzalez et al., 1999). A seleção correta do diluente torna-se indispensável para prevenir os danos ocasionados pelo processo de refrigeração (Aisen et al., 2000).

A gema de ovo é muito utilizada como ingrediente dos meios diluidores, auxiliando na preservação das células espermáticas, tanto no sêmen refrigerado quanto no sêmen congelado (Manjunath et al., 2000). Esse ingrediente é necessário para o controle das injúrias ocasionadas pelo choque térmico (Bergsteing-Galan et al., 2016), através da redução da perda de enzimas do acrossomo (Maxwell & Watson, 2000) e, ainda, atua como tampão osmótico (Salomon e Maxwell, 1995; Lopes-Zaes et al., 2000; Paulenz, 2002). Sua utilização no meio extensor já foi descrita em várias espécies, como bovinos, ovinos, caprinos e cervídeos (Rehman et al., 2014).

A redução na quantidade utilizada de gema de ovo no meio GGL tem demonstrado melhores resultados após os processos de refrigeração e congelamento do sêmen.

Segundo Rodello et al. (2011), a utilização de Glicina-Gema-Leite 5% (GGL5%) em sêmen ovino criopreservado, fornecem resultados superiores aos diluído em GlicinaGema-Leite 20% (GGL20%).

O meio Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo, com adição ou não de antioxidantes ( $50 \mu\text{Mol}/100 \times 10^6$  espermatozóides de Trolox® e  $50 \mu\text{g/mL}$  - 0,0935 U/mL de Catalase) preserva a integridade do acrossomo por 24 horas durante o processo de resfriamento (Sakashita, 2011).

Sousa (2002) em estudo realizado com ovinos, comparou o meio GGL e o meio Glicose Leite (GL). Foram obtidas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na preservação da integridade de acrossomo após 24 horas de refrigeração com o GGL, devido a presença da gema de ovo no meio.

Foi demonstrado também que o uso de gema de ovo purificada e de extrato de lipoproteínas de baixas densidades no meio extensor GGL, fornece uma efetividade de 48 horas, sem ocasionar injúrias aos espermatozoides (Barbosa et al., 2013). Ainda, Bergstein-Galan et al. (2016) demonstraram que o diluente GGL preservou o vigor espermático, a morfologia espermática e a integridade de membrana espermática por 48 horas.

O meio GGL tem demonstrado melhores resultados quando comparado com outros diluentes, como o meio tris-gema-glicerol. Monrreal et al. (2014) compararam o diluente GGL e o tris, sendo que o extensor tris apresentou maior perda de motilidade, e o GGL apresentou valores significativos de vigor espermático.

Cunha & Lopez (2000) compararam dois meios a base de glicose e leite (G1) e glicina e gema (G2), com sêmen fresco de cães (G3). Foi demonstrado que a utilização dos diluentes melhoram a viabilidade dos espermatozoides por 72 horas, e ainda, produzem menores lesões de membrana espermática (20,75% G1, 22,5% G2 e 66,5% G3), quando comparados ao G3.

Foi verificado também a eficácia do leite de cabra, acrescentado no meio GGL, demonstrando que o mesmo fornece resultados insatisfatórios após o descongelamento das amostras (Silva e Moreal, 2015), devido a desidratação excessiva ocasionada pelo desenvolvimento de um meio isotônico (Merymann et al., 1977).



### 4.3. Efeitos da centrifugação e taxa de diluição

A centrifugação das células espermáticas atua como uma alternativa para reduzir o volume e o número de espermatozoides utilizados por dose inseminante (Freitas, 2014). Essa técnica é recomendada para que seja realizada a remoção do plasma seminal quando se deseja utilizar o ejaculado depois de 48 horas (Miro et al., 2009).

Nas espécies domésticas, a retirada ou não do plasma seminal é um assunto extremamente delicado, uma vez que alguns estudiosos recomendam a retirada total do plasma seminal, e outros recomendam a retirada e posterior adição de 10% do plasma seminal durante o armazenamento após 24 horas (Love et al., 2012).

A centrifugação acarreta numa melhora dos parâmetros de motilidade progressiva no sêmen equino quando diluído no meio INRA96® (Riccio et al., 2016). Porém, esse processo pode ocasionar danos aos espermatozoides, além de aumentar a perda do número de espermátzoides (10 a 30%). Desse modo, deve-se considerar a força de centrifugação, temperatura, o diluente utilizado, e o volume do sobrenadante (Jasko et al., 1991; Riccio et al., 2016).

Segundo Busato et al. (2017), a centrifugação do sêmen ovino a 2900 r.p.m não ocasionou dano significativo nas células espermáticas, e obteve-se uma perda espermática de 35,4 milhões/ml, através da adição da gema de ovo ao meio GGL. Estes achados são contraditórios para Pickett et al. (1975), que relataram que a gema de ovo adicionada foi prejudicial aos parâmetros de fertilidade do sêmen bovino e equino.

A força de centrifugação e o período de tempo que as células espermáticas são submetidas podem afetar a integridade da membrana espermática. Foram testadas três forças de centrifugação (600 g, 800 g e 1000 g) e três tempos (3 min, 5 min e 10 min) para avaliar seus efeitos sobre os espermatozoides de equinos, encontrando-se que a centrifugação com força de 600 g durante 10 minutos é a melhor opção, para se manter a viabilidade dos espermatozoides (Dell' aqua et al., 2001).

Em cães, quando comparou-se diferentes forças de centrifugação (180 g, 720 g, 1620 g, 2880g), a menor força de centrifugação apresentou maior perda de espermatozoides (8,9%, 2,3%, 0,4%, 0,006% respectivamente), recomendando o protocolo de 720 g por 5 min (Rijsselaere et al., 2002).

Em sêmen caprino, foi comparado duas forças de centrifugação no sêmen (600xg e 1200xg), e não se demonstrou efeitos deletérios na integridade estrutural dos espermatozoides. Isto pode ser explicado devido a uma quantidade considerável de lipídios na membrana dos espermatozoides dessa espécie (Crespilho et al.,2018).

A velocidade da centrifugação também foi estudada, demonstrando-se que quando se utiliza diferentes gradientes de centrifugação no sêmen refrigerado equino, obtém-se uma perda espermática de 7,4% por dia. Conclui-se então que o aumento da velocidade na centrifugação reduz a perda espermática no sobrenadante (Hoogewijs et al., 2010).

Shekarriz (1995) relata que a centrifugação do sêmen humano aumentou a produção de ROS, ocasionando diminuição da MP em função do tempo de armazenamento. Porém, em estudos recentes, descreveu-se que a centrifugação é benéfica para o prolongamento da sobrevivência do sêmen refrigerado, devido a eliminação do plasma seminal, que se torna prejudicial para a célula espermática durante o armazenamento (Love et al.,2012).

Foi observado em sêmen equino, que o grupo com adição de 10% de plasma seminal obteve maior integridade de membrana espermática ( $p < 0,05$ ) e melhor proteção de acrossomo ( $p < 0,05$ ), quando comparado ao grupo com adição de 50% de plasma seminal (Love et al., 2012).

As taxas de diluição 1:4 e 1:8, independente do extensor utilizado na espécie equina, melhora os índices de motilidade espermática (Pickett et al.,1975). De acordo com Love et al. (2012), a diluição 1:4 ajuda a prolongar a utilização do sêmen equino por 96 horas, diferente de uma diluição maior que 1:9, que compromete o volume das doses inseminantes. Do mesmo modo, foi demonstrado que taxa de diluição 1:2 aplicada em sêmen equino e bovino antes da centrifugação, não confere o efeito protetor esperado para os espermatozoides (Pickett et al., 1975).

#### **4.4. Troca de diluente**

Na espécie ovina, o volume do ejaculado é relativamente pequeno e sua concentração espermática é alta, necessitando ser diluído para fracionar e armazenar o ejaculado (Maia et al., 2011).

A diluição do sêmen permite a amenização da presença de componentes tóxicos presentes no plasma seminal, o aumento da fertilidade devido aos nutrientes presentes no meio diluidor e a diminuição da contaminação bacteriana devido ao uso de antibióticos (Samper,2009).

O armazenamento do sêmen refrigerado é considerado a melhor biotecnologia da reprodução em termos de fertilidade, quando utilizado a curto e médio prazo (Verstegen et al., 2005). Podé ser utilizado em até 48 horas para inseminação artificial, sem o comprometimento dos índices de fertilidade (Bergstein-Galan et al.,2016).

O declínio da qualidade espermática e fertilidade ocorre por diversos fatores que ainda não estão bem esclarecidos, sendo que os principais fatores mencionados para sua ocorrência são a redução da disponibilidade de substrato, o acúmulo de metabólitos durante o armazenamento e as alterações de pH e osmolaridade (Verstegen et al., 2005; Love et al.,2012). Ainda, alguns autores relatam a influência da presença de plasma seminal durante o armazenamento do sêmen fresco e refrigerado (Love et al., 2005; Love et al., 2010).

Segundo Cordova-Izquierdo et al. (2008), o armazenamento do sêmen refrigerado também pode acelerar o processo de maturação das membranas espermáticas, levando a um aumento considerável de espermatozoides capacitados com uma reação acrossômica positiva (Salomon e Maxwell, 2000; O'hara et al., 2010).

Para que se obtenha a manutenção da viabilidade dos espermatozoides, é necessário um ambiente iônico adequado (Nishigaki et al.,2014). Verstegen et al. (2005) mencionam que o declino dos parâmetros espermáticos ocorre por que o meio torna-se inapropriado em períodos prolongados de refrigeração. Desse modo, alguns autores recomendam a centrifugação e a ressuspensão diária do extensor para prolongar a longevidade dos espermatozoides, obtendo-se uma expansão do seu uso por até 96 horas em equinos (Love et al.,2012), e até 11 dias em caninos, sem comprometer a qualidade e fertilidade do sêmen (Verstegen et al., 2005).

A longevidade dos espermatozoides diluídos está correlacionada com a concentração espermática, uma vez que um sêmen altamente concentrado precisa de uma taxa de diluição maior. Ao agregar suficiente quantidade de extensor a uma amostra de sêmen altamente concentrada, ocorre a redução dos efeitos prejudiciais do plasma seminal, além de moderar a produção de metabólitos liberados pela atividade dos espermatozoides metabolicamente ativos (Samper, 2009).

Os fatores pelos quais a troca de diluente torna-se benéfica para os espermatozoides deve-se a adição de açúcar, gema de ovo fresca e a eliminação do substrato velho, além dos produtos degradados pelos espermatozoides (Verstegen et al., 2005). As lipoproteínas de baixa densidade (LBD), presentes na gema de ovo ajudam a conservar a integridade do acrossomo e a motilidade dos espermatozoides (Salamon e Maxwell, 2000; Lopez-Záes et al., 2000; Paulenz, 2000).

Busato et al. (2017) demonstrou que a troca diária e ressuspensão de novo diluente por 120 horas acarretou numa melhora dos índices de motilidade progressiva, motilidade total e o vigor espermático, quando comparado ao grupo controle, no sêmen ovino refrigerado. Esses resultados corroboraram com os encontrados por Quinn et al. (1980), que ao adicionar fosfolípidos ao sêmen bovino, conferiu uma proteção aos espermatozoides.

Com a centrifugação e ressuspensão de novo diluente, prolonga-se a integridade de DNA por 4 dias em sêmen de equinos, além de preservar a motilidade espermática (Love et al., 2012). A PM reduz cerca de 30% durante o período de 0 a 72 h de armazenamento, quando não é realizada a centrifugação e a troca de meio do sêmen. Já no sêmen que se realiza a centrifugação e ressuspensão em diluente fresco, ocorre redução de somente 18% da PM, durante o mesmo período (Riccio et al., 2016).

Kiser et al. (2014), obtiveram também melhores valores de TM e VCL após a centrifugação e ressuspensão do sêmen fresco por 96 horas. Na espécie canina a centrifugação e ressuspensão de diluente fresco preservou a integridade do acrossomo por 72 horas, encontrando-se valores de 5% (Rijsselaere et al., 2002).

Em jumentos, foi reportado que a centrifugação e as taxas de diluições maiores com a remoção total do plasma seminal conservaram por período maior a viabilidade dos espermatozoides (Miro et al., 2009). Porém, a centrifugação e ressuspensão de novo diluente com 0% e 5% de plasma seminal durante 72 horas de armazenamento, acarretou numa motilidade espermática melhor (59,53% e 62,81%, respectivamente), quando comparado ao grupo controle (57,81%), na raça árabe equina (El-Badry et al., 2013).

Em contrapartida, num estudo realizado com suínos selvagens, foi relatado que após a centrifugação e troca diária de diluente, os danos ocasionados aos espermatozoides foram maiores que no grupo controle, e os parâmetros espermáticos (PM, VSL, VAP, VCL e BCF) foram melhores no grupo controle (Bury et al., 2017).

#### **4.5. Fatores bioquímicos no armazenamento de sêmen**

A diversidade de enzimas presentes no plasma seminal e nas células espermáticas do sêmen de animais domésticos, são bons indicadores da funcionalidade e fertilidade dos espermatozoides (Katila, 2001). Quando o sêmen é submetido ao armazenamento prolongado durante o processo de refrigeração, ocorre um aumento da porcentagem de danos à membrana espermática, o que leva à perda da função metabólica e enzimática dessas células (Bansal e Bilaspuri., 2011).

O armazenamento do sêmen induz a uma desestabilização das células espermáticas, devido a reorganização dos lipídeos na membrana, o que acarreta em alterações estruturais nas enzimas (Petrunkina et al., 2007).

##### **4.5.1. Enzima Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT)**

As transaminases AST/ALT são utilizadas como indicadores da estabilidade da membrana espermática. Existe uma correlação entre o aumento de espermatozoides anormais e dessas enzimas (Gündogan., 2006). Sabe-se que a enzima AST é essencial para os processos metabólicos do espermatozoide, promovendo energia para sua sobrevivência, motilidade e posterior capacidade de fertilização (Turner et al.,2003).

Quando é observado um aumento na concentração das enzimas AST e ALT, pode-se correlacionar com o aumento de injúrias causadas aos acrossomo dos espermatozoides (Tejaswi et al.,2016). Ainda, a motilidade espermática decai à medida que estas enzimas aumentam no diluente (Azawi et al.,1990).

##### **4.5.2. Enzima Lactato Desidrogenase LDH**

Para que ocorra a movimentação espermática, é necessário a presença de energia, que é obtida a partir do trifosfato de adenosina (ATP). A presença desse nucleotídeo é fundamental para que seja possível manter uma alta taxa energética por

tempos prolongados, induzindo a capacitação e hiperatividade da célula espermática (Peña et al.,2009).

A primeira enzima glicolítica descoberta em células espermáticas foi a Lactato Desidrogenase (LDH) (Adeva et al.,2013). Essa enzima é encontrada no citosol e na mitocôndria da célula espermática (Burgos et al., 1995; Juyena e Stelletta, 2012). Possui como principal função a metabolização da conversão de piruvato em lactato, mediante a oxidação ou redução simultânea de NADH a NAD<sup>+</sup>, componentes fundamentais para a produção contínua de ATP, mediante via glicolítica (Goldberg et al., 2010; Wang et al., 2013).

A Lactato Desidrogenase possui cinco isoenzimas, cada uma com quatro subunidades (González & Silva, 2017). A LDH-C é uma isoenzima específica composta por quatro subunidades C (C<sub>4</sub>), sendo encontrada nos testículos de humanos e animais domésticos (Adeva et al.,2013).

Muradas et al. (2013) mencionam que a LDH está altamente correlacionada com a motilidade espermática e com o número de espermatozoides vivos. Em estudo realizado por Pesch et al. (2006), observou-se uma correlação positiva entre o número de células espermáticas vivas com a motilidade progressiva e as concentrações de LDH. Conclui-se que a presença de LDH intracelular garante metabolismo espermático (Paoli et al.,2011).

#### **4.5.3. Frutose**

A frutose é um carboidrato simples, que está presente no sêmen dos animais domésticos. Além desse açúcar, os espermatozoides de ovinos também conseguem assimilar outros açúcares, quando estes são adicionados em diluentes, como a glicose e a manose (Salomon e Maxwell, 2000). No entanto, a frutose é o substrato primeiramente metabolizado na glicólise do plasma seminal de ovinos (Purdy et al., 2000).

Na ausência de oxigênio, a frutólise anaeróbia permite a sobrevivência das células espermáticas e, conseqüentemente, o aumento de sua longevidade (Mann & Lutwak-mann, 1948). Este monossacarídeo é produzido especificamente nas

vesículas seminais dos bovinos, ovinos e suínos selvagens (Mann & Lutwak-mann, 1948; Mann, 1981).

O plasma seminal contém uma série de substratos disponíveis (Juyena & Stelletta., 2012). Quando agregasse mais frutose aos espermatozoides armazenados, provoca-se um aumento na oxigenação como consequência do esgotamento de substrato consumido por essas células, ocasionado por um aumento na taxa fermentável da frutose (Mann., 1983). O espermatozoide de ovinos metaboliza em média uma taxa de 1,5 a 2 mgmg frutose /10<sup>9</sup> S por hora a 37° C, conhecido como índice de frutólise (Mann 1983; Cannas, 1986).

Flores et al. (2010) recomendaram a utilização de frutose e glicose como substratos energéticos, com o intuito de aumentar a motilidade espermática durante o armazenamento de sêmen refrigerado. Ainda nesse estudo, foi mencionado alguns açúcares que podem atuar como agentes protetores da membrana espermática como a trealose. De acordo com Yildiz et al. (2000), os açúcares também ajudam na regulação da pressão osmótica e proteção da membrana das células espermáticas contra o choque térmico. Dentre estes, a lactose e a sacarose destacam-se como os mais estudados contra os danos na membrana espermática durante o armazenamento do sêmen refrigerado (Salomon & Maxwell, 2000).

Quando ocorre um aumento no consumo de frutose pelos espermatozoides, o consumo de Ca<sup>+2</sup> aumenta simultaneamente (Barnabe et al., 1993). Abdel-Rahman et al. (2000) determinaram um efeito positivo entre o número de células espermáticas vivas e os níveis altos de Ca<sup>+2</sup> e K<sup>+</sup>, sugerindo que estes minerais auxiliam em uma maior permeabilidade dos espermatozoides.

A glicose pode ser metabolizada ou transformada para produzir frutose, e ser utilizada especificamente pelos espermatozoides para sua movimentação. Esta via metabólica é exclusiva para os espermatozoides como mecanismo de reserva, evitando que outras células utilizem este substrato energético (González e Silva, 2017). Os espermatozoides ovinos também podem utilizar o sorbitol como fonte de substrato para produzir frutose através da enzima sorbitol desidrogenase (Juyena e Stelletta, 2012).

## 5. REFERÊNCIAS

ABELLA, D.F.; DA COSTA, M.; GUÉRIN, Y.; et al. Fertility of undiluted ram epididymal spermatozoa stored for several days at 4°C. **The Animal Consortium**, v. 9, n.2, p.313319, 2015.

ABDEL-RAHMAN, H.; EL-BELELY, M.S.; AL-QARAWI, A.A.; et al. The relationship between semen quality and mineral composition of semen in various ram breeds. **Small Ruminant Research**, v.38, p. 45– 49, 2000.

ADEVA, M.; GONZÁLEZ-LUCÁN, M.; SECO, M.; et al. Enzymes involved in L-lactate metabolism in humans. **Mitochondrion**, v.13, p. 615–629,2013.

AISEN, E.; ÁLVAREZ, H.; VENTURINO, A.; et al. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. **Theriogenology**, v.53, p.1053-1061, 2000.

ALLAI, L.; DRUART, X.; CONTELL, J.; et al. Effect of argan oil on liquid storage of ram semen in Tris or skim milk-based extenders. **Animal reproduction science**, v. 160, p. 57–67, 2015.

ANEL-LÓPEZ, L.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; PARRILLA, I.; et al. Effect of sex-sorting and cryopreservation on the post-thaw sperm quality of Iberian red deer spermatozoa. **Theriogenology**, v.1, p. 2-38,2016.

AQUINO, R.S.; LEMOS, C.G.; ALENCAR, C.A.; et al. The reality of sheep and goat production in Brazilian Semiarid: a picture of Araripe Sertão, Pernambuco. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 10, n.4, p. 271-281, 2016.

ATAMAN, M.B.;\_BUCAK, M.N.; ÇOYAN, K. Esterified glucomannan improves aflatoxininduced damage of sperm parameters during liquid storage of ram semen at 5°C.**Cryobiology**, p.1-6,2014.

AURICH, C. Semen Extenders for Cooled Semen (Europe). In: McKinnon A, Squires EL, Vaala W, Dickson DV, editors. **Equine Reproduction**. 2nd ed. New Jersey: WileyBlackwell.p.1336-1340, 2011.



AZAWI, O.O.; ZNAD, M.MAL-JARRAH, L.H. The Correlation between the Viability of Bovine Spermatozoa Preserved at Ambient Temperature and the Activity of Transferases. **Animal Reproduction Science**, v. 22, p. 319-323, 1990.

AZIZUNNESA.; ZOHARA, B, F.; BARI, F.Y.; et al. Effects of Proportion of Egg Yolk and Preservation Time on Chilled Semen from Indigenous Rams. **STF International Journal of Veterinary Science**, v.1, n.1, p. 18-26, 2014.

BANSAL, A.K.; BILASPURI, G.S. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. **Veterinary Medicine International**, p.7, 2011.

BARBAS, J.P.; HORTA, A.E.M.; MARQUES, C.C.; et al. The fertility increase after misoprostol administration is differently expressed when sheep are inseminated with chilled or frozen-thawed semen. **Small Ruminant Research**, v. 113, p. 398-401, 2013.

BARNABE, R.C.; BARNABE, V.H.; OLIVEIRA, C.A.; et al. Biochemical study of semen of buffaloes. I. determinations of fructose. Calcium, got and gpt. **Brazil Journal veterinary Research animal Science**, v. 30, n. 1, p. 43- 1993.

BARRIOS, B.; PÉRES-PÉ, R.; GALLEGO, M.; et al., Seminal Plasma Proteins Revert the Cold-Shock Damage on Ram Sperm Membrane. **Biology of Reproduction**, v. 63, p.1531–1537, 2000.

BERGSTEIN-GALAN, T.G.; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.E.; et al. Espermatozoides epididimários: refrigeração e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.41, n.3, p.659-664, 2017.

BERGSTEIN-GALAN, T.G.; WEISS, R.R.; BERTOL, M.A.F.; et al. Comparação de três métodos de refrigeração do sêmen ovino pelo período de 24 e 48 horas. **Archives of Veterinary Science**, v.21, n.4, p.66-73, 2016.

BRINSKO, S.P.; CROCKETT, E.C.; SQUIRES, E.L. Effects of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. **Theriogenology**, vol.54, p.129-136,2000.

BURGOS, C.; MALDONADO, C.; GEREZ DE BURGOS, N.; et al. Intracellular Localization of the Testicular and Sperm-Specific Lactate Dehydrogenase Isozyme C4 in Mice. **Biology of reproduction**, v.53, p. 84-92, 1995.

BURY, O.; MCERA, V.; LEN, J.; et al. Effects of centrifugation and removal of seminal plasma on motility of fresh boar sperm. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**, v.47, n, 4, p. 557-562,2017.

BUSATO, E.M.; ABREU, A.C.M.R.; BERSGSTEIN, T.G.; et al. Efeitos da troca diária de diluente sobre a longevidade do sêmen ovino refrigerado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.369, 2017.

CÂMARA, D.R.; GUERRA, M.M.P. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.1, p.33-40,2011.

CANNAS, S.J.M. Fisiologia da reprodução dos ungulados domésticos. **Fundação calosute gulbenkian**. Lisboa.1ed. p.179-236, 1984.

CARDOSO, J.F.S.; PAULA, N.R.O.; UCHOA, D.C; et al. Diferentes concentrações de gema de ovo na qualidade do sêmen canino diluído em ACP®-106 e resfriado a 4 °C. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n.2, p. 146-152, 2010.

CÓRDOVA-IZQUIERDO, A.; CÓRDOVA-JIMÉNEZ, M.S; CÓRDOVA-JIMÉNEZ, C.A.; et al. Procedures to increase the reproductive potential in sheep and goat. **Revista veterinaria**.v.19, n. 1, p. 67–79, 2008.

CRESPILHO, A. M.; BOSCO, K.Á.; DELL'AQUA, C.P.F.; et al. Can centrifugation force compromise the plasmatic membrane, acrosome and DNA integrity of goat spermatozoa?. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 55, n. 3, p. 1-11, 2018.

CUNHA, I. C. N.; LOPES, M. O. Estudo da viabilidade do processo de refrigeração do sêmen canino, utilizando-se diluidores à base de leite e glicina gema. **Revista educação contínuos, CRMV-SP**. São Paulo, v.3, n.1, p. 37-42, 2000.

DELL" AQUA JR, J.A.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; et al. Effect of centrifugation and packing system on sperm parameters of equine frozen semen. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p.324-325, 2001.

EL-BADRY, D.; RAWASH, Z.M.; EL-BAKHMAY, A.S. Effect of centrifugation, resuspension and concentration of re-added seminal plasma on the quality of cooled stored and frozen-thawed Arabian horse semen. **Journal Egypt Veterinary Medicine Association**.; v.73, p. 139 – 153, 2013.

ENGLAND, G.C.W.; PONZIO, P. Comparison of quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. **Theriogenology**, v.46, p. 165-171, 1996.

FAO. Outlook Alimentos. Biannual Report on Global Food Markets. Food and **Agriculture Organization of the United Nations**, p.1-132, 2016.

FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dog and foxes. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n .25, p. 1-260, 1996.

FREITAS, A. C. F. de. Avaliação do sêmen de carneiros submetido à reconcentração por centrifugação da palheta pós-descongelamento. 2014. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

FOOTE, R.H. Development of Reproductive Biotechnologies in Domestic Animals from Artificial Insemination to Cloning: A Perspective. **Cloning**, v.1, n 3, p.133-142, 1999.

FOSTER, M.L.; VARNER, D; D.; HINRICHS, K.; et al. Agreement between measures of total motility and membrane integrity in stallion sperm. **Theriogenology**, v.75, p.1499 –505, 2011.

GASSNER, F.X.; HILL.H.J. SULZBERG, B.A. Relationship of Seminal Fructose to Testis Function in the Domestic Animal. **Fertility & Sterility**, v.3, n.2, p.121-143, 1952.

GIL, J.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. **Theriogenology**, v.54, p.93-108, 2000.

GOLBERG, E.; EDDY, E.M.; DUAN, C.; et al. Idhc the ultimate testis specific gene.

**Journal Andrology**, v.31, n.1, p. 86–94,2010.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária. Porto Alegre: UFRGS, p.179- 198.2017.

GUNDOGAN, M. Some reproductive parameters and seminal plasma constituents in relation to season in Akkaraman and Awassi Rams. Turk. **Journal Veterinary Animal Science**, v. 30, p. 95-100, 2006.

HOOGEWIJS, M.; RIJSSELAERE, T.; DE VliegHER.; et al. Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation. **Theriogenology**, v.74, p.118126,2010.

IBGE. Produção da Pecuária Nacional. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**,v.43,p.1-49,2015.Disponivei em: [http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2015\\_v43\\_br.pdf](http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf)> Acesso em: 13/04/ 2017.

IVANOFF, E. I. On the Use of Artificial Insemination for Zootechnical Purposes in Russia. **Journal of Agriculture Science**, Vol. 12, p.244-256, 1922.

JASKO, D.J; HATHAWAY, J.A.; SCHALTENBRAND, D.; et al. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology V**,3, P.1241-1252, 1992

JUYENA, N.S. Protein profiles and biochemical characteristics of semen: influence on frozen-thawed spermatozoal quality in rams (*ovis aries*) and alpacas (*vicugna pacos*). 2012. Pádua 28 f. Dissertação de Doutorado, Università Degli Studi di Padova, Scienze Cliniche Veterinarie.

JUYENA, N.; STELLETA, C. Seminal Plasma: An Essential Review Attribute to Spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 33, No. 4, p. 536-551, 2012.

KATILA, T. In vitro evaluation of frozen-thawed Stallion Semen: a review. **Acta Veterinaria Sacandinavica**, v.42, n.2, p. 199-217, 2001.

KISER, A.M.; BRINSKO, S.P.; LOVE, C.C.; et al. Relationship of Sperm Quality to Fertility after 4 Days of Cooled Storage of Equine Semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, p.602-605, 2014.

LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.L.; et al. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. **Theriogenology** v.63, p.1584–9, 2005.

LOVE, C.C.; THOMPSON, J.A.; BRINSKO, S.P.; et al. Effect of inter-stallion seminal plasma variability on motility, viability, and DNA integrity of cauda epididymal sperm. **Animal Reproduction Science** 2010.

LOVE, C.C.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D, et al. Effect of daily semen centrifugation and resuspension on the longevity of equine sperm quality following cooled storage. **Theriogenology**, v. 77, p.1911-1917, 2012.

LÓPEZ-SÁEZ. A.; ORTIZ, N.; GALLEGOS, L, et al. Liquid storage (5°C) of ram semen in different diluents. **Archive of Andrology**, v.44, n.2, p.155-164, 2000.

MAHMUDA, B.B.A.; AZIZUNNESA.; ZOHARA, B.F, et al. Effect of preservation time on the quality of frozen semen in indigenous rams BBA. **Bangladesh journal of Animal Science**, v. 44, n.1, p. 10-15, 2014.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.4, p.183-193, 2009.

MAIA, M.S.; MEDEIROS, I.M.; LIMA, C.A.C. Características reprodutivas de carneiros no Nordeste do Brasil: parâmetros seminais. **Revista Brasileira Reprodução Animal.**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.175-179, 2011.

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; et al. 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.

Mann, T. Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.37, p.179-188, 1974.

MANN, T. Fructose content and fructolysis in semen. Practical application in the evaluation of semen quality. **Journal agricultural Science**, v. 38, p. 323, 1948.

MANN T. Studies on the metabolism of semen: 3. Fructose as a normal constituent of seminal plasma. Site of formation and function of fructose in semen. **Biochemical Journal**, v.40, n.4, p.481–491, 1946.

MANN, T. 1964. The biochemistry of semen and of the male reproductive tract. Methuen and Co., Ltd., London.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. aerobic and anaerobic utilization of fructose by spermatozoa and seminal vesicles. Studies on the metabolism of semen. **Journal agricultural Science**, v.43, p.266-270, 1948.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Male Reproductive Function and Semen 1st edition. **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, New York, p.477, 1981.

MASOUIDI, R.; SHAHNEH, A.Z.; TOWHIDI, A, et al. Fertility response evaluation of artificial insemination methods in sheep with fresh and frozen-thawed semen. **Cryobiology**, v. 11, n.12, p. 1-19, 2016.

MAXWELL, W.M.C; E JOHNSON, L. A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: The influence of seminal plasma. **Theriogenology**, vol.52, n.8, p. 1353 – 1362, 1999.

MAXWELL, W.M.C.; SALOMON, S. Liquid Storage of Ram Semen: A Review. **Reproduction and Fertility Development**,v. 5,p. 613-38,1993.

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

MERYMAN, H. T.; WILLIAMS, R. J.; DOUGLAS, M. S. Freezing injury from “solution effects” and its prevention by natural or artificial cryopreservation. **Cryobiology**, v.14, p. 287 – 302, 1977.

MEYERS, S.A. Sperm Physiology. In; Samper, J.C editor. Equine breeding management and artificial insemination, second edition. St. Louis, Missouri; **Saunders- Elsevier Inc**, cap.5, p.47-55, 2009.

MIRÓ, J.; TABERNER, E.; RIVERA, M.; et al. Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalanian donkey semen. **Theriogenology**, v.72, p.1017–1022,2009.

MONRREAL, A.C.D.; LIMA, N.N.; DE SOUZA, A.S.; et al. Glicina Gema Leite para criopreservação de sêmen de carneiros sem raça definida. **Agrarian**, v.7, n.23, p.124131, 2014

MORTON, K.M.; GIBB, Z.; BERTOLDO, M.; et al. Effect of diluent, dilution rate and storage temperature on longevity and functional integrity of liquid stored alpaca (*Vicugna pacos*) semen. **Journal of Camelid Science**,v. 2,p. 15-25, 2009.

MUKHERJEE, K.P.; BASU, S.; SAHOO, A.K.; et al. Cryoprotective effect of EDTA, lactose, ascorbic acid and L-cysteine as additives on garole ram (*Ovis Aries*) semen. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, v.3, n.7, p.9298, 2016.

MURADAS, P. R.; WEISS, R. R.; KOZICKI, L. E. Avanço na avaliação espermática de equinos: revisão. **Revista Acadêmica Ciências Agrária Ambiental**, Curitiba, v. 11, n. 3, p. 299-313, 2013.

NAJAFI, G.; CEDDEN, F.; KOHRAM, H., SHARIF, A.A. The Effects of Using Artificial Insemination Techniques on Reproductive Performance in Ghezel Sheep. **International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research**, v. 2, n.12, p. 2898-2904, 2014.

NISHIGAKI, T.O.J; GONZÁLES-COTA, A.L.; ROMERO, F.; et al. Intracellular pH in sperm physiology. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.450, p.1149–1158, 2014.

O'HARA, L.; HANRAHAN, J.P; RICHARDSON, L.; et al. Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. **Theriogenology**, v. 73, p. 541-549, 2010.

PAOLI, D.; GALLO, M.; RIZZO, F.; et al. Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. **Fertility Sterily**, v.95, n,7: 2315–2319,2011.

PAULENZ, H.; SODERQUIST, L.; PEREZ-PE, R, et al. Effect of different extender and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. **Theriogenology**, v.57, n.1, p. 823-836, 2002.

PEÑA, F.J.; MARTINEZ, H.R.; TAPIA, J.A.; et al. Mitochondria in Mammalian Sperm Physiology and Pathology: A Review. **Reproduction In Domestic Animal**, v.44, p. 345–349, 2009.

PESCH, S.; BERGMANN, M.; BOSTEDT, H. Determination of some enzymes and macro and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. **Theriogenology**, v.66, p. 307-313, 2006.

PETRUNKINA, A. M.; HARRISON, R.A.; TSOLOVA, M.; et al. Signalling pathways involved in the control of sperm cell volume. **Reproduction**, v, 133, p. 61–73, 2007.

PIAGENTINI, M.; SILVA, D.C.; DELL AQUA, C.P.F, et al. Effect of selenium supplementation on semen characteristics of Brazil's ram. **Reproduction in domestic Animals**, v.1.p.1-4, 2017.

PICKETT, B.W.; SULLIVAN, J.J.; BYERS, W.W.; et al. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. **Fertility and Sterily**, v.26:167-174, 1975.

PICKETT, B. W.; BWASH, L.D; VOSS, I.L.; et al. Effect of seminal extenders on equine fertility. **Journal of animal science**, v.40, n.6, p.1136-1143, 1975.

PURDY, P.H. The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48h at 5°C prior to cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 93, p. 114–123, 2006.



PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant and Research**, v. 63, p.215–225, 2006.

QUINN, P.J.; CHOW, P.Y.W.; WHITE, I.G. Evidence that phospholipids protect ram spermatozoa from cold shock at the plasma membrane site. **Journal of Reproduction Fertility**, v.60, p.403-407, 1980.

RASEONA, A.M.; AJAO, O.A.; NETHENGWE, L.D, et al. Viability of bull semen extended with commercial semen extender and two culture media stored at 24 °C. **South African Journal of Animal Science**, v. 47, n. 1, p.51-55, 2017

RATHER, H.A.; ISLAM, R.; MALIK, A.A, et al. Addition of antioxidants improves quality of ram spermatozoa during preservation at 4°C. **Small Ruminant And Research.**, v.6, n.7, p. 1-8, 2016.

RICCIO, N.; ELLERBROCK, R.E.; CANISSO, I.F.; et al. Motility of Stallion Spermatozoa after Centrifugation and Cooling in INRA96® or Walworth Extender. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v.6, p.143-147, 2016.

RIETMAN, S.; FRANKEL, S. A. colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. **American Journal of Clinical Pathology**, v.28, n.1, p.56-63, 1957.

RIJSSELARAE, T.; VAN SOOM, A.; MAES, D.; et al. Effect of centrifugations on invitro survival on fresh dilueted canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.57, p.16691681,2002.

RODELLO, L.; BICUDO S.D.; FALLEIROS, B.M.; et al. Implicações da redução na concentração de gema de ovo no meio glicina-gema-leite sobre a cinética, morfologia e integridade de membranas espermáticas em sêmen ovino crio preservado. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18(2), p. 239-248, 2011.

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

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.

SAMPER, J.C. Breeding with Cooled Transported Semen. In: McKinnon A, Squires EL, Vaala W, Dickson DV, editors. **Equine Reproduction**. 2nd ed. New Jersey: WileyBlackwell. ; 1316, 2011.

SAMPER, J.C. Artificial insemination with fresh and cooled semen. In; Samper, J.C editor. Equine breeding management and artificial insemination, second edition. St. Louis, Missouri; **Saunders- Elsevier** Inc, cap.14, p.165-1745,2009.

SAKASHITA, S.M. Efeito da adição de Trolox® e Catalase ao meio Glicina Gema-Leite sobre o sêmen caprino refrigerado por 24 ou 48 horas em sistema de Equitainer®. 2011. Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

SATY, L.; HUSZAR, G. sperm motility and viability: overview of the cellular and physiological aspects that support these functions. **European medical journal reproduction**, v,1, n.1, p.74-80, 2015.

SHEKARRYZ, M.; DE WIRE, D.M; THOMAS, A.J.; et al. A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by Reactive Oxygen Species. **European Urology**, v.28, p.31-35,1995.

SILVA, E. C. B.; GUERRA, M. M. P. Sondas fluorescentes: um avanço na avaliação da integridade estrutural e funcional de espermatozoides. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 11, n. 2, p. 162-169, 2012.

SOUSA, D.B. Viabilidade do sistema Equitainer® na refrigeração do sêmen ovino avaliado pelas análises computadorizada, de microscopia epifluorescente e inseminação artificial. Botucatu, 2002. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).

TEJASWI, V.; SWAMY, N.; YATHIRAJ, M.; et al. Enzymatic Activities in Fresh Seminal Plasma and Extended Refrigerated Semen in Nari Suvarna Rams. **Theriogenology Insight**, v.6, n.1, p.27-33,2016.

TORTOLERO, I.; ARATA-BELLABARBA, G.; OSUNA, J.A.; et al. Estrés oxidativo y función espermática. Revisión. **Revista Venezolana de Endocrinología Metabolica**, v. 3, n.3, p. 12-19, 2005.

TOSIC J. Mechanisms of hydrogen peroxide formation by spermatozoa and the role of amino acids in sperm motility. **Nature London**, v. 159, n.1, p 544, 1947.

TURNER, R.M.; MCDONNELL, S.M. Alkaline phosphatase in stallion semen: Characterization and clinical applications. **Theriogenology**, v. 60, n.1, p. 1-10, 2003.

VERSTEGEN, J.P.; ONCLIN, K.; IGUER-OUADA. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris–glucose extender: In vitro and in vivo studies. **Theriogenology**, v.64, p. 720-733,2005.

VILELA, C, G.; MARQUEZ, J.M.; GRAHAM, J.K, et al. Cryopreservation of bison epididymal sperm; a strategy for improving post-thaw quality when collecting sperm in field conditions. **Theriogenology**, v.1, p. 1-21,2016.

WANG, D.; WEI, L.; WEI, D., et al. Testis-specific lactate dehydrogenase is expressed in somatic tissues of plateau pikas. **FEBS Open Biology** ,v. 3,p. 118–123,2013.Disponivel em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fob.2013.01.011>

WANI, N.A.; BILLAH, M.; SKIDMORE, J.A. Studies on liquefaction and storage of ejaculated dromedary camel (*Camelus dromedarius*) semen. **Animal Reproduction Science**, v. 109,p.309-318,2008.

YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M.; et al. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, v 54, n.1, p.549-585, 2000.

YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. **Animal Reproduction Science**, V.60, n.61, p.349-355,2000.

**CAPITULO II AVALIAÇÃO DE ALGUNS PARÁMETROS ESPERMATICOS POR 5  
DIAS MEDIANTE A CENTRIFUGAÇÃO E RESSUSPENSÃO DIÁRIA DE  
DILUENTE NO SEMÊN OVINO REFRIGERADO A 5°C.**

*EVALUATION OF SOME SPERMATIC PARAMETERS FOR 5  
DAYS THROUGH DAILY CENTRIFUGATION AND RESUSPENSION OF  
DILUENT IN SPERM SHEEP REFRIGERATED AT 5 ° C*

## RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da troca diária do diluente no sêmen refrigerado ovino, avaliando sua ação na viabilidade dos espermatozoides. Para o estudo, formou-se um *pool* de sêmen com três ejaculados, de três carneiros da raça Dorper, após a avaliação subjetivas dos parâmetros espermáticos. O pool de sêmen foi diluído no meio Glicina-Gema-Leite (GGL), na proporção 1:4, para posterior fracionamento nos grupos controle (controle GGL), grupo TGG (teste GGL) e grupo TDD (pós-ressuspensão). Após a diluição, submeteu-se as amostras ao processo de refrigeração a 5°C, em Botutainer®. No intervalo de 24 horas, realizou-se a avaliação de uma alíquota de cada amostra por 5 dias, agrupando-as em 6 momentos (0h), (24h), (48h), (72h), (96h) e (120h). O processo de ressuspensão do pellet de espermatozoides em diluente fresco foi repetido diariamente até o grupo TG atingisse o mínimo de  $\geq 30\%$  de MP, mediante análises subjetivas no microscópio óptico. O grupo controle apresentou menor motilidade e vigor espermático, e seus SPZ obtiveram maior percentual de defeitos morfológicos que os SPZ dos grupos TG e TDD. Também, apresentou maior concentração da enzima AST, que foi correlacionada com o aumento do percentual de lesão de acrossomo nos SPZ, e do menor consumo de frutose durante o processo. A adição do diluente novo cada 24 horas apresentou efeito positivo sobre os SPZ, uma vez que o grupo TG preservou os parâmetros espermáticos por 120 horas. No quinto dia de avaliação, sua MP foi equivalente a 32%, vigor 3,20, 67,30% de SPZ com membrana íntegra e concentração de  $184,3 \times 10^6$  de SPZ viáveis por mL antes da centrifugação. No grupo TDD, os valores apresentados foram de 37% de MP, vigor 4,40, 66% de SPZ com membrana íntegra e concentração de  $175,8 \times 10^6$  de SPZ viáveis por mL, e um consumo de frutose 19,00 mg/ml. Este foi maior durante o tempo de avaliação do estudo demonstrando um maior aproveitamento desse substrato pelos espermatozoides. Isso demonstrou que a troca diária de diluente foi eficiente para preservar a viabilidade espermática por um maior período de tempo.

**Palavras chaves:** ovinos, refrigeração, diluição, sêmen, durabilidade.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of daily diluent exchange on refrigerated sheep semen, evaluating its action on sperm viability for the study, a semen pool with three ejaculates of three Dorper rams was formed after the subjective evaluation of sperm parameters. The semen pool was diluted in Glycine-Milk-Yolk (GGL) medium, in a 1: 4 ratios, for subsequent fractionation in the control (GGL control), TGG (GGL test) and TDD (post-resuspension) groups. After dilution, the samples were subjected to refrigeration at 5°C in Botutainer®. Within 24 hours, an aliquot of each sample was evaluated for 5 days, grouping them into 6 moments (0h), (24h), (48h), (72h), (96h) and (120h). The process of resuspension of the sperm pellet in fresh diluent was repeated daily until the TG group reached a minimum of  $\geq 30\%$  of MP, by subjective analysis under the optical microscope. The control group had lower sperm motility and vigor, and their SPZ obtained a higher percentage of morphological defects than the SPZ of TG and TDD groups. Also, it presented higher concentration of AST enzyme, which was correlated with the increase in the percentage of acrosome lesion in the SPZ, and the lower consumption of fructose during the process. The addition of new diluent every 24 hours had a positive effect on SPZ, since TG group preserved sperm parameters for 120 hours. On the fifth day of evaluation, its MP was equivalent to 32%, vigor 3.20, 67.30% SPZ with intact membrane and concentration of  $184.3 \times 10^6$  viable SPZ per mL before centrifugation. In the TDD group, the values presented were 37% MP, vigor 4.40, 66% intact membrane SPZ and  $175.8 \times 10^6$  viable SPZ concentration per mL, and a fructose consumption 19.00 mg / ml. This was higher during the study evaluation time showing greater use of this substrate by sperm. This demonstrated that daily diluent exchange was efficient to preserve sperm viability for a longer period.

**Keywords:** sheep, refrigeration, dilution, semen pool, durability.

## 6.1. INTRODUÇÃO

O uso de biotecnologias da reprodução é fundamental para o melhoramento genético no mundo (Salomon & Maxwell, 2000; Barbas et al., 2013; Najafi et al., 2014; Ataman et al., 2014; Abella et al., 2015; Masoudi et al, 2016). Desde que Elias Ivanov inseminou as primeiras ovelhas no início do século XX, esforços tem sido desenvolvido para potencializar esta biotecnologia e melhorar o mérito genético na espécie ovina (Ivanoff,1922).

Isso pode ser alcançado mediante o emprego do sêmen *in natura* ou refrigerado, devido a sua alta fertilidade e baixos custos (Schindler e Amir, 1960). Porém, seu uso é limitado já que os parâmetros espermáticos diminuem gradativamente após a coleta, fracionamento e armazenamento (Nishikawa,1959).

O declino da qualidade e fertilidade ocorre por diversos fatores que ainda não estão bem esclarecidos, porém acredita-se que a redução do substrato, o acúmulo de metabólitos durante o armazenamento, as alterações de pH e a osmolaridade sejam fortes indicadores para a ocorrências desses acontecimentos (Verstegen et al., 2005; Love et al.,2012). Alguns autores mencionam que a concentração e a fonte do plasma seminal são prejudiciais para o armazenamento do sêmen fresco e refrigerado (Love et al., 2005; Love et al., 2010).

Essa técnica já foi descrita em equinos (Torres-Bogino et al.,1994; Love et al.,2012; El-Badry et al., 2013; Kisser et al., 2014; Riccio et al.,2016), burros (Miró et al.,2009), caninos (Rijsselaere et al., 2002; Verstegen et al., 2005), bovinos (Pickett et al.,1975), ovinos (Chandler e Amir 1961) e suínos selvagens (Bury et al., 2017).

A diminuição dos parâmetros espermáticos pode ser convertida quando se adiciona um novo extensor fresco (Schindler e Amir, 1960). O novo proporciona uma quantidade nova de açúcar, gema de ovo fresca e a eliminação do substrato velho, além de produtos degradados pelos espermatozoides (Verstegen et al., 2005).

Quanto maior o tempo de preservação do sêmen refrigerado, maior é o acúmulo de metabólitos, e menor a disponibilidade de nutrientes no meio (Busato et al.,2017). As taxas de diluição 1:4 e 1:8, independentemente do extensor utilizado, melhoram os índices de motilidade espermática (Pickett et al.,1975). Uma taxa maior de diluição ajuda no aperfeiçoamento dos parâmetros espermáticos durante a reposição do diluente fresco (Schindler e Amir,1960).

Nossa hipótese principal é que o sêmen ovino refrigerado a 5 °C mediante a centrifugação e ressuspensão do diluente Glicina Gema de ovo leite durante cada 24 horas conferira um aumento na longevidade dos espermatozoides logrando armazenar por mais tempo sua viabilidade.

O presente estudo teve como objetivo verificar os efeitos da troca diária de diluente em sêmen ovino refrigerado a 5°C sobre a longevidade dos espermatozoides durante o período de 24, 48, 72, 96 e 120 horas, para isso avaliou-se subjetivamente a motilidade total e progressiva, vigor, morfologia e concentração espermática, além da verificação da integridade de membrana plasmática, antes e após centrifugação e troca de meio diluidor.

Ainda, objetivou-se determinar o período máximo da viabilidade dos espermatozoides após troca e centrifugação diária do diluente no sêmen refrigerado a 5°C, através da verificação do consumo de frutose pelos espermatozoides, da dosagem das principais enzimas (AST, ALT e LDH) no sobrenadante, e também se estipulou a perda espermática do sobrenadante na troca diária de diluente.

## **6.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **6.2.1 Local e animais**

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, protocolo número 079/2017.

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Reprodução Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba-PR.

Foram utilizados três carneiros da raça Dorper, com idade entre 12-24 meses, e com uma média de peso de 50 kg, pertencentes à Central Álamos de Genética, localizada no município de Palmeira, no estado do Paraná, Brasil (Latitude; 25°46'3645" sul, longitude; -49°72'8794 e altitude de 870 m), entre os meses de fevereiro a agosto de 2018. Os animais permaneciam em sistema semi-intensivo, com acesso à pastagem de campo nativo durante o dia e confinados no período da noite. Recebiam suplementação alimentar com milho e farelo de soja. O fornecimento de água e minerais foi *ad libitum*.



### 6.2.2 Coleta do sêmen

Inicialmente se realizaram duas coletas, com intervalo de três dias para selecionar os carneiros e estabilizar os parâmetros espermáticos, já que alguns reprodutores se encontravam em repouso sexual. Após sete dias, ocorreu a normalização dos parâmetros espermáticos, e os animais passaram a ser coletados semanalmente.

Cada animal foi submetido a cinco coletas de sêmen, com intervalos de uma semana entre coletas, no período de fevereiro a agosto. O método de coleta utilizado foi com vagina artificial (AV) para ovino, com uma fêmea contida como manequim para monta. A AV encontrava-se termo regulada em 40-43°C, acoplada a um copo coletor graduado aquecidos e protegidos da luz solar. Todos os animais eram condicionados a esse sistema de coleta de sêmen.

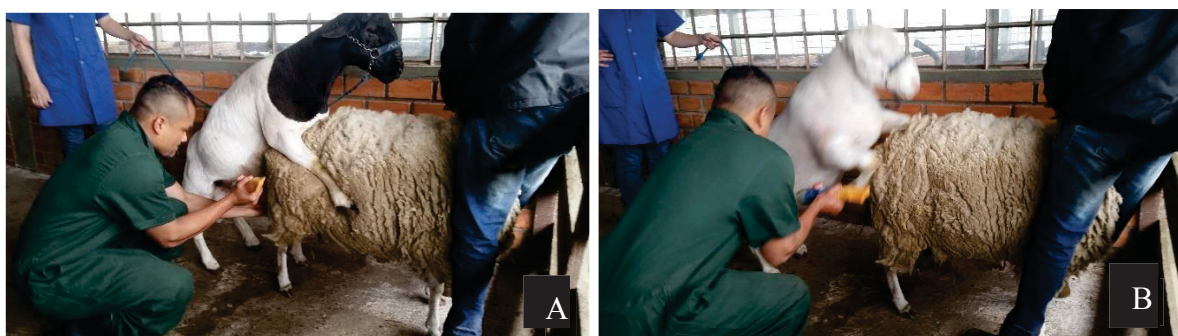


FIGURA 1. Coleta de sêmen por vagina artificial em carneiro da raça Dorper ; B, Coleta de sêmen por vagina artificial em carneiro da raça White Dorper.

### 6.2.3 Análise do sêmen

Os ejaculados selecionados apresentaram as características macroscópicas e microscópicas, dentro dos padrões de normalidade para a espécie, segundo CBRA (2013). O volume foi determinado por meio de tubo graduado em mililitros (mL) utilizado no momento da coleta.

Foram aproveitados somente os ejaculados que possuíam no mínimo volume de 0,7 ml, movimento em massa 2 (escala 1-3), 80% de motilidade progressiva, vigor 3 em escala de (0-5) e 80% de espermatozoides normais. Ver (Anexo4).

Toda as avaliações subjetivas foram avaliadas por mesmo técnico, e as amostras foram mantidas em banho mariais a 37°C para avaliação microscópica. O primer parâmetro analisado foi o turbilhonamento dos espermatozoides, avaliado por microscopia ótica (Coleman, N 107, Brasil) com aumento de 40x, colocando-se uma gota de sêmen *in natura* sobre uma lâmina previamente aquecida. O movimento foi classificado entre 1-5.

A motilidade espermática e o vigor foram determinados, mediante uma diluição de 10µL de sêmen em 500µL de DMPBS (Dulbecco modificado Phosphate buffered saline - Nutricell Nutrientes Celulares LTDA, Campinas, Brasil). Após diluição, uma gota foi colocada sobre uma lâmina e recoberta por uma lamínula previamente aquecidas a 35°C. O exame foi avaliado objetivamente por um mesmo técnico para evitar variação nas avaliações, os ejaculados foram alocados em banho-maria a 37 °C para posterior avaliação microscópica.

Para motilidade, atribuiu-se uma escala de 0% (ausência de espermatozoides com movimentos) a 100% (todos os espermatozoides com movimentos retilíneo progressivo) e para o vigor espermático, uma escala de 0 (ausência de movimento progressivo dos espermatozoides) a 5 (espermatozoides com movimento rápidos e vigorosos) mediante a análise subjetiva no microscópio de no menos cinco campos calculando-se a média.

A concentração espermática foi determinada em câmara de Neubauer ná diluição 1:400 (sêmen: solução de formol-salino tamponado (Anexo 3)). O resultado foi expressado em número de células espermáticas / por cm<sup>3</sup>

Para avaliação das características morfológicas, uma alíquota da amostra foi destinada à diluição com DMPBS na concentração de 1:50, com o objetivo de avaliar patologias espermáticas, com o método descrito por Cerovsky (1976).realizou-se a contagem diferencial de 200 células em lâmina preparada com esfregaço do sêmen diluído na proporção 20 µL de sêmen diluído em 1 mL DMPBS e mergulhados em vermelho congo durante 90 segundos e violeta genciana 20 segundos.

O teste hiposmótico (HOST), foi realizado segundo a técnica descrita por (Hishinuma e Sekine, 2004). Obteve-se uma amostra de 10µL do sêmen diluído, depositada em 50µL de água aquecida a 37°C. Após 60 minutos de incubação em banho-maria a 37°C, uma alíquota de 10µL dessa suspensão foi depositada entre lâmina e lamínula, para posterior avaliação em microscópio de contraste de fase com

aumento de 400x. Realizou-se a contagem diferencial de 200 espermatozoides, com objetiva de imersão (CBRA, 2013).

Os espermatozoides foram considerados com integridade estrutural funcional da membrana espermática quando foi observado edema, reconhecido através do enrolamento da cauda dos espermatozoides. Os resultados foram expressos em porcentagem.

O Total de espermatozoides viáveis no ejaculado foi obtido após a verificação de concentração espermática em câmara de Neubauer (Anexo 3). Multiplicando-se esse valor com o volume total da amostra e o valor da motilidade progressiva. O resultado foi expresso em espermatozoides viáveis por mL.

#### **6.2.4 Diluição do sêmen**

O estudo foi realizado com cinco repetições, totalizando-se 15 ejaculados, pertencentes a três carneiros. Os ejaculados selecionados foram misturados para a formação de um *pool* de sêmen com o objetivo de minimizar a variação individual de cada carneiro. As avaliações dos *pools* consistiam em aspectos macroscópicos (volume, coloração, aspecto) e microscópicos como motilidades total (MT), motilidade progressiva (MP), vigor, concentração, morfologia espermática e teste hiposmótico (HOST), já descritas anteriormente.

O *pool* de sêmen foi diluído com Glicina-Gema-Leite (GGL) (figura 2), acrescido de 5% de gema de ovo (Rodello et al.,2011), na proporção 1:4 (figura 2), e avaliado quanto aos mesmos parâmetros explicados anteriormente. O sêmen foi fracionado em dois grupos, sendo eles: grupo controle (controle GGL) o grupo TGG (teste GGL). Em seguida as amostras foram armazenadas a 5 °C em Botutainer® e a cada 24 horas foram homogeneizadas e avaliadas. Após a ressuspensão foi realizada uma avaliação dos parâmetros espermáticos do grupo TGG, surgindo um terceiro grupo tratamento após a ressuspensão imediata do diluente, nomeado grupo (TDD) (Anexo 4).



FIGURA 2- A, Diluente Glicina Gema Leite; B, Adição de diluente GGL na proporção 1:4 ao sêmen

O grupo TGG foi centrifugado durante 10 minutos a 2900 r.p.m, e o sobrenadante foi transferido para tubos *ependorff* com capacidade de 1 mL. Esse material foi armazenado em freezer para posterior determinação da frutose e das enzimas LDH, AST e ALT. O pellet de espermatozoides foi ressuscitado em diluente fresco, e realizou-se nova avaliação logo após esse procedimento.

Este processo foi repetido diariamente até que os espermatozoides do grupo TGG atingissem 30% de motilidade progressiva, já que este é a porcentual mínimo para que os espermatozoides refrigerados possam ser empregados na inseminação artificial na espécie ovina.

### 6.2.5 Determinação de enzimas

As amostras do sobrenadante se descongelaram a temperatura ambiente e centrifugadas a 3000 r.p.m durante 3 minutos. Após isso, foram mantidas a 35°C em banho maria para posterior análise.

Esse sobrenadante foi analisado em triplicata para a retirada da média de cada amostra com auxílio do semiautomático analisador Química BS-200 (Mindray Medical International, Shenzhen, China) utilizando kits de reagentes da Bioclin (Quibasa Basic Chemical Ltda, Belo Horizonte, Brasil). Os reagentes foram empregados para determinar as seguintes enzimas aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT) e Lactato Desidrogenase (LDH), baseando-se nos trabalhos de Tietz (1986), Bergmeyer et al. (1985) e Tietz (1986), respectivamente.

### **6.2.6 Determinação de Frutose**

As dosagens de açúcares foram procedidas no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Paraná- UFPR. Para a determinação da concentração de açúcares redutores apresentadas nas amostras utilizou-se o teste colorimétrico com o ácido 3-5 dinitroso-licílico (DNS), segundo técnica de Miller (1959). Adotou-se como solução padrão a frutose e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540nm, também gerando a média dos valores da triplicata.

### **6.2.7 Análise estatística**

Com os dados obtidos no experimento, procedeu-se a análise descritiva dos mesmos, com estimativa de frequência das variáveis qualitativas, média e desvio padrão das variáveis quantitativas. Posteriormente, as variáveis foram testadas quanto à distribuição normal com o teste Shapiro-Wilk.

As variáveis HOST, perda de espermatozoides e frutose apresentaram distribuição normal, sendo e as diferenças entre grupos, os tempos e as coletas foram verificados com análises de variância (ANOVA).

As variáveis AST, ALT, LDH, MT, MP, vigor, lesões de acrossomo e espermatozoides viáveis não apresentaram distribuição normal, sendo necessário avaliar as diferenças entre os grupos e os tempos com a prova de Kruskal-Wallis, e as diferenças entre as coletas com o teste de Friedman. Para todas as análises, utilizou-se o nível de significância ( $p < 0,05$ ). Para a execução da estatística descritiva e inferencial utilizou-se o software SPSS 20.0.

### 6.3 RESULTADOS

Os parâmetros do sêmen fresco, em todas as coletas realizadas, estavam dentro dos valores normais estabelecido para a espécie (Maia et al.,2011).

Foi observado que as MT e MP foram inferiores ( $p < 0,05$ ) no GC em cada período de tempo analisados, quando comparados aos grupos tratamentos. Em 120 horas de refrigeração foi observada uma perda de MT e MP significativa no GC ( $p > 0,05$ ), apresentado 70% e 65% de perda.

Foi observado que a MP no grupo TDD foi significativamente superior quando comparado ao GC, em todos os períodos de tempos analisados ( $p < 0,05$ ). Porém, comparando-se os grupos tratamentos, só houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos tempos 24 e 48 horas. Isso pode ser observado nas figuras 3 e 4.

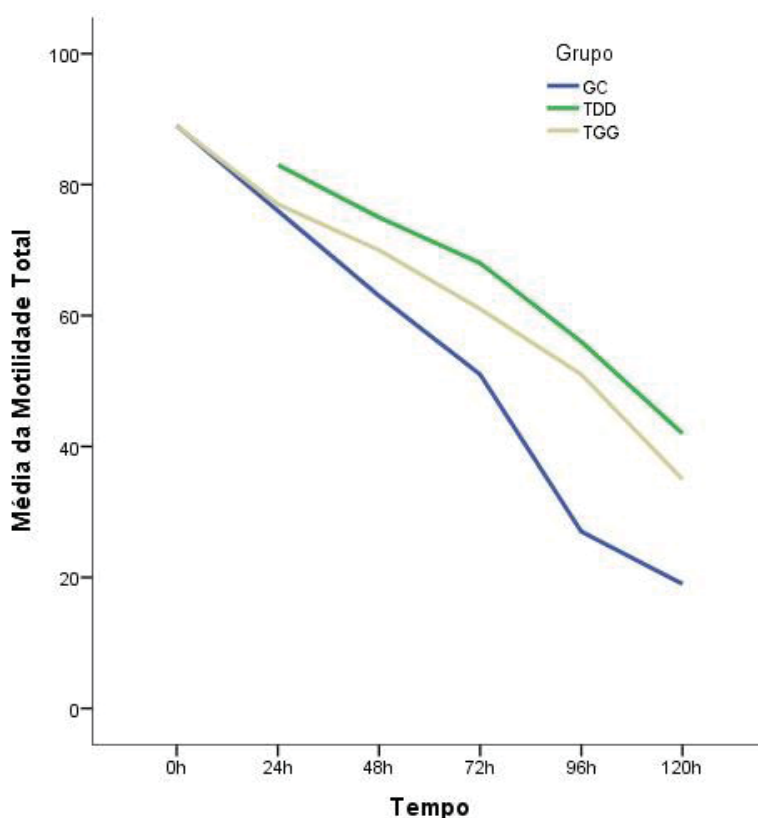


FIGURA 3- Valor médio da motilidade total(MT) dos grupos controle (GC), tratamento glicina gema leite (TGG) e grupo tratamento pos centrifugação e adição de novo diluente (TDD) mantidos a 5°C por 120 horas.

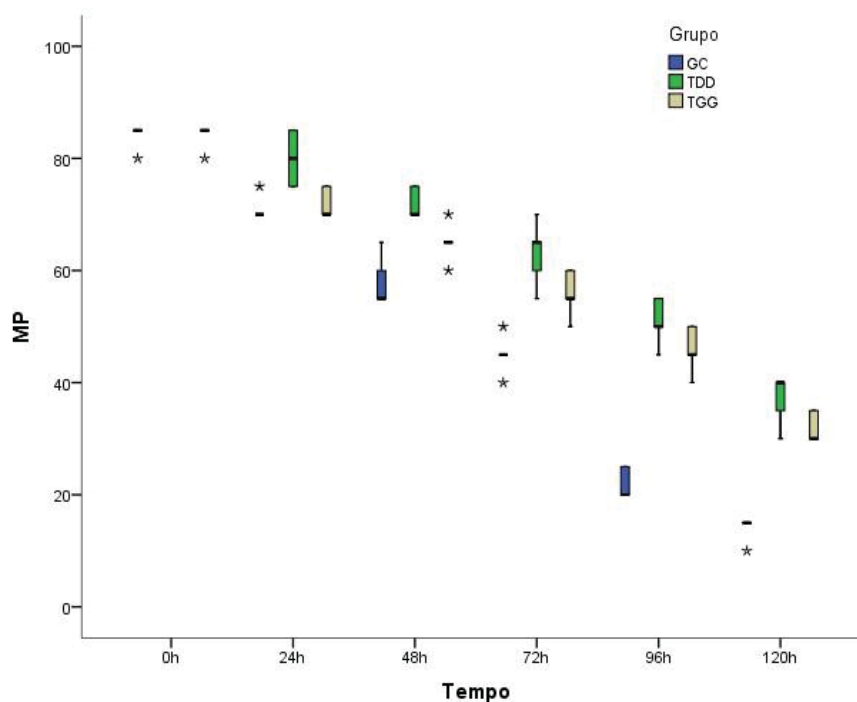


Figura 4 - Valor médio da motilidade progressiva dos grupos controle (GC), tratamento glicina gema leite (TGG) e grupo tratamento pôs centrifugação e adição de novo diluente (TDD) mantidos a 5°C por 120 horas

Na avaliação da membrana espermática através do teste hiposmótico (teste Host), não houve diferença estatística entre os grupos, em qualquer período analisado ( $p > 0,05$ ).

Nos grupos TGG e TDD, a centrifugação e ressuspensão de novo diluente não afetou a porcentagem de espermatozoides com acrossomo intacto ( $p < 0,05$ ). Porém, após 120 horas, os resultados do GC apresentaram-se significativamente maior ( $p > 0,005$ ) do que no grupo TGG. (tabela 1).

TABELA 1. MÉDIA ± DESVIO PADRÃO DO TESTE DE INTEGRIDADE DE MEMBRANA (%) DURANTE A CENTRIFUGAÇÃO DIÁRIA E RESUSPENSÃO DO DILUENTE NO SÊMEN OVINO REFRIGERADO NOS GRUPOS (GC), (TGG) E (TDD) POR 120 HORAS A 5°C.

HOST	0h	24h	48h	72h	96h	120h	p-valor entre tempo
	Média DP	Média DP	Média DP	Média DP	Média DP	Média DP	
GC	75,60 <sub>a</sub> 3,21	73,80 <sub>b</sub> 2,95	72,20 <sup>c</sup> 3,11	70,80 <sup>d</sup> 2,86	69,00 <sup>e</sup> 3,61	67,00 <sup>f</sup> 3,67	<0,001
TDD	.	.	73,60 <sup>a</sup> 3,13	71,80 <sup>b</sup> 3,27	70,58 <sup>c</sup> 2,89	68,20 <sup>d</sup> 3,03	66,00 <sup>e</sup> 2,35 0,001
TGG	76,40 <sub>a</sub> 1,95	74,60 <sub>b</sub> 2,61	73,10 <sup>c</sup> 2,41	71,20 <sup>d</sup> 1,92	69,00 <sup>e</sup> 2,35	67,30 <sup>f</sup> 2,73	<0,001
p-valor entre grupos	0,655	0,410	0,524	0,952	0,873	0,600	

Diferentes letras correspondem a diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre tempos.

TGG: Tratamento Glicina Gema Leite centrifugação e ressuspensão de diluente avaliada cada 24 horas.

TDD: Tratamento após ressuspensão imediata do diluente

GC: Grupo Controle: Centrifugado não trocado diluente avaliada cada 24 horas.

Quanto ao consumo de frutose pelos espermatozoides não foi observado diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos nos períodos de tempos de 0, 72 e 96 horas. Porém nos tempos 24 e 120 horas, o grupo TGG apresentou consumo de frutose significativamente maior do que o GC ( $p = 0,016$ ) (Tabela 2).

TABELA 2. MÉDIA ± DESVIO PADRÃO DO CONSUMO DE FRUTOSE (MG/ML-1) NO SÊMEN OVINO REFRIGERADO DURANTE A TROCA DIÁRIA DE DILUENTE NOS MOMENTOS 0, 24, 48, 72, 96 E 120 HORAS, A 5°C.

FRUTOSE	0h	24h	48h	72h	96h	120h	p-valor entre tempo
	Média DP	Média DP	Média DP	Média DP	Média DP	Média DP	
GC	11,56 <sub>a</sub> 1,44	11,65 <sub>a</sub> 1,41	11,43 <sub>a</sub> 2,36	14,35 <sub>a</sub> 3,20	12,97 <sub>a</sub> 1,67	11,36 <sub>a</sub> 3,00	0,702
TGG	11,64 <sub>a</sub> 1,74	14,91 <sub>b</sub> 2,23	16,69 <sub>b</sub> 1,96	18,53 <sub>b</sub> 2,84	16,58 <sub>b</sub> 3,00	19,00 <sub>b</sub> 2,85	0,014
p-valor entre grupos	0,969	0,032	0,016	0,095	0,095	0,016	

Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre tempos.



TGG: Tratamento Glicina Gema Leite centrifugação e ressuspensão de diluente avaliada cada 24 horas.

TDD: Tratamento após ressuspensão imediata do diluente

GC: Grupo Controle: Centrifugado não trocado diluente avaliada cada 24 horas.

Quando se analisou o vigor espermático, foi observado que no GC esse parâmetro reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ), quando comparado ao grupo TDD, a partir do período de 48. Quando comparado ao grupo TGG, esse parâmetro apresentou-se também mais elevado ( $p > 0,005$ ) a partir de 72 horas (figura 5).

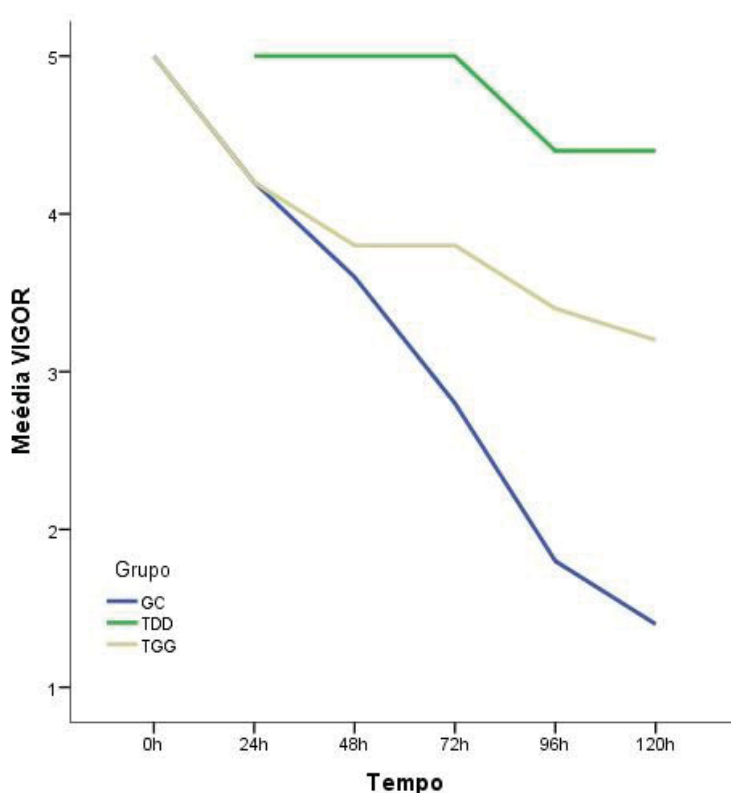


FIGURA 4– Valores de vigor (1-5) durante a centrifugação e troca do diluente por 120 horas à temperatura de 5°C.

Em relação à concentração espermática não foram encontrados diferença significativa entre os grupos, nos períodos de tempos analisados ( $p > 0,05$ ), com exceção do período de 96horas. Nesse período foi observado diferença significativa entre os grupos ( $p = 0,015$ ), sendo que no grupo TGG os resultados foram significativamente maiores, quanto ao número de espermatozoides viáveis na amostra comparado ao GC ( $p = 0,008$ ) e TDD ( $p = 0,032$ ) (tabela 3).

TABELA 3. MÉDIA  $\pm$  DESVIO PADRÃO DOS ESPERMATOZOIDES VIAVEIS DURANTE CENTRIFUGAÇÃO E RESSUSPENSÃO COM DILUENTE FRESCO DOS GRUPOS CONTROLE (GC), TRATAMENTO GLICINA GEMA LEITE (TGG) E GRUPO TRATAMENTO POS CENTRIFUGAÇÃO E ADIÇÃO DE NOVO DILUENTE (TDD)

MANTIDOS A 5°C POR 120 HORAS.

SPZ viáveis	24h		48h		72h		96h		120h		p-valor entre tempos
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
	GC	700640 <sup>b</sup>	18193	538644 <sup>b</sup>	171608	39868 <sup>c</sup>	123489	216690 <sup>d</sup>	17467	151514 <sup>d</sup>	
TDD	70064 <sup>a</sup>	65928	2371480 <sup>a</sup>	4060674	448500 <sup>b</sup>	72236	302663 <sup>c</sup>	57214	195840 <sup>d</sup>	41309	0,001
TGG	63126 <sup>b</sup>	12657	492981 <sup>c</sup>	124812	403420 <sup>c</sup>	68981	289900 <sup>d</sup>	52218	184300 <sup>e</sup>	34540	<0,001

Diferentes letras correspondem a diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre tempos.

A avaliação das transaminases (AST/ALT), demonstrou que a concentração da enzima AST no grupo GC foi significativamente maior ( $p > 0,05$ ), em todos os períodos analisados, sob refrigeração a 5°C, quando comparado ao grupo TGG. Porém, a enzima ALT não demonstrou diferença significativamente entre os grupos, em quaisquer períodos de tempos avaliados ( $p > 0,05$ ).

Já a enzima LDH demonstrou valores significativamente menores ( $p < 0,05$ ) no grupo TGG em todos os momentos 24, 48, 72, 96 e 120 ( $p = 0,008$ ) quando foi comparado com o GC (tabela4).

TABELA 4. MÉDIA  $\pm$  DESVIO PADRÃO DAS ENZIMAS AST (UI), ALT (UI), LDH (UI) DURANTE A CENTRIFUGAÇÃO DIÁRIA E RESSUSPENSÃO COM O DILUENTE EM SÊMEN OVINO NOS GRUPOS CONTROLE (GC), TRATAMENTO GLICINA GEMA LEITE (TGG) E GRUPO TRATAMENTO POS CENTRIFUGAÇÃO E ADIÇÃO DE NOVO DILUENTE (TDD) MANTIDOS A 5°C POR 120 HORAS.

		AST	ALT	LDH
G0	GC	555,02 <sup>cb</sup> $\pm$ 4911 <sup>cb</sup>	8,37 $\pm$ 2,40 <sup>a</sup>	887,90 $\pm$ 112,85 <sup>a</sup>
	TGG	398,7 $\pm$ 228,06 <sup>abd</sup>	6,54 $\pm$ 4,51 <sup>a</sup>	662,12 $\pm$ 373,46 <sup>ab</sup>
G24	GC	512,66 $\pm$ 196,12 <sup>c</sup>	8,54 $\pm$ 3,08 <sup>a</sup>	1577,44 $\pm$ 205,39 <sup>bc</sup>
	TGG	175,02 $\pm$ 106,44 <sup>de</sup>	16,70 $\pm$ 8,24 <sup>a</sup>	720,74 $\pm$ 387,0 <sup>a</sup>
G48	GC	437,36 $\pm$ 137,75 <sup>c</sup>	7,18 $\pm$ 3,44 <sup>a</sup>	1575,74 $\pm$ 205,25 <sup>b</sup>
	TGG	109,42 $\pm$ 35,61 <sup>cd</sup>	10,84 $\pm$ 6,68 <sup>a</sup>	553,46 $\pm$ 261,37 <sup>a</sup>
G72	GC	373,84 $\pm$ 104,13 <sup>b</sup>	6,74 $\pm$ 3,33 <sup>a</sup>	1537,82 $\pm$ 191,35 <sup>c</sup>
	TGG	58,84 $\pm$ 23,99 <sup>be</sup>	16,12 $\pm$ 8,17 <sup>a</sup>	230,50 $\pm$ 94,45 <sup>bc</sup>
G96	GC	344,68 $\pm$ 131,65 <sup>ab</sup>	8,14 $\pm$ 4,99 <sup>a</sup>	1585,76 $\pm$ 253,65 <sup>c</sup>
	TGG	43,98 $\pm$ 22,55 <sup>ab</sup>	21,58 $\pm$ 14,39 <sup>a</sup>	358,06 $\pm$ 461,50 <sup>a</sup>
G120	GC	315,30 $\pm$ 104,23 <sup>a</sup>	9,94 $\pm$ 5,38 <sup>a</sup>	1590,66 $\pm$ 211,19 <sup>c</sup>
	TGG	28,30 $\pm$ 11,89 <sup>a</sup>	25,92 $\pm$ 22,49 <sup>a</sup>	119,08 $\pm$ 54,71 <sup>b</sup>

Diferentes letras correspondem a diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre tempos.

A perda espermática apresentou diferença significativa no grupo TGG em todos os momentos avaliados ( $p = 0,03$ ). Sendo que no período de tempo 96 horas a perda espermática foi significativamente menor do que nos períodos de 24 horas ( $p = 0,03$ ) e 48 horas ( $p = 0,03$ ) (figura 6).

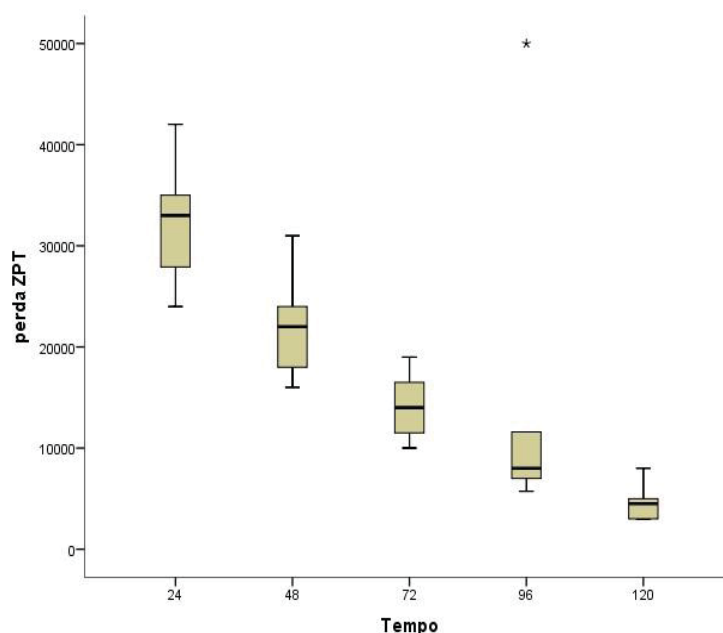


FIGURA 5. Perda de espermatozoides durante a centrifugação e ressuspensão do novo diluente a 5°C, durante 24, 48, 72, 96 e 120 horas.

Quanto as lesões de acrossomo analisadas, verificou-se que após 120 horas, houve diferença significativa entre grupos ( $p=0,019$ ), sendo que o GC apresentou resultados significativamente maiores do que o grupo TGG ( $p=0,008$ ). Não observou-se diferença significativa entre o GC e o grupo TDD ( $p=0,05$ ), e nem entre os grupos tratamentos ( $p=0,31$ ) (tabela 5).

TABELA 5. MÉDIA  $\pm$  DESVIO PADRÃO DE LESÕES DE ACROSSOMO DURANTE A CENTRIFUGAÇÃO DIÁRIA E RESSUSPENSÃO COM O DILUENTE EM SÊMEN OVINO NOS GRUPOS CONTROLE (GC), TRATAMENTO GLICINA GEMA LEITE (TGG) E GRUPO TRATAMENTO POS CENTRIFUGAÇÃO E ADIÇÃO DE NOVO DILUENTE (TDD) MANTIDOS A 5°C POR 120 HORAS.

Lesões de acrossomo	0h		24h		48h		72h		96h		120 h		p-valor entre tempos
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
GC	1,60 <sub>a</sub>	0,55	2,80 <sub>a</sub>	0,84	5,40 <sub>b</sub>	1,52	9,20 <sub>c</sub>	1,64	12,60 <sub>d</sub>	1,14	16,40 <sub>c</sub>	2,07	<0,001
TDD	-	-	2,40 <sub>a</sub>	0,55	4,40 <sub>b</sub>	0,89	7,80 <sub>c</sub>	0,84	10,80 <sub>d</sub>	1,30	13,20 <sub>e</sub>	1,79	<0,001
TGG	1,60 <sub>a</sub>	0,55	2,60 <sub>a</sub>	0,55	5,20 <sub>b</sub>	1,64	8,40 <sub>c</sub>	2,30	10,60 <sub>d</sub>	2,30	11,60 <sub>d</sub>	2,07	<0,001
p-valor entre grupos	1,00		0,679		0,519		0,320		0,148		0,019		

Diferentes letras correspondem a diferenças significativas ( $p<0,05$ ) entre tempos.

## 6.4 DISCUSSÃO

A troca diária de diluente no sêmen refrigerado já foi descrita em várias espécies (Vestegen et al., 2005; Foste et al., 2011; Love et al., 2012). Entretanto, não foram realizados trabalhos demonstrando seus efeitos na viabilidade dos espermatozoides na espécie ovina, como realizados nesse estudo.

Em ovinos a redução dos efeitos negativos da refrigeração podem ser alcançados quando é adicionado o diluente correto e armazenado a temperaturas adequadas (Aisen et al., 2000; Ruiz et al., 2015). Porém seu uso é limitado apenas para um período de 24 a 48 horas (Bersgtein-Galan et al. 2016). Almejando aumentar esse período de manutenção da viabilidade espermática do sêmen refrigerado, realizou-se a centrifugação e a troca diária do diluente, tornando-se possível prolongar a viabilidade espermática por um período de 120 hora, confirmado assim nossa hipótese principal.

Esses resultados são condizentes com o encontrados no nosso trabalho piloto também realizado na espécie ovina (Busato et al., 2017), e também no trabalho realizado em asininos e por (Miro et al., 2009). Não entanto diferem dos encontrados por Bury et al. (2017), que demonstrou que a centrifugação e ressuspensão de diluente diariamente afetou negativamente os parâmetros espermáticos dos espermatozoides de suínos selvagens.

Os parâmetros mais afetados durante a refrigeração são a MP e a integridade acrossomal (Câmara e Guerra, 2011). Neste estudo, a integridade de acrossomo decaiu a partir de 48 horas após refrigeração nos três grupos analisados, sendo maior no grupo GC. Porém observou-se pouca diferença entre os grupos tratamentos (TGG e TDD), o que demonstra que a centrifugação do sêmen não ocasionou danos significativos aos espermatozoides. Estes resultados estão de acordo com o trabalho realizado por Love et al. (2012), que demonstrou que a centrifugação não ocasionou danos ( $p < 0,05$ ) ao acrossomo durante 96 horas.

A motilidade é um bom indicador para avaliar os critérios de fertilização no sêmen, e fornece informações valiosas sobre o comportamento dos espermatozoides em condições adversas (Bouchard et al., 1990). A MT neste estudo após 120 horas de armazenamento foi mantida até o valor mínimo aceitável. Isso provavelmente foi

possível devido ao fornecimento de novos substratos aos espermatozoides e a eliminação de substrato antigo, reduzindo a produção de ROS.

A MP foi inferior nos três tratamentos no intervalo de 0 a 72 horas de armazenamento. Em trabalho realizado na espécie equina, observou-se resultados parecidos quanto a perda de motilidade espermática quando se submete o sêmen refrigerado ao processo de centrifugação, ultrapassando além do tempo de armazenamento, o que acarreta a redução da MP (Riccio et al.,2016).

Em total a perda de MP nesse estudo no período total de 120 horas foi de 70 % grupo GC, 52% para o grupo TGG e de 47% para o grupo TDD, comprovando que a adição de diluente novo foi benéfica para manter um maior número de espermatozoides móveis na amostra. Porém resultados encontrados em javalis, diferem com os encontrados neste estudo, uma vez que o GC apresentou melhores parâmetros de MP em relação aos grupos que foram submetidos a centrifugação e adicionado novo extensor ao sêmen (Bury et al.,2017). Isso pode ser atribuído ao estresse que sofrem os espermatozoides de javali na sua membrana plasmática durante o processo de centrifugação (Alvarez et al.,1993) ou devido ao diluente adicionado ser livre de plasma seminal e antioxidantes (Bury et al.,2017).

A adição de nova gema de ovo, e também o efeito protetor da frutose, reduzem os efeitos negativos ocasionados pela refrigeração (Salomon & Maxwell, 2000; Verstegen et al., 2005). Nesse estudo, o consumo de frutose pelo grupo TGG foi significativamente maior do que no GC ( $p=0,016$ ), nas primeiras 24 horas e após 120 horas. Isso demonstra que o diluente adicionado no grupo TGG proporcionou uma fonte adequada de açúcares para os espermatozoides manterem sua atividade metabólica durante o período de armazenamento.

Estes resultados são compatíveis com os encontrados por Verstegen et al. (2005), que demonstraram maior consumo de açúcares pelos espermatozoides nas primeiras 24 horas, promovendo aumento da taxa metabólica de essas células espermáticas. Ainda, Riau et al. (2001), também demonstraram, na espécie canina, um maior aumento do consumo da frutose após a troca de diluente.

Esse fator pode ser confirmado também com o aumento do vigor observado durante o estudo, que aumentou consideravelmente após a centrifugação e adição do diluente. Quanto maior a quantidade de açúcares disponíveis maior será o consumo

destes pelos espermatozoides e conseqüentemente, maior o vigor de movimentação de essas células.

Verstegen et al. (2005) relataram que a adição de novo meio extensor proporciona aos espermatozoides uma nova fonte de açúcar e proteínas presentes na gema de ovo, além de remover os componentes do plasma seminal e de fornecer uma homeostase dos metabólitos encontrados no meio (Padilla e Foote, 1991). Isso foi demonstrado por Cardoso et. (2010) e Busato et al. (2017), que obtiveram reduções no vigor no grupo controle após 24 horas de refrigeração, e aumento no vigor em todos os momentos após a troca de diluente, assim observou-se nesse estudo.

Estudos em equinos mencionam que prolongar a longevidade dos espermatozoides através da troca de diluente é uma alternativa confiável, podendo-se utilizá-lo por até 96 horas (Love et al., 2012). Na espécie canina, sua utilização foi descrita por até 27 dias, entretanto as melhores taxas de fertilidade foram até os primeiros 11 dias (Verstegen et al., 2005).

Isso foi observado no nosso trabalho, no qual foi possível prolongar por 120 horas a longevidade dos espermatozoides ovinos com uma MP de 32% antes da troca e de 37% após a troca do diluente. Isto foi possível uma vez que os espermatozoides com a membrana plasmática intacta são capazes de reativar a motilidade espermática (Kiser et al., 2014).

A integridade estrutural e funcional da membrana espermática é crítica e fundamental para prolongar o sucesso dos espermatozoides no processo de fertilização (Bassiri et al., 2013). Nesse contexto, foi demonstrado através do teste hispomotico, que a centrifugação não ocasiona danos a membrana espermática (grupo TGG), possivelmente decorrente da adição de gema de ovo fresca após a troca de diluente, que auxilia na proteção das membranas plasmáticas dos espermatozoides.

Os parâmetros encontrados coincidem com os resultados apresentados por Busato et al. (2017), que mencionam que a porcentagem de danos ocorridos a célula espermática devido ao processo de centrifugação (também avaliado pelo HOST) não interfere com a motilidade ou vigor. Em nosso estudo a porcentagem de espermatozoides viáveis durante avaliação do teste de HOST decai consideravelmente nas 72 horas após armazenamento em todos os grupos.

Câmara e Guerra (2011), relataram que as alterações no momento da refrigeração danificam os canais proteicos e a permeabilidade da membrana dos espermatozoides, aumentando as perdas de várias enzimas no processo de congelação e reduzindo os índices de vigor e motilidade espermática.

Nesse trabalho, observou-se que o GC apresentou concentração das enzimas AST e LDH significativamente maior ( $p > 0,05$ ) em relação ao grupo TGG durante os diferentes tempos de armazenamento. Quando os danos ocorrem na parte média da membrana plasmática é liberada a enzima AST, que é a principal enzima produtora de ATP mitocondrial, alterando a motilidade espermática (Colebrander et al., 1992).

Estes achados corroboram com os resultados de Tejaswi et al. (2016), que correlacionou o aumento destas enzimas com lesões da membrana espermática no sêmen de ovino. Estes achados corroboram com os resultados de Tejaswi et al. (2016), que correlacionou o aumento destas enzimas com lesões da membrana espermática no sêmen de ovino refrigerado. Porém, em trabalhos desenvolvidos por Arifiantini e Purantara (2010) não foi encontrado diferença significativa na avaliação da enzima AST.

Segundo Azawi et al. (1990), o aumento das transaminases (ALT/AST) no meio de armazenamento está correlacionado com a perda da motilidade. Porém, não foi observado alterações nas concentrações da enzima ALT neste experimento. Muradas et al. (2013) relataram que a enzima LDH é altamente correlacionada com a motilidade espermática e com o número de espermatozoides vivos na amostra. Porém, esse fator difere dos resultados encontrados nesse trabalho, uma vez que o GC apresentou menores valores de motilidade espermática e número de espermatozoides viáveis, e maiores concentrações da enzima quando comparado com os grupos tratamentos.

O aumento das enzimas AST e LDH no GC é possivelmente devido a presença do plasma seminal durante o período de 120 horas. No entanto, no grupo TGG, que é submetido ao processo de centrifugação e ressuspensão, retira-se o plasma seminal, juntamente com os conteúdos prejudiciais para a viabilidade espermática.

Este é o primer trabalho detalhando o uso de enzimas como ferramentas para auxiliar na análise do sêmen, superior a um período de 24 horas no resfriamento do sêmen de ovinos. Tejaswi et al. (2016) utilizou várias enzimas para avaliação do sêmen ovino *in natura* e refrigerado, porém sua viabilidade foi limitada ao período de 24 horas de armazenamento.



## 6.5 CONCLUSÃO

É possível manter o potencial fertilizante de espermatozoides ovinos refrigerados a 5°C por um período de 120 horas, desde que seja realizada a troca do diluente diariamente.

O processo de centrifugação e ressuspensão acarretam na melhora dos parâmetros espermáticos analisados.

A perda de espermatozoides após a centrifugação e ressuspensão foi reduzida, não interferindo na concentração de espermatozoides viáveis no ejaculado.

O consumo de frutose foi maior no grupo que se realizou a troca de diluente, demonstrando um maior aproveitamento desse substrato pelos espermatozoides.

Foi observado que as enzimas AST e LDH estão presentes em maiores concentrações quando o sêmen não é submetido aos processos de centrifugação, ressuspensão e troca de diluente.

## 6.6 REFERÊNCIAS.

ABELLA, D.F.; DA COSTA, M.; GUÉRIN, Y.; et al. Fertility of undiluted ram epididymal spermatozoa stored for several days at 4°C. **The Animal Consortium**, v. 9, n.2, p.313319, 2015.

AISEN, E.; ÁLVAREZ, H.; VENTURINO, A.; et al. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. **Theriogenology**, v.53, p.1053-1061, 2000.

ALAVREZ, J.G.; LASSO, J.L.; BLASCO, L.; et al. centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damages; separation of human spermatozoa from seminal plasma by dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime. **Human reproduction**, v.8, n7, p.1087-1092, 1993.

AMANN R.P. Can the fertility potencial of a seminal sample be predicted accurately? **Journal of Andrology**, v. 10, p. 89-98, 1989.

ARIFIANTINI, R.I.; PURWANTARA, Motility and viability of friesian Holstein spermatozoa in three different extenders stored at 5°C. **Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture**, v.35, n.4, p.222-226, 2010.

ASSUMPÇÃO, T.I.; YONEYAMA, K.A.G.; PALLAORO, R.; et al. Perfil de proteínas e açúcares do plasma seminal e sua relação com os parâmetros andrológicos de touros da raça nelore. **Bioscience Journal Uberlândia**, v. 29, n. 4, p. 940-945, 2013.

ATAMAN, M.B.; BUCAK, M.N.; ÇOYAN, K. Esterified glucomannan improves aflatoxininduced damage of sperm parameters during liquid storage of ram semen at 5°C. **Cryobiology**, p.1-6,2014.

AZAWI, O.O.; ZNAD, M.MAL-JARRAH, L.H. The Correlation between the Viability of Bovine Spermatozoa Preserved at Ambient Temperature and the Activity of Transferases. **Animal Reproduction Science**, v. 22, p. 319-323, 1990.

BARBAS, J.P.; HORTA, A.E.M.; MARQUES, C.C.; et al. The fertility increase after misoprostol administration is differently expressed when sheep are inseminated with chilled or frozen-thawed semen. **Small Ruminant Research**, v. 113, p. 398-401, 2013.

BERGMEYER, H.U.; HORDER, M.; REJ, R. IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes. **Journal clinical chemical and clinical Biochemical**, v.24, p.481-495, 1986.

BERGSTEIN-GALAN, T.G.; WEISS, R.R.; BERTOL, M.A.F.; et al. Comparação de três métodos de refrigeração do sêmen ovino pelo período de 24 e 48 horas. **Archives of Veterinary Science**, v.21, n.4, p.66-73, 2016.

BITTENCOURT, R, F.; OBA, E.; FILHO, A.L.R, et al. Avanços Na criopreservação do sêmen ovino I: diluidores e crioprotetores. **Ciência Animal Brasileira**, v.14, p. 522536, 2013.

BRINSKO, S.P.; CROCKETT, E.C.; SQUIRES, E.L. Effects of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. **Theriogenology**, vol.54, p.129-136, 2000.

BOUCHARD, G.F.; MORRIS, J.K.; SIKES, J.D; et al. Effects of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. **Theriogenology**, v.34, p.147-57, 1990

BURY, O.; MCERA, V.; LEN, J.; et al. Effects of centrifugation and removal of seminal plasma on motility of fresh boar sperm. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**, v.47, n,4, p. 557-562,2017.

BUSATO, E.M.; ABREU, A.C.M.R.; BERSGSTEIN, T.G.; et al. Efeitos da troca diária de diluente sobre a longevidade do sêmen ovino refrigerado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.369, 2017.

CÂMARA, D.R.; GUERRA, M.M.P. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.1, p.33-40,2011.

CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte: **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, 3ra edição, p.54,2013.

CARDOSO, J.F.S.; PAULA, N.R.O.; UCHOA, D.C; et al. Diferentes concentrações de gema de ovo na qualidade do sêmen canino diluído em ACP®-106 e resfriado a 4 °C. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n.2, p. 146-152, 2010.

CEROVSKY, J.A. A new staining procedure for boar spermatozoa. **Zivocisna Vyroba**, v. 21, p. 351-362, 1976.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3ed. Belo Horizonte, Brasil: CBRA, 2013.

COLENBRANDER, B.; FAZELI. A.R.; VAN BUITEN, A. J.; et al. Assesment of sperm cell membran integrity in the horse. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v, 88, p.49-58, 1992.

CRESPILHO, A. M.; BOSCO, K.Á.; DELL'AQUA, C.P.F.; et al. Can centrifugation force compromise the plasmatic membrane, acrosome and DNA integrity of goat spermatozoa?. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal and Science**, São Paulo, v. 55, n. 3, p. 1-11, 2018.

CUNHA, I. C. N.; LOPES, M. O. Estudo da viabilidade do processo de refrigeração do sêmen canino, utilizando-se diluidores à base de leite e glicina gema. **Revista educação contínuos, CRMV-SP**. São Paulo.V,3, n.1, p. 37-42, 2000.

EL-BADRY, D.; RAWASH, Z.M.; EL-BAKHMY, A.S. Effect of centrifugation, resuspention and concentration of re-added seminal plasma on the quality of cooled stored and frozen-thawed Arabian horse semen. **Journal Egypt Of Veterinary Medicine Association**. v.73, p. 139 – 153,2013.

FALLEIROS, M.B.; BICUDO, S.D.; RODELLO, L.; Implicações do uso do extrato de lbd (lipoproteínas de baixa densidade) ou da gema de ovo “purificada”, sobre a motilidade e morfologia espermática no sêmen ovino refrigerado por 24 ou 48 horas. **Veterinária e Zootecnia**, 20, n.2, p. 307-317,201.

FREITAS, A. C. F. de. Avaliação do sêmen de carneiros submetido à reconcentração por centrifugação da palheta pós-descongelação. 2014. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

GOERICKE-PESCH, S.; KLAUS, D.; FAILING, K.; et al. Longevity of chilled canine semen comparing different extenders. **Animal Reproduction Science**, v.135, p. 97–105,2012.

GONZALEZ, C.I.M.; OBA, E.; BICUDO, S.D. Avaliação do sêmen ovino (*Ovis aries*) congelado em palhetas e “pellets” com diferentes meios diluidores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, P.280-281, 1999.

HISHINUMA, M.; SEKINE, J. Separation of canine epididymal spermatozoa by Percoll gradient centrifugation. **Theriogenology**, v. 61, n. 2–3, p. 365–372, 2004.

HOOGEWIJS, M.; RIJSSELAERE, T.; DE VliegHER.; et al. Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation. **Theriogenology**, v.74, p.118-126,2010

IVANOFF, E. I. On the Use of Artificial Insemination for Zootechnical Purposes in Russia. **Journal of Agriculture Science**, Vol. 12, p.244-256, 1922.

JASKO, D.J; MORAN, D.M.; FARLIN, M.E.; et al. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v.35, n.6, p.1059-1067, 1991.

JASKO, D.J; HATHAWAY, J.A.; SCHALTENBRAND, D.; et al. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology V,3**, P.1241-1252, 1992

KAREKOSKI, M.; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science**, V.107, P.249–256, 2008.

KISER, A.M.; BRINSKO, S.P.; LOVE, C.C.; et al. Relationship of Sperm Quality to Fertility after 4 Days of Cooled Storage of Equine Semen. **Journal of Equine Veterinary Science**,v. 34,p.602-605,2014.

LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.L.; et al. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. **Theriogenology** v.63, p.1584–9, 2005.

LOVE, C.C.; THOMPSON, J.A.; BRINSKO, S.P.; et al. Effect of inter-stallion seminal plasma variability on motility, viability, and DNA integrity of cauda epididymal sperm. **Animal Reproduction Science** 2010.

LOVE, C.C.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D, et al. Effect of daily semen centrifugation and resuspension on the longevity of equine sperm quality following cooled storage. **Theriogenology**, v. 77, p.1911-1917,2012.

MAIA, M.S.; MEDEIROS, I.M.; LIMA, C.A.C. Características reprodutivas de carneiros no Nordeste do Brasil: parâmetros seminais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.175-179, 2011.

MANN, T. Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.37, p.179-188, 1974.

MASOUIDI, R.; SHAHNEH, A.Z.; TOWHIDI, A, et al. Fertility response evaluation of artificial insemination methods in sheep with fresh and frozen-thawed semen. **Cryobiology**, v. 11, n.12, p. 1-19, 2016.

MAXWELL, W.M.C; E JOHNSON, L. A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: The influence of seminal plasma. **Theriogenology**, v.52, n.8, p. 1353 – 1362,1999.

MAXWELL, W.M.C.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. Viabilidade e integridade da membrana dos espermatozoides após diluição e triagem citométrica de fluxo na presença ou ausência de plasma seminal. **Reproduction and Fertility Developmen**, v.8, p.1165-1178, 1997.

MERYMAN, H. T.; WILLIAMS, R. J.; DOUGLAS, M. S. Freezing injury from “solution effects” and its prevention by natural or artificial cryopreservation. **Cryobiology**, v.14, p. 287 – 302, 1977.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Champaign, v. 31, p. 426-428, 1959.

MIRÓ, J.; TABERNER, E.; RIVERA, M.; et al. Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalanian donkey semen. **Theriogenology**, v.72, p.1017–1022, 2009.

MORREL, J.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; JOHANNISSON, A. Single layer centrifugation of stallion spermatozoa improves sperm quality compared with sperm washing. **Reproductive BioMedicine Online**, V. 21, P. 429– 436, 2010.

MORREL, J.M.; JOHANNISSON, A.; STRUTZ, H.; et al. Colloidal Centrifugation of Stallion Semen: Changes in Sperm Motility, Velocity, and Chromatin Integrity during Storage. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.29, N.1, p.24-32, 2009.

MONRREAL, A.C.D.; LIMA, N.N.; DE SOUZA, A.S.; et al. Glicina Gema Leite para criopreservação de sêmen de carneiros sem raça definida. **Agrarian**, v.7, n.23, p.124131, 2014.

MORTON, K.M.; GIBB, Z.; BERTOLDO, M.; et al. Effect of diluent, dilution rate and storage temperature on longevity and functional integrity of liquid stored alpaca (*Vicugna pacos*) semen. **Journal of Camelid Science**,v. 2,p. 15-25,2009.

MURADAS, P. R.; WEISS, R. R.; KOZICKI, L. E. Avanço na avaliação espermática de equinos: revisão. **Revista Acadêmica Ciências Agrária Ambiental**, Curitiba, v. 11, n. 3, p. 299-313, 2013.

NAJAFI, G.; CEDDEN, F.; KOHRAM, H., SHARIF, A.A. The Effects of Using Artificial Insemination Techniques on Reproductive Performance in Ghezel Sheep. **International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research**, v. 2, n.12, p. 2898-2904, 2014.

NISHIKAWA Y. Studies on reproduction in horses. Tokyo: Japan Racing Association Shiba Tamuracho Minatoku, p.265–70,1959.

PICKETT, B.W.; SULLIVAN, J.J.; BYERS, W.W.; et al. Effect of cenrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. **Fertility and Sterily**, v.26:167-174, 1975.

PICKETT, B. W.; BWASH, L.D; VOSS, I.L.; et al. Effect of seminal extenders on equine fertility. **Journal of animal science**, v.40, n.6, p.1136-1143, 1975.

PONLOWHAPAN, S.; ESSE´N-GUSTAVSSON, B.; FORSBERG, C.L. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. **Theriogenology**, V.62, p. 1498–1517, 2004.

QUINN, P.J.; CHOW, P.Y.W.; WHITE, I.G. Evidence that phospholipids protect ram spermatozoa from cold shock at the plasma membrane site. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.60, p.403-407, 1980.

RICCIO, N.; ELLERBROCK, R.E.; CANISSO, I.F.; et al. Motility of Stallion Spermatozoa after Centrifugation and Cooling in INRA96® or Walworth Extender. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v.6, p.143-147, 2016.

RIJSSELARAE, T.; VAN SOOM, A.; MAES,D.; et al. Effect of centrifugations on invitro survival on fresh diluted canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.57, p.1669-1681,2002.

RODELLO, L.; BICUDO, S.D.; FALLEIROS, M.B.; et al. Implicações da redução na concentração de gema de ovo no meio glicina-gema-leite sobre a cinética, morfologia e integridade de membranas espermáticas em sêmen ovino criopreservado. **Veterinária e Zootecnia**. v.18, n.2 p.239-248, 2011.

SAKASHITA, S.M. Efeito da adição de Trolox® e Catalase ao meio Glicina Gema-Leite sobre o sêmen caprino refrigerado por 24 ou 48 horas em sistema de Equitainer®. 2011. Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

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

SCHINDLER, H.; AMIR, D. Longevity of ram sperm in various diluents and At different dilution rates. **Journal Agriculture** v.56, p. 183-189, 1961.



SHAHIDUZZAMAN, A.K.M.; LINDE-FORSBERG, C. Induced immotility during longterm storage at +5 °C does not prolong survival of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.68, P.920–933, 2007.

SHEKARRYZ, M.; DE WIRE, D.M; THOMAS, A.J.; et al. A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by Reactive Oxygen Species. **European Urology**, v.28, p.31-35,1995

SILVA, M.A.; MONREAL, A.C.D. Efeitos da homeopatia combinado com diluente a base de leite de cabra na criopreservação de sêmen de ovinos. **Perspectivas Experimentais e Clínicas, Inovações Biomédicas e Educação em Saúde**, V,1, p.812,2015.

SUDDERTH AK, LOVE CC, VARNER DD, BRINSKO SP, VOGUE J, BLISS S, et al. Centrifugation and re-suspension of cooled semen to improve sperm motility. **Journal Equine Veterinary Science**, v.32, p.515–516, 2012.

TIETZ, N.W. Fundamentals of Clinical Chemistry. W.B. Saunders. Philadelphia, 1986.

TONIOLLI, R.; BARROS, T.B.; TONIOLLI, L.S. et al. Qualidade espermática do ejaculado suíno conservado a 5 °c no diluente acp-103® associado à gema de ovo. **Ciência Animal**, v.23, n.2, p. 45-57, 2013.

TORRES-BOGGINO, F.; SATO, K.; OKA, A.; et al. Relationship among Seminal characteristics, fertility and suitability for semen preservation in Draft Stallions. **Journal of Veterinary Science**, v, 57, n.2, p.225-229, 1995.

VERSTEGEN, J.P.; ONCLIN, K.; IGUER-OUADA. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris–glucose extender: In vitro and in vivo studies. **Theriogenology**, v.64, p. 720-733, 2005

WAITE, J.A; LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; et al. Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation. **Theriogenology**, v.70, p. 704–714,2008.

## 7 ANEXOS.

### ANEXO 1.- CERIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

#### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 079/2017, referente ao projeto “**Efeitos da troca diária de diluente sobre a longevidade do sêmen ovino refrigerado**”, sob a responsabilidade de **Romildo Romualdo Weiss** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 2 de invasividade, em reunião de 04/09/2017.

Vigência do projeto	Janeiro/2018 até Dezembro/2018
Espécie/Linhagem	<i>Ovis aries</i> (ovino) / Dorper
Número de animais	4
Peso/Idade	50 kg / 2 a 4 anos
Sexo	Macho
Origem	Central Alamos de Genética em Palmeira, Paraná

#### CERTIFICATE

We certify that the protocol number 079/2017, regarding the project “**Effect of daily extender exchange on the longevity of cooled ram semen**” under **Romildo Romualdo Weiss** supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), with degree 2 of invasiveness, in session of 09/04/2017.

Duration of the project	January/2018 until December/2018
Specie/Line	<i>Ovis aries</i> (ovine) / Dorper
Number of animals	4
Wheight/Age	50 kg / 2 to 4 years
Sex	Male
Origin	Alamos Genetics Central in Palmeira, Paraná

Curitiba, 2 de setembro de 2017.

Chayane da Roch

**ANEXO 2.**

Formulação do diluidor glicina, 5% de gema de ovo e leite (GGL5%). (Rodello et al., 2011).

<b>COMPONENTE</b>	<b>VOLUME</b>
<b>Fração I</b>	
Solução A+B em partes iguais (mL)	75
Gema de ovo (mL)	5
Orvus Es Paste – OEP – Procter & Gambler (mL)	0,4
Leite desnatado 11% - La Serenissima (mL)	15
Água destilada (mL)	4,6
<b>Fração II</b>	
Solução A+B em partes iguais (mL)	69
Gema de ovo (mL)	5
Orvus Es Paste – OEP (mL)	0,4
Leite desnatado 11% (mL)	15
Glicerol – Sigma, G2025 (mL)	10
<b>Solução A</b>	
Glicina – Sigma, G7126	1,4g
Citrato de Sódio – Sigma, S4641	2,97g
Água destilada	100mL
<b>Solução B</b>	
Frutose – Sigma, F3510	3g
Amicacina	0,04g
Água destilada	100mL

**ANEXO 3.****Solução formol-salina tamponada (HANCOCK, 1957) Solução estoque de NaCl**

Na Cl	9,01g
Água destilada	500 mL

**Solução estoque tampão**Solução 1

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	21,68g
Água destilada	500 mL

Solução 2

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	11,13g
Água destilada	500 mL

**Solução tampão final**

Adicionar 200 mL da solução 1 em 80 mL da solução 2

**Solução formol-salina**

Solução estoque de NaCl	150 mL
Solução estoque tampão	100 mL
Formaldeído 40%	62,5 mL
Água destilada	500 mL

## ANEXO 4. Fluxograma do experimento

