



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

BRUNO FERNANDES DE MEDEIROS

**AVALIAÇÃO DE SÊMEN OVINO REFRIGERADO DILUÍDO
EM ÁGUA DE COCO EM PÓ.**

PATOS - PB

2008

BRUNO FERNANDES DE MEDEIROS

**AVALIAÇÃO DE SÊMEN OVINO REFRIGERADO DILUÍNO
EM ÁGUA DE COCO EM PÓ.**

**Trabalho de Conclusão (monografia)
Curso apresentado ao Curso de
Bacharelado em Medicina Veterinária do
Centro de Saúde e Tecnologia Rural da
Universidade Federal de Campina
Grande, como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Medicina Veterinária.**

Orientador: Professor Dr. Carlos Enrique Peña Alfaro.

PATOS - PB

2008



M488a Medeiros, Bruno Fernandes de.
Avaliação de sêmen ovino refrigerado diluído em água
de coco em pó. / Bruno Fernandes de Medeiros. - 2008.

30 f.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Enrique Peña Alfaro.
Trabalho de Conclusão de Curso - Monografia (Curso
de Bacharelado em Medicina Veterinária) - Universidade
Federal de Campina Grande; Centro de Saúde e Tecnologia
Rural.

1. Sêmen ovino. 2. Sêmen resfriado - ovinos. 3.
Diluentes de sêmen. 4. Teste hiposmótico. 5. Viabilidade
espermática - ovinos. 6. Ovinos Santa Inês - sêmen. 7.
Ovinocultura. I. Alfaro, Carlos Enrique Peña. II.
Título.

CDU:636.5(043.1)

Elaboração da Ficha Catalográfica:

Johnny Rodrigues Barbosa
Bibliotecário-Documentalista
CRB-15/626

BRUNO FERNANDES DE MEDEIROS

**AVALIAÇÃO DE SÊMEN OVINO REFRIGERADO DILUÍNO
EM ÁGUA DE COCO EM PÓ.**

**Trabalho de Conclusão (monografia)
Curso apresentado ao Curso de
Bacharelado em Medicina Veterinária do
Centro de Saúde e Tecnologia Rural da
Universidade Federal de Campina
Grande, como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Medicina Veterinária.**

BANCA EXAMINADORA:

**Professor Dr. Carlos Enrique Peña Alfaro.
Orientador – UAMV/CSTR/UFCG**

**Professora Dra. Norma Lúcia de Souza Araújo.
Examinadora Externa – Centro de Ciências Agrárias – Areia - UFPB**

**Professora Dra. Solange Absalão Azevedo
Examinadora Interna – UAMV/CSTR/UFCG**

Trabalho aprovado em: agosto de 2008.

PATOS - PB

Aos meus pais Rejane Perreira Fernandes de Medeiros e Rubéns Fernandes de Medeiros, por nunca terem medido esforços para que eu pudesse alcançar meus objetivos e por sempre acreditarem no meu esforço e pela dedicação durante minha vida acadêmica;

A minha esposa e grande companheira, Huglênyra Mara;

A minha maior fonte de inspiração, que me reluz esforço, trabalho e perseverança, minha filha, Maria Letícia.

A todos vocês meus eternos agradecimentos e minha gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força para superar os vários desafios que surgiram durante minha vida.

Aos meus pais, pelo apoio, dedicação, compreensão, carinho e por minha educação, pois tudo que sou devo a vocês! *“Vocês são o meu exemplo de Vida”*.

Em especial a minha esposa Huglênyia Mara de Araújo Dantas Fernandes, por fazer parte da minha vida e por amparar-me quando precisei.

Aos meus verdadeiros amigos que me ajudaram e apoiaram nos momentos mais difíceis.

Aos meus familiares, pela torcida e orações.

A todos os Professores da Universidade Federal de Campina Grande, principalmente ao meu orientador Carlos Enrique Peña Alfaro.

Aos funcionários da UFCG, especialmente a Dona Tereza e Vera.

A turma 2004.1 pela força e perseverança em todos os momentos nesta caminhada.

E, agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para que este trabalho pudesse ser concluído.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

	Páginas:
LISTAS DE TABELAS	06
LISTAS DE FIGURAS	07
RESUMO	08
ABSTRAT	09
1-INTRODUÇÃO	11
2-REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1- Sêmen Resfriado	12
2.2- Diluentes de sêmen	13
2.2.1- Diluentes à base de água de coco	13
2.3- Teste de avaliação da integridade da ibrana	14
2.3.1- Teste Hiposmótico	15
3-MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1- Coleta e avaliação do sêmen	17
3.2- Diluição e resfriamento do sêmen	18
3.3- Teste Hiposmótico	18
4-RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5-CONSIDERAÇÃO FINAL	23
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Motilidade individual progressiva no sêmen de carneiro da raça Santa Inês em diferentes momentos pós-diluição com diluentes a base de água de coco, refrigerado a 5°C. Patos 2008.

Tabela 02. Vigor espermático no sêmen de carneiros da raça Santa Inês em diferentes momentos pós-diluição com diluentes a base de água de coco, refrigerado a 5°C. Patos 2008.

Tabela 03. Alterações de cauda utilizando diversas soluções hiposmóticas no sêmen de carneiros da raça Santa Inês. Patos 2008.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Avaliação de sêmen realizada no microscópio. Arquivo do autor

Figura 2: Diluição de sêmen refrigerado a 5°C. Arquivo do autor.

MEDEIROS, BRUNO FERNANDES. Utilização do teste hiposmótico na avaliação de sêmen ovino refrigerado mantido em diferentes períodos pós-diluição. Projeto de Pesquisa. UFCG. 2008. 29p. Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia) em Reprodução Animal. Medicina Veterinária

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade espermática de ovinos da raça Santa Inês utilizando diluentes à base de água de coco, refrigerados a 5° C. Foram avaliados a motilidade individual progressiva, o vigor e a resposta ao teste hiposmótico, nos espermatozoides dos dois ovinos, submetidos à diluição com água de coco, refrigerados a 5° C. Foram utilizadas três soluções, SOLUÇÃO 1 - 0.735g de citrato de sódio e 1.351g de frutose em 100ml de água bi destilada, com osmolaridade de 150 mOsmol /L; SOLUÇÃO 2 - 1.470g de citrato de sódio e 2.702g de frutose em 100ml de água bi destilada, com osmolaridade de 300 mOsmol/L; SOLUÇÃO 3 - 100 ml de água bi destilada. Foram realizadas quatro coletas, em cada reprodutor, com intervalo de uma semana, usando eletroejaculador. O sêmen foi avaliado imediatamente após a coleta, quanto às características macro e microscópicas, e submetidas ao teste hiposmótico (HOST) após 12, 24 e 48 horas. Os resultados mostraram que a motilidade individual progressiva e o vigor espermático não sofreram diminuição significativa nos momentos 12, 24 e 48 horas. Mostra-se ainda, que o uso das soluções hiposmóticas 1, 2 e 3, nos diferentes tempos não mostrou diferença nas alterações hiposmóticas da cauda, concluindo que todas as soluções possibilitam a avaliação da integridade da membrana plasmática

Palavras-chave: teste hiposmótico, ovinos, sêmen

ABSTRACT

MEDEIROS, BRUNO FERNANDES. Use of the hiposmotic test in the evaluation in refrigerated semen ram diluted with coconut water powder-externly .Projeto of Research. UFCG. 2008. 28p. Work of Conclusion of Course (Monograph) in Animal Reproduction. Veterinary medicine

The present work had the aim to evaluate the spermatic viability of ram of the Santa Inês race using externally of coconut water, refrigerated 5th C. were appraised the motility, vigor and the answer to the hiposmotic test, in the spermatozooids of, submitted to the dilution with coconut water, refrigerated á 5th C. three solutions were used, SOLUTION 1 - 0.735g of citrate of sodium and 1.351g of fructose in 100ml of water distilled bi, with osmolarity of 150 mOsmol / L; SOLUTION 2 - 1.470g of citrate of sodium and 2.702g of fructose in 100ml of water distilled bi, with osmolarity of 300 mOsmol/L; SOLUTION 3 - 100 ml of water distilled. Four collections were accomplished, in each male, with interval of one week, using eletroejaculador. The semen was evaluated immediately after the collection, and submitted to the hiposmotic test (HOST) after 12, 24 and 48 hours. The results showed that the progressive individual motility and the vigor didn't suffer significant decrease in the moments 12, 24 and 48 hours. The hiposmotic test solutions showed similar result on the evolution of the plasmatic membrane of the spermatozoa no different was observed between all hiposmotic solution, and we can recommend it for the evolution of the plasmatic membrane integrity.

Word-key: hiposmotic test, ram, semen

1- INTRODUÇÃO

A ovinocultura está presente na história da humanidade como sendo atividade que proporciona a maior fonte de alternativas para subsistência, pois, fornece a lã e pele para vestuário; carne e leite para alimentação.

O Brasil apresenta cerca de 15.588.041 cabeças de ovinos espalhadas em todo seu território, sendo o nordeste a região onde se encontra o maior número de cabeças com aproximadamente cerca de 9.109.668 cabeças de ovinos (IBGE, 2005).

Nos últimos anos vem sendo observado um incremento na exploração ovina dos rebanhos de seleção, com grande valorização de reprodutores e matrizes, o que tem despertado o interesse não somente de criadores como de órgãos públicos do setor agropecuário, assim como vem participando como atividade de subsistência de pequenos produtores, com fortalecimento a agricultura familiar (PEÑA-ALFARO, 2006).

A utilização de tecnologias reprodutivas, a exemplo da inseminação artificial apresenta uma importante ferramenta na melhoria do potencial produtivo dos rebanhos ovinos, principalmente com a utilização de raças especializadas para produção de carne e peles.

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

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

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

Desta forma o presente trabalho tem como finalidade avaliar a viabilidade espermática de ovinos utilizando diluentes à base de água de coco em pó no sêmen refrigerado.

2-REVISÃO DE LITERATURA

2.1-Sêmen resfriado

A inseminação artificial (I.A.) é praticada em muitos países. No entanto, seu uso se restringe a poucos rebanhos, e por isto não é amplamente utilizada. Um dos principais problemas mundiais que reduzem o uso da I.A nessa espécie se deve aos processos de conservação espermática, que favorecem a redução da viabilidade das células, pois quando a fêmea é inseminada pela deposição do sêmen na cérvix a quantidade de espermatozóides que transpõem os anéis cervicais é baixa, resultado em índices de fertilidade insatisfatória (RITAR, 1993).

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

Entre as principais vantagens do resfriamento, está à manutenção da viabilidade espermática por mais tempo, sem que ocorra diminuição na capacidade fertilizante dos espermatozóides. Outro fator positivo é a possibilidade de diminuir o estresse imposto aos reprodutores por ocasião do número sucessivo de cópulas diárias, durante uma estação reprodutiva sob pena de prejudicar os índices reprodutivos do rebanho e, conseqüentemente, onerar o sistema de produção, pois muitas vezes precisa-se aumentar o número de reprodutores.

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

Quando os espermatozóides são armazenados a 5°C, as necessidades metabólicas decrescem a aproximadamente 10% daquele que teriam se estivessem à temperatura de 37°C. Em conseqüência, a produção de catabólitos será menor e a proximidade da

membrana plasmática será mais lenta, de modo que o desgaste da célula não ocorra de forma tão rápida (McKINNON, 1996).

Para o sucesso na preservação dos espermatozóides pelo resfriamento, é necessário seguir uma série de passos que visam à redução nos danos causados às células e que assegurem longevidade *in vitro* e *in vivo*, a saber: taxa da diluição adequada, diluentes, substâncias protetoras, taxas adequadas de resfriamento (FASTAD, 1996) e manutenção em temperaturas específicas que reduzem o metabolismo, minimizem os danos na membrana e não desencadeiem prematuramente a capacitação de ação acrossômica (LOOMIS, 1992).

2.2-Diluentes do sêmen

Segundo PICKET e AMANN (1987), um diluente apropriado à conservação seminal, em geral deve apresentar as seguintes características: pressão osmótica compatível, balanço mineral apropriado, combinação ajustada de nutrientes, capacidade de neutralizar produtos tóxicos originados do metabolismo espermático, proteção contra os danos causados por ação das mudanças de temperatura, bem como proporcionar a estabilidade dos sistemas enzimáticos e a integridade da membrana plasmática.

2.2.1-Diluentes a base de água de coco

A água de coco ou líquido endospermico, proveniente do fruto do coqueiro é uma solução natural e estéril ligeiramente ácida, contendo proteínas, sais, açúcares, vitaminas, gorduras neutras, fatores de crescimento e muito pouco fosfolípídeo (LAGUNA, 1996) possuindo ainda indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, que lhe confere densidade e pH compatíveis com o plasma sanguíneo (BLUME & MARQUES jr., 1994).

Atividades fisiológicas como a floração, expressão sexual, e formação de frutos, são consideradas excelentes para as células (NUNES & SALLES, 1993). No entanto, a utilização de água de coco como diluente se depara com algumas dificuldades de ordem prática, tais como a disponibilidade de frutos com características ideais (fruto com 6 meses de maturação) e a impossibilidade de armazenamento do produto (UCHÔA, 2004). Desse modo, SALGUEIRO et al. (2002) desenvolveram um diluente à base de coco, padronizado

na forma de pó, permitindo a conservação das suas características benéficas e facilitando o seu uso em regiões onde não se dispõem do fruto.

O produto base (líquido endospermico do coco), em sua forma processada, confere estabilidade e longevidade de prateleira, sem problemas de acondicionamento, e supera toda e qualquer tecnologia de conservação, uma vez que mantém as propriedades inerentes do produto original. A uniformidade do produto, obtida mediante rigoroso controle de processamento, em condições específicas, leva a manutenção dos valores agregados do endosperma líquido do coco (NUNES & SALGUEIRO, 2005).

A Introdução do IAA na composição de diluentes convencionais do sêmen e de diferentes espécies conferiu aos espermatozóides um incremento de motilidade, aumentado a taxa de fertilidade, além de permitir sua conservação durante períodos mais longos (CRUZ, 1994; NUNES et al., 1994).

Desta forma, a água de coco tem sido muito utilizada em biotecnologias relacionadas à reprodução animal. Excelentes resultados têm sido obtidos com a utilização da água de coco em estudos de preservação de sêmen de animais domésticos como caprinos (FREITAS, 1988; TONIOLLI, 1889a; ARAÚJO, 1990; SALLES, 1989; RODRIGUES et al., 1994), ovinos (FREITAS, 1992; CRUZ, 1994; SOUZA et al., 1994) suínos (TONIOLLI, 1989b; TONIOLLI & MESQUITA, 1990), caninos (MONTEZUMA Jr. et al., 1994; UCHOA et al., 2002; UCHOA, 2004).

O uso da água de coco está limitado, em primeiro lugar, à inexistência de padronização de insumo tão importante. Fatores como variedade, tipo de cultivar, idade, sanidade e fatores ambientais, influenciam substancialmente sua complexa composição sua labilidade tem inclusive, dificultado os esforços de inúmeros pesquisadores, muitos deles ligados a industrialização, de obter na prateleira a água de coco “in natura”, sob forma estável e duradoura (NEVES, et al 2005).

2.3-Testes de avaliação da integridade da membrana

Para que o espermatozóide seja considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil é necessário que esta célula esteja morfológicamente e metabolicamente perfeita e com membrana plasmática normal. A presença de uma membrana integral é um pré-requisito para que os eventos relacionados ao processo da fertilização, como capacitação espermática, penetração através dos revestimentos do

ovócito, ligação à zona pelúcida, reação acrossômica e fusão com o oolema possam ocorrer (RODRIGUES-MARTINEZ et al. 1997).

2.3.1-Teste Hiposmótico

O teste hiposmótico (HOST), apresenta como princípio a observação de que um espermatozóide, com uma membrana celular integra se colocado em solução hiposmótica, permite a passagem da água pela membrana celular até o restabelecimento do equilíbrio osmótico entre os fluidos extras e intracelulares (SANTOS et al 2001). Este teste foi proposto inicialmente com a finalidade de avaliar a atividade bioquímica da membrana plasmática intacta em espermatozóides humanos e verifica-se que, com o influxo da água para o interior da célula, há um aumento do volume celular com formação de edema e posterior dobramento da cauda (JEYENDRAN et al., 1984).

O teste HOST apresenta importância ao avaliar sêmen que embora mostre bons resultados de motilidade e morfologia espermática, apresentam alterações de funcionalidade espermática em função de dano da membrana plasmática (MELO, 1999). Considera este autor que, apesar de ser um teste relativamente novo para avaliar a integridade funcional da membrana plasmática do espermatozóide, o HOST deve ser considerado como um indicador de fertilidade, já que a viabilidade da membrana é um requisito básico para que ocorra a fertilização.

O HOST tem sido utilizado como protocolo de avaliação da viabilidade funcional da membrana espermática de diversas espécies: humanos (JEYENDRAN et al., 1984), eqüinos (ALVES et al., 2004; MELO, 1999), caninos (KUMI-DIAKA, 1993), ovinos (OBERST et al., 2003; ANDRADE et al, 2007) e caprinos (FONSECA et al., 2001; SANTOS et al., 2001; SALGUEIRO et al., 2003; BITTENCURT et al., 2005).

Nos trabalhos iniciais desenvolvidos por JEYENDRAN et al. (1984), foram testadas soluções com osmolaridades que variaram de 50 a 300 mOsmol, obtendo os melhores índices de reação espermática ao teste ao utilizarem soluções a 150 mOsmol/L, ou menos. Da mesma forma os mesmos autores também testaram diferentes solutos (citrato de sódio, sucrose, melitose, frutose e cloreto de sódio) e associações entre eles, e verificaram que a taxa de reação espermática variava de acordo com a solução usada, dentro da mesma faixa de osmolaridade. Obtiveram os melhores resultados com a

utilização da associação entre citrato de sódio (50%) e frutose (50%) a 150 mOsmol/L, incubada por 30 minutos a 37° C.

MELO (1999), utilizando o teste HOST para a espécie eqüina, observou que, independente do soluto utilizado, maiores taxas de reação ao teste são conseguidas utilizando soluções com 150 mOsmol/L a 50 mOsmol/L, mantendo as amostras por 30 minutos, a 37° C. observaram que nessa faixa de osmolaridade também foram menores as oscilações.

FONSECA et al., (2001) estudando o teste HOST na espécie caprina utilizaram uma solução hiposmótica contendo citrato de sódio (50%) e frutose (50%) em água destilada e testaram osmolaridades que variavam de 50 a 300 mOsmol, verificando que a maior porcentagem de espermatozoides reativos ao teste e com um maior grau de reação (dobramento de cauda e edema) foi encontrada em solução hiposmótica a 125 e 150 mOsmol/L.

ANDRADE (2006), utilizando-se o teste hiposmótico para espécie ovina, verificou que o diluente a base de Tris gema apresentou melhores índices da conservação da integridade da membrana plasmática no intervalo de até 48 horas, e que o diluente a base de leite desnatado mostrou melhores índices quanto à motilidade e vigor.

SANTOS et al., (2001) também encontraram bons resultados, trabalhando com essa mesma combinação de solutos, a 60 mOsmol. Esses autores, porém, trabalharam com um tempo de incubação de 60 minutos, a 37° C. Esse tempo é superior ao preconizado por CAIZA DE LA CUEVA et al. (1997), e citam que o tempo ideal para que ocorram as reações é de 20 a 30 minutos.

Estudos têm demonstrado a correlação do HOST com a fertilidade in vitro do sêmen de touros (ROTA et al., 2000), de hâmsers (JEYENDRAN et al., 1994) e com a mortalidade do sêmen canino descongelado (KUMI-DIAKA, 1993).

BITTENCOURT et al. (2005) comparando diversos crioprotetores no sêmen caprino e o uso do HOST, constataram que os grupos que utilizaram o etilenoglicol como crioprotetor (etileno e etileno+EDTA) foram os mais eficazes em promover a manutenção da integridade morfofuncional da membrana dos espermatozoides caprinos criopreservados. O teste hiposmótico mostrou ser um método eficiente para avaliação da viabilidade da membrana espermática dos caprinos, citando ainda que é necessário o desenvolvimento de novos estudos para a padronização da técnica, com a confirmação dos melhores solutos e da melhor osmolaridade a serem empregados para essa espécie.

3-MATERIAL E MÉTODOS

O Trabalho foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal do Hospital Veterinário do CSTR/UFCG/Campus de Patos. Utilizou-se sêmen de dois reprodutores ovinos da raça Santa Inês com idade variando entre 18 e 24 meses e de fertilidade comprovada.

3.1-Coleta e avaliação do sêmen.

As amostras de sêmen foram coletadas por meio de eletroejaculação e mantidas em banho-maria a 37°C, foram realizadas quatro coletas por cada reprodutor, com intervalo entre as coletas de uma semana. Imediatamente após a coleta, as amostras de sêmen foram avaliadas quanto às características macroscópicas (volume, cor e aspecto) e microscópicas (motilidade de massa e individual progressiva, vigor espermático e morfologia). A motilidade massal ou turbilhonamento foi avaliada colocando uma gota de sêmen sobre lâmina e observação no microscópio ótico na objetiva de 5X, considerando-se uma escala de 0-5, a motilidade individual progressiva e vigor foi avaliado em microscópio ótico com objetiva de 10x, considerando-se uma escala de 0 a 100%, e de 0-5, respectivamente. A morfologia espermática foi avaliada em preparação úmida utilizando solução de formol – citrato (uma gota de sêmen em lâmina sob lamínula), em microscopia de contraste da fase, com objetiva de imersão, contando 100 células.



Figura 1: Avaliação de sêmen realizada no microscópio. Arquivo do auto

3.2-Diluição e resfriamento do sêmen.

Após a avaliação do sêmen cada ejaculado foi diluído. A diluição foi realizada na proporção de 1:9 (sêmen e diluente respectivamente). O diluente utilizado foi a base de água de coco em pó. Após a diluição foi colocado na geladeira a 5° C, e avaliado quanto as características de motilidade progressiva e vigor e teste hiposmótico após 12, 24 e 48 horas.



Figura 2: Diluição de sêmen refrigerado a 5°C. Arquivo do autor.

3.3-Teste hiposmótico.

Para a realização do teste hiposmótico foram colhidas alíquotas de 20µL de sêmen diluído e colocadas em tubos, contendo 1 ml de solução, sendo que durante o processo usou-se três soluções: SOLUÇÃO I - contendo 0.735g de citrato de sódio e 1.351g de frutose, em 100ml de água bi destilada, com osmolaridade de 150mOsmol/L, conforme proposto por HOFFMANN (2003) ; SOLUÇÃO II - contendo 1.470g de citrato de sódio e 2.702g de frutose, em 100ml de água bi destilada, com osmolaridade de 300mOsmol/L; SOLUÇÃO III – 100ml de água destilada. Em seguida, os tubos contendo a solução com o sêmen, foram incubados por 30 minutos, como descrito por MELO (1999) e HOFFMANN (2003).

As avaliações das amostras foram realizadas, através da colocação de alíquotas dessa mistura previamente incubada entre lâmina e lamínula, utilizando-se microscópio de contraste de fase em aumento de 1000 vezes com óleo de imersão. Um total de 100 espermatozoides era contado em diferentes campos.

As células foram classificadas quanto à presença ou não de cauda dobrada, segundo descrito por KUMI-DIAKA (1993). O cálculo do número de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (HO) foi feito por intermédio da fórmula citada por MELO (1999), $HO\% = (\% \text{ de alterações na região da cauda após teste HOST}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda antes do teste HOST})$.

Nesta fórmula de cálculo todas as alterações de cauda, associadas ou não a defeitos de outra região de espermatozóide, foram computadas antes e depois do teste HOST.

Para a análise estatística das características avaliadas, foi utilizado o pacote estatístico GraphPad In Stat. O teste de TUKEY foi realizado na avaliação em motilidade e alterações de cauda. O vigor foi realizado unindo o teste. (Kruski-Wallis)

4-RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas tabelas 01,02,03 encontram-se, respectivamente, os valores de motilidade individual progressiva, vigor espermático e reações ao teste hiposmótico de ovinos da raça Santa Inês submetidas á diluição a base de água de coco resfriado a 5 °C

Tabela 1. Motilidade individual progressiva no sêmen de ovinos da raça Santa Inês em diferentes momentos pós-diluição com diluentes a base de água de coco, refrigerado a 5°C. Patos 2008.

Horário	N	Médias ± desvio
Fresco	08	80,00 ± 5,30 a
12 h	08	66,25 ± 7,44 b
24 h	08	60,00 ± 11,95 b
48 h	08	53,75 ± 10,60 b

Letras diferentes são significantes

Fresco / 12 h= P<0,05, Fresco / 24 h= P<0,001 ,Fresco /48 h= P<0,001

Observa-se na tabela 01 que a motilidade individual progressiva com diluente a base de água de coco sofre uma redução entre os valores do sêmen fresco e do sêmen diluído e refrigerado. O sêmen fresco diferiu com todos os valores dos horários de avaliação pós- diluição e refrigeração. Está redução, se deve provavelmente ao estresse sofrido pelo sêmen em virtude das condições do processo de diluição e refrigeração. A tabela 01 mostra ainda que , não houve significância nos horários com 12, 24 e 48 horas após a diluição, mostrando que a qualidade da motilidade não foi afetada com o aumento do tempo de conservação, sugerindo a utilização desses tempos de conservação as práticas de inseminação artificial a campo.

Segundo (SILVA 1993) motilidade individual progressiva com valores acima de 50% com sêmen refrigerado oferecem bons índices de fertilidade, uma vez que a população

espermática é maior que aquela utilizada no sêmen congelado e as células não sofreram o impacto do processo de congelamento e descongelamento.

A tabela 02 mostra o vigor espermático no sêmen de ovinos da raça Santa Inês em diferentes horários pós-diluição com diluentes a base de água de coco, refrigerado a 5 °C.

Tabela 02. Vigor espermático no sêmen de ovinos da raça Santa Inês em diferentes momentos pós-diluição com diluentes a base de água de coco, refrigerado a 5 °C. Patos 2008.

Horário	N	Médias ± desvio
Fresco	08	3,50 ± 0,75 a
12h	08	2,87 ± 0,35 ab
24h	08	2,25 ± 0,70 b
48h	08	2,00 ± 0,75 b

Letras diferentes são significantes

Fresco / 12 h = ns ,Fresco / 24 h = P<0,05 ,Fresco / 48 h= P< 0,01.

Na tabela 02, os resultados da avaliação espermática mostram que, ocorreram variações significativas entre os valores de sêmen fresco e os após os horários 24 e 48 horas pós-diluição, observou-se ainda que os valores de sêmen fresco e o após o horário 12 horas pós-diluição, não sofreram variações significativas .

Segundo Weitze (2001) a motilidade individual progressiva e vigor dos espermatozóides são importantes parâmetros na avaliação da potencialidade da fertilidade, já que em condições normais somente os espermatozóides com movimentos retilíneos e vigoroso batimento de cauda conseguem ultrapassar a cérvice e a junção útero-tubarica e atingir a local da fecundação no oviduto.

A tabela 3 mostra as alterações de cauda utilizando diversas soluções hiposmóticas no sêmen de carneiros da raça Santa Inês.

Tabela 03. Alterações de cauda utilizando diversas soluções hiposmóticas no sêmen de ovinos da raça Santa Inês. Patos 2008.

Diluyente/Horário	N	Médias	±	Médias	±	Médias	±
		desvio		desvio		desvio	
		Solução A		Solução B		Solução C	
ÁGUA DE COCO							
12h	08	65,37 ± 5,63		58,00 ± 4,60		66,00 ± 8,31	
24h	08	66,12 ± 9,45		64,37 ± 9,54		64,37 ± 6,69	
48h	08	61,75 ± 8,15		55,25 ± 8,73		62,87 ± 3,10	

Não houve significância.

Verifica-se que não houve significância quanto as soluções utilizadas nos diversos horários levando-se a pensar que o uso dessas soluções possibilita uma avaliação da integridade plasmática de forma satisfatória. .

A utilização do teste hiposmótico apresenta resultados satisfatórios, conforme Hofmann (2003), Busch & Waberski (2007), na avaliação da integridade da membrana plasmática da células espermáticas.

5- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Constatou-se que as soluções testadas no teste hiposmótico para a avaliação da integridade plasmática dos espermatozoides comportaram-se de forma satisfatória e que o diluente a base de água de coco em pó apresenta bom resultado na avaliação da qualidade seminal quando conservado até 48 horas e refrigerado a 5°C.

6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANDRADE, A.K.G. Utilização do teste hiposmótico na avaliação de sêmen ovino refrigerado utilizando diluentes a base de Tris-gema e leite desnatado. Patos, 2006. **Monografia em (REPRODUÇÃO ANIMAL DA UFCG-2006)**

ARAÚJO, A. A. *Utilização da água de coco "in natura" com adição de gema de ovo como diluidor do sêmen caprino*. Fortaleza, 1990. **Tese (Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes da Universidade Estadual do Ceará - UECE, 1990).**

BITTENCOURT, R.F., Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. Vol. 6, No 3 (2005).

BUSCH, W.; WABWERSKY, D. **Künstliche Besamung bei Haus-und Nutztieren. Stuttgart: Schattauer, 2007. 320p.**

BLUME, H., MARQUES Jr, A. P. *Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos*. **Rev. Bras. Reprod. Anim. v.18, p.97-104, 1994.**

CRUZ, J. F. *Conservação e fertilidade do sêmen ovino mantido à temperatura de +4°C por um período de 48 horas diluído em frações ativas da água de coco*. Fortaleza, 1994. **Tese (Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes da Universidade Estadual do Ceará – UECE, 1994).**

FASTAD, W. *Semen cryopreservation in dogs and foxes*. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 42, p. 251-260, 1996.

FONSECA, J.F.; TORRES, C.A.A.; ROVAY, H.; BORGES, A.M.; BARBOSA, L.P.; MAFFILI, V.V; FRAGA, D.B.M. *Hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p. 436-457, 2001

FREITAS, J. V. F. *Parâmetros andrológicos e avaliação “in vitro” do sêmen de ovinos deslanados criados na região litorânea do Nordeste brasileiro em estação seca e chuvosa*. Fortaleza, 1992. **Tese (Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes da Universidade Estadual do Ceará – UECE, 1992)**.

FREITAS, J. V. F. *Sincronização do ciclo estral e fertilidade de cabras submetidas a dois níveis de gonadotrofina coriônica (eCG) inseminadas artificialmente*. Fortaleza, 1988. **Monografia (Especialização em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes da Universidade Estadual do Ceará – UECE, 1988)**.

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

IBGE. *Pesquisa da Pecuária Municipal - 2005*. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 24 junho 2007.

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

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

LAGUNA, L. E. *Determinações físico-químicas da água de coco verde em duas variedades “Cocus nucifera” coco da praia e anão*. Fortaleza, 1996. **Monografia**

(Especialização em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes da Universidade Estadual do Ceará - UECE, 1996.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. *Production and storage of goat semen for artificial insemination. Anim. Reprod. Sci.*, v. 62, p. 113-141, 2000.

LOOMIS, P. R. *Factors affecting the success of artificial insemination with cooled, transported semen. In: ANNUAL CONVENTION OF AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 38., 1992, Orlando: AAEP, p. 629-647, 1992.*

McKINNON, A. O. *Artificial insemination of cooled, transported and frozen semen. Austr. Equine Vet. J.*, v. 14, p. 156-175, 1996.

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

MIES FILHO, A. *Inseminação artificial. Porto Alegre: Sulina, 1987. v. 2, p.701.*

MONTEZUMA Jr., P. A., VIANA NETO, R., NUNES, J. F. *Utilização da água de coco "in natura", com adição de gema de ovo, como diluente de congelação do sêmen canino, em paillets de 0,5ml. In: XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA. Anais... Olinda, p.535, 1994.*

NEVES, J. P., NUNES, J. F., MORAES, J. C. F., SOUZA, C. J. H., et al. *Inseminação artificial em pequenos ruminantes. In: GONÇALVES, P. B. D., FIGUEIREDO, J. R., FREITAS, V. J. F. (Org.). Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2. ed. São Paulo, 2005.*

NUNES, J. F., COMBARNOUS, Y., PRYSCILA, L. *Utilisation d'une substance activa "JYP" présents dans l'eau de coco pour la conservation "in vitro" et la fertilité des spermatozoïdes de mammifères. S.I.: Sn., 1994.*

NUNES, J. F., SALGUEIRO, C. C. M. *Atualização em biotécnicas da reprodução animal - caprinos*. In: II CONERA - CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2005, Teresina. **Anais... II Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2005b.**

NUNES, J. F., SALLES, F. G. M. El agua de coco (*Cocus nucifera* L.) “in natura”, integral y adicionada com citoquininas, como diluidor de semen caprino. **Rev. Cient.**, v.3, p.273-281, 1993.

NUNES, J. F., SALGUEIRO, C. C. M. *Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de caprinos e ovinos*. **Rev. Cient. Prod. Animal**, v.1, p.17-26, 1999.

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

PENA-ALFARO, C.E . *Apontamentos do Curso de Biotecnologias da Reprodução nos Animais Domésticos*. UFCG. Patos, 60 p. 2006.

PICKETT, B.W., AMANN, R.P. *Extension and storage of stallion spermatozoa: a review*. **J Eq Vet Sci, Wildomar - California**, v. 7, n. 5, p. 289-302,1987.

RITAR, A. J. *Control of ovulation, storage of semen, and artificial insemination of fibre-production goats in Australia: A review*. **Aust. J. Exp. Agric.**, v. 33, p. 807-820, 1993.

RODRIGUES, A. P. R., TORRES, M. Z. G., OLIVEIRA, L. F., et al. *Água de coco sob a forma estabilizada de gel e sua fração ativa adicionada ou não de gema de ovo como diluidores do sêmen caprino*. In: **XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA. Anais... Olinda**, p.540, 1994.

RODRIGUES-MARTINEZ, H.; ZHANG, B. R.; LARSSON, B. Bovine semen

quality and the ability to produce embryos in vivo and in vitro. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 25, p. 108-126, 1997.

SALGUEIRO, C. C. M., NUNES, J. F., OLIVEIRA, K. L. P., et al. *Utilização de diluentes à base de água de coco in natura e em pó na inseminação artificial programada de cabras*. Rev. Bras. Reprod. Anim., Supl., n.5, p. 96-98, 2002.

SALGUEIRO, C.C. de M.; NUNES, J.F.; MATEOS-REX, E.; CORDEIRO, M.A.; MAGALHÃES, D.M.; CAVALCANTE, J.M.M; PALÁ- CIO, A.R.S. *Avaliação da qualidade do sêmen caprino pós-descongelamento através do teste hiposmótico*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, 2003.

SALLES, M. G. F. *Água de coco (Cocus nucifera L.) "in natura" e sob a forma de gel e estabilizada como diluidor de sêmen caprino*. Porto Alegre, 1989. **Tese (Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRS, 1989)**.

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

SANTOS, A.D.F; TORRES, C.A.A.; FONSECA, J.F.; BORGES, A.M.; ROVAY, H.; GORETTI, R.G.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P.; BARBOSA, L.P.; MAFFILI, V.V.; FRAGA, D.B.M. *Uso do teste hiposmótico (HOST) para avaliar a congelabilidade do sêmen de caprinos das raças Alpina e Saanen, jovens e adultos, submetidos ao manejo com luz artificial*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, 2001.

SOUSA, N. M, TEIXEIRA, M. D. A., OLIVEIRA, L. F. *Água de coco sob a forma de fração ativa liofilizada adicionada ou não de gema de ovo e gel, como diluidor do sêmen ovino*. **In: XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA. Anais... Olinda, p.583, 1994.**

TONIOLLI, R. *Conservação do sêmen suíno em água de coco*. In: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Anais... Belo Horizonte, p.138-142, 1989b.**

TONIOLLI, R. *Estudos das características “in vitro” do sêmen caprino de raças nativas do Nordeste brasileiro diluído em água de coco sob a forma “in natura”, estabilizada e de gel*. **Rev. Bras. Preprd. Anim. v.13, p.209-220, 1989a.** TONIOLLI, R. **Conservação do sêmen suíno em água de coco. In: VIII CONGRESSO.**

TONIOLLI, R., MESQUITA, D. S. M. *Fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído em água de coco estabilizada e com B.T.S.* **Rev. Bras. Reprod. Anim. v.14, p. 249-254, 1990.**

UCHÔA, D. C. *Inseminação artificial em cadelas com sêmen a fresco com diluentes à base de água de coco*. Fortaleza, 2004. **Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará – UECE, 2004)..**

UCHOA, D. C., CARDOSO, R. C. S., SILVA, L. D. M. *Inseminação artificial a fresco em cadelas da raça boxer com diferentes diluidores de sêmen*. **Rev. Bras. Reprod. Anim., supl., n. 5, p.150-152, 2002.**

WATSON, P. F. *The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg yolk lipoprotein*. **J. Reprod. Fertil., v. 62, p. 483- 492, 1981.**

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