

MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA CONGELAÇÃO, DESCONGELAÇÃO E AVALIAÇÃO DO SÊMEN OVINO EM PELLETS¹

OPTIONAL METHODS TO FREEZE, THAW AND EVALUATE RAM SEMEN IN PELLETS

Autor: Cácio do Nascimento Moraes²

Comissão Examinadora: Jairo Pereira Neves³

José Carlos Ferrugem Moraes⁴

Valquíria Hyppolito Barnabe⁵

Cinco experimentos foram delineados objetivando avaliar a capacidade crioprotetora do etileno glicol frente ao glicerol (Experimento I e V), testar um sistema alternativo em substituição ao gelo seco para a congelação em *pellets* (Experimento II), verificar o efeito de três soluções na descongelação (Experimento III) e investigar comparativamente os testes de termo-resistência rápido e lento para avaliação do sêmen ovino congelado em *pellets* (Experimento IV). Após coleta, diluição (1+3/sêmen+diluyente) e equilíbrio à 5°C, cada ejaculado foi dividido em duas alíquotas, sendo uma congelada em gelo seco (Experimentos II, III, IV) e outra em placa de acrílico, sobre o vapor de nitrogênio líquido (Experimentos I, II e V), onde permaneceram por três minutos até a deposição

em nitrogênio líquido. No Experimento I foram utilizadas as concentrações de 0,3M, 0,5M e 0,7M de etileno glicol para comparação com 0,72M de glicerol, cuja concentração foi a mesma para os demais experimentos. Para a descongelação, no Experimento IV, foram utilizados dois *pellets* de cada coleta, sendo um incubado a 37°C por 5 horas (TTL) e outro à 46°C por 30 minutos (TTR) e avaliadas a motilidade e vigor iniciais e finais dos períodos de incubação. Nos Experimentos I e II também foram observadas as lesões de acrossomo. No Experimento V, foi realizada a inseminação cervical superficial com uma concentração mínima de 200×10^6 espermatozoides por dose, em 70 ovelhas com cio sincronizado (esponjas intravaginais, 50mg de MAP + 500 UI de eCG), divididas

¹ Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Fisiopatologia da Reprodução, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em 19.03.96, financiada pela FAPERGS.

² Médico Veterinário, Pós-graduando em Medicina Veterinária, UFSM, Santa Maria, RS.

³ Médico Veterinário, Doutor, Professor Titular, UFSM.

⁴ Médico Veterinário, Doutor, EMBRAPA/CCPSUL, Bagé, RS.

⁵ Médico Veterinário, Doutor, Professor Titular, USP, São Paulo.

em três grupos (etileno glicol 0,5M, glicerol 0,72M e sêmen fresco). O diagnóstico de gestação foi realizado 45 dias após a inseminação. Os experimentos I, II, III, IV foram desenvolvidos em blocos inteiramente casualizados, sendo cada ejaculado ($n = 10$ para o Exp. I e $n = 16$ para os Exp. II, III e IV) considerado um bloco. No Experimento I a motilidade inicial, final e vigor final foram semelhantes para 0,5M de etileno glicol (EG) e 0,72M de glicerol (G), os quais foram superiores aos demais tratamentos. O vigor inicial não demonstrou diferença em nenhum dos tratamentos. Nos Experimentos II e III não houve diferença significativa em nenhum dos tratamentos. No Experimento IV, onde a temperatura e o tempo de incubação não foram os mesmos, foram observadas diferenças na motilidade inicial ($p=0,0026$), na motilidade final ($p=0,0001$), no vigor inicial ($p=0,0001$) e no vigor final ($p=0,0002$). No experimento V, não houve diferença entre o grupo do etileno glicol com os do sêmen fresco e glicerol. Porém ocorreu entre os grupos do sêmen fresco e glicerol ($p=0,0003$). Considerando os resultados obtidos, conclui-se que o etileno glicol utilizado na concentração de 0,5M proporcionou uma melhor proteção acrossomática, semelhante motilidade e vigor à 0,72M de glicerol, que os dois sistemas de congelamento são semelhantes, que o uso das soluções de descongelamento estudadas são opcionais, que os testes de termo-resistência não são equivalentes para avaliação do sêmen ovino congelado em *pellets* e que o etileno glicol é um crioprotetor que deve ser avaliado em um número, de ovelhas, mais representativa, considerando os percentual de prenhez obtido.

Palavras-chave: etileno glicol, inseminação artificial, placa de acrílico, soluções de descongelamento, testes de termo-resistência.

Five experiments were design with the objectives of evaluating the cryoprotectant capacity of the ethylene glycol in relationship to glycerol (Experiments I and V), testing an alternative system instead of dry ice to freeze ram semen in pellets (Experiment II), verifying the effect of three solution for thawing semen (Experiment III) and investigating the efficiency of the fast test of thermo-resistance (TTR; 30 minutes at 46°C) in comparison to the slow test (TT; 5 hours at 37°C) for evaluating ram semen in

pellets (Experiment IV). After collection, dilution (1+3/semen+diluent) and equilibrium at 5°C, semen from each ejaculation were divided in two aliquots. One was frozen in dry ice (Experiments II, III and IV) and the others in acrylic plate over the liquid nitrogen vapor (Experiments I and II). In both methods, the pellets were kept for three minutes before deposition in liquid nitrogen. In experiment I, concentrations of 0.3M, 0.5M and 0.7M of ethylene glycol were compared with 0.72M of glycerol. This glycerol concentration was also used in the other experiments. In the experiment IV, two pellets from each collection of semen were thawed. For thawing, the semen samples were incubated at 46°C or 37°C and the initial and final motility (IM and FM) and vigor (IVi and FVi) were evaluated after incubation time. In experiments I and II, damages of the acrosome were also investigated. The different experiments were performed in a randomized block design. Each ejaculation ($n=10$ in Exp. I and $n=16$ in other in vitro experiments) was considered one block. In experiment I, the semen that were frozen with 0.5M of ethylene glycol showed the IM, FM e FVi similar to those obtained with 0.72M of glycerol. These both treatments were superior to the others. It was not observed statistical difference in regarding to the IVi in the experiment I. Also, all the results were similar among different treatments in experiments II and III. In experiment IV, there were difference between TTR and TT in regarding to the IM ($P=0.0026$), FM ($P=0.0001$), IVi ($P=0.0001$) and FVi ($P=0.0002$). Considering the results obtained, it can be concluded that the ethylene glycol, used in a concentration of 0.5M, produces a higher protection to the acrosome. However, the spermatic motility and vigor are similar when the semen is frozen with 0.5M of ethylene glycol or 0.72M of glycerol. Both systems for freezing semen, dry ice and plate, are similar. Any thawing solution studied in this work is optional and can be chose having analogous results. The TTR and TT are not comparable for evaluating frozen ram semen in pellets. Ethylene glycol, as a cryoprotectant for freezing ram semen, must be evaluated in a larger number of ewes, considering the percentage of pregnancy obtained in this study.

Key words: ethylene glycol, artificial insemination, acrylic plate, thawing solution, tests of thermo-resistance.