

RAFAEL TOAZZA

**INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE NAS CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS
DE CARNEIROS DE RAÇAS LEITEIRAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Alceu Mezzalana

**Lages, SC
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Toazza, Rafael
INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE NAS CARACTERÍSTICAS
REPRODUTIVAS DE CARNEIROS DE RAÇAS LEITEIRAS /
Rafael Toazza. - Lages , 2018.
83 p.

Orientador: Alceu Mezzalira
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Lages, 2018.

1. Congelamento de sêmen. 2. Luminosidade. 3.
Fotoperíodo. 4. FIV heteróloga. 5. Teste de termo
resistência. I. Mezzalira, Alceu . II. Universidade
do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação. III. Título.

RAFAEL TOAZZA

**INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE NAS CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS
DE CARNEIROS DE RAÇAS LEITEIRAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Banca Examinadora:

Orientador: _____

Prof. Dr. Alceu Mezzalira

Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC/CAV)

Membro: _____

Dra. Marina Ragagnin de Lima

UNESP - Jaboticabal

Membro: _____

Dr. Maicon Gaissler Lorena Pinto

Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
(EPAGRI)

Lages, 27 de fevereiro de 2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, por ter me dado a vida, coragem para enfrentar toda esta etapa, discernimento e sabedoria para lidar com as situações.

Aos meus pais, Rudimar e Ivete, por estarem sempre presentes me dando força e entusiasmo para seguir até o fim. Por apoiar as minhas escolhas e me ajudar nos momentos de angústia e incertezas. Obrigado pelo amor, carinho e dedicação que só vocês poderiam me dar. Amo muito vocês.

Ao meu irmão Rudinei, por ser meu companheiro, por me incentivar, me apoiar e auxiliar nas minhas dificuldades e decisões. Junto dele, minha cunhada Fernanda, a quem tenho muito carinho e respeito. Obrigado a vocês pelo apoio.

Ao meu orientador Professor Alceu Mezzalira, que não mediu esforços e fez tudo o que teve ao seu alcance pra me auxiliar, colaborar e permitir que este projeto fosse executado. Obrigado pela orientação, amizade, ensinamentos e oportunidades. Tenho profunda admiração e respeito por sua pessoa e orgulho em dizer que fui seu orientado.

Aos colegas do Laboratório de Reprodução Animal Professor Assim Roberto de Bem do CAV/UDESC, que não mediram esforços para me auxiliar no desenvolvimento deste trabalho e durante toda essa caminhada.

Aos amigos que fiz: Guilherme, Lain, Joana, Renata, Gisele, Aline, Cláudio, Gabriel, e outros tantos que passaram pelo Laboratório no decorrer desses dois anos de estudos, aprendizados, alegrias, brincadeiras. Sou grato pela parceria que firmamos. A Camila, quem conheci no decorrer desses dois anos e que esteve presente sempre me apoiando e incentivando. Obrigado por ser quem você é, ser minha namorada e por significar muito para mim.

A fazenda Pinheiro Seco na pessoa do Paulo Gregianin, por disponibilizar os carneiros e abrir as portas da fazenda para que pudéssemos realizar o experimento. Agradeço também a EPAGRI - Lages, na pessoa do Maicon, por também abrir as portas da empresa e disponibilizar os animais.

Aos Frigoríficos El' Golli e Verdi, por disponibilizar parte do material utilizado durante o experimento.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para que eu alcançasse o meu objetivo. MUITO OBRIGADO!

“Pensamos demasiadamente e sentimos muito pouco. Necessitamos mais de humildade que de máquinas. Mais de bondade e ternura que de inteligência. Sem isso, a vida se tornará violenta e tudo se perderá”. **(Charles Chaplin)**

RESUMO

TOAZZA, Rafael. **Influência da sazonalidade nas características reprodutivas de carneiros de raças leiteiras**. 2018, 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Lages, 2018.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da sazonalidade nas características reprodutivas de carneiros de raças leiteiras. Ao longo de um ano, o sêmen de 13 carneiros Frisona Milchschaft e Lacaune tiveram o sêmen coletado mensalmente, tendo seus parâmetros reprodutivos e características seminais avaliadas. A cada estação do ano, o sêmen coletado foi congelado e descongelado, sendo avaliado quanto a motilidade, vigor, teste de termo resistência (TTR), teste hiposmótico, presença de patologias espermáticas e eficiência na fecundação *in vitro* (FIV) heteróloga com oócitos bovinos. A motilidade progressiva para sêmen fresco na primavera foi superior às demais estações do ano, sendo observada a pior motilidade no inverno. Já o vigor apresentou variações inconstantes ao longo das estações. Defeitos maiores e menores apresentaram variações significativas ao longo dos meses, porém em nenhum deles houve número de anormalidades que possibilitasse classificar os carneiros como inaptos para a reprodução. O perímetro escrotal foi maior durante os meses mais quentes. O inverso ocorreu com a consistência testicular, que aumentou nos meses mais frios e diminuiu nos meses mais quentes. Volume, turbilhão e concentração espermática foram muito variáveis independente do mês, mas provavelmente por efeito do regime de monta intensivo utilizado (dados não publicados). Houve uma influência sazonal na criotolerância, sendo que na avaliação após o descongelamento, observou-se que a sobrevivência do sêmen congelado no outono foi superior ao congelado no verão. Não foram observadas diferenças significativas na avaliação morfológica e na integridade de membrana, nas diferentes estações. Não houve diferença estatística na taxa de recuperação de espermatozoides após submissão ao processo de migração "swim up", nem entre as taxas de clivagem após FIV heteróloga (52,6; 50,5; 46,5 e 45,5%) para verão, outono, primavera e inverno, respectivamente. Houve influência da temperatura ambiente na consistência e perímetro testicular, bem como um efeito da estação do ano na motilidade progressiva e vigor tanto no sêmen fresco como após submissão ao TTR, com maior motilidade na primavera (estação não reprodutiva) em relação ao outono (estação reprodutiva). No inverno, os carneiros apresentaram sêmen de pior qualidade. A sazonalidade influenciou a criotolerância do sêmen de carneiros leiteiros, com maior sobrevivência sendo observada no outono. Mesmo com estas influências, as taxas de clivagem semelhantes após FIV heteróloga, demonstram que é possível congelar sêmen de carneiros leiteiros em qualquer estação do ano, com boa viabilidade. Finalmente, não existe efeito sazonal em relação a morfologia nem a integridade de membrana do sêmen descongelado de carneiros de raças leiteiras.

Palavras-chave: Congelamento de sêmen. Luminosidade. Fotoperíodo. FIV heteróloga. Teste de termo resistência.

ABSTRACT

Toazza, Rafael. **The influence of seasonality on dairy rams reproductive features**. 2018, 83 p. Dissertation (Master in Animal Science). Santa Catarina State University. Post Graduate Program in Animal Science. Lages, 2018.

This work aimed to investigate the role played by seasonality in the reproductive features of dairy rams. Semen was collected monthly for one year from 13 rams from either Frisona Milchschaft or Lacaune breeds in order to evaluate both their reproductive parameters and seminal characteristics. Semen samples frozen at every season were later thawed for assessment of sperm motility and vigor, as well as for survival to the thermal resistance test (TRT) and to the hyposmotic test. The presence of sperm pathologies and the efficiency after heterologous *in vitro* fertilization (IVF) of bovine oocytes were also assessed. The progressive motility for fresh semen during spring was higher than for all the other seasons, while the lowest motility was observed in the winter, whereas the vigor had inconsistent variations over the seasons. Major and minor defects presented significant variations over the months, however none of them showed enough abnormalities to score the rams as unable for reproduction. The scrotal perimeter increased during the warmest months. The consistency had an inverse relation, increasing during the coldest months, and decreasing during the warmest months. Volume, gross motility and sperm concentration varied despite the months, and suffered a possible effect from the intense breeding regimen performed (unpublished data). There was a seasonal influence in the semen cryotolerance, with higher survival rates in autumn frozen semen, in comparison to summer frozen semen. The morphological evaluation and membrane integrity showed no significant differences over the different seasons. There were no statistically differences for sperm recovery rate after swim up, nor in the cleavage rates after heterologous IVF (52.6, 50.5, 46.5 and 45.5%) for summer, fall, spring and winter, respectively. There was an influence of the housing temperature in the testicular consistency and perimeter. There was also an effect of the season on sperm progressive motility and vigor of the fresh semen, as well as after submission to the TRT, with higher motility in the spring (non-reproductive season) in comparison to autumn (reproductive season). In the winter, semen quality was the worst. The seasonality influenced the semen cryotolerance of dairy rams, with better survival rates in autumn. Despite all these influences, the similar cleavage rates obtained after heterologous IVF demonstrate that it is possible to freeze semen from dairy rams at any season of the year, with good viability. Finally, neither sperm cell morphology nor membrane integrity showed seasonal effects on the thawed semen of dairy rams.

Keywords: Freezing semen. Luminosity. Photoperiod. Heterologous IVF. Thermal resistance test.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema da estacionalidade reprodutiva em ovinos.....	27
Figura 2 – Avaliação da circunferência escrotal em carneiros.....	31
Figura 3 – Coleta de sêmen com vagina artificial.....	32
Figura 4 – Fórmula para cálculo de concentração espermática em câmara de Neubauer.....	45
Gráfico 1 – Variação mensal no perímetro escrotal (PE) e consistência testicular observados em carneiros de raças leiteiras durante o período de um ano.....	50
Gráfico 2 – Variação mensal no volume ejaculado, turbilhão e concentração espermática ($\times 10^9/\text{mL}$), observados em carneiros de raças leiteiras durante o período de um ano.....	53

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Motilidade progressiva e vigor do sêmen fresco de carneiros de raças leiteiras, avaliados pós coleta e durante o teste de termo resistência.....55
- Tabela 2** – Médias das porcentagens de defeitos espermáticos observados mensalmente no sêmen de carneiros de raças leiteiras.....56
- Tabela 3** – Motilidade progressiva e vigor espermático no pós-descongelamento do sêmen ovino, congelado nas distintas estações do ano.....66
- Tabela 4** – Motilidade progressiva do sêmen ovino fresco e descongelado, e taxa de sobrevivência à criopreservação nas diferentes estações do ano.....68
- Tabela 5** – Viabilidade espermática determinada pela morfologia e integridade de membrana plasmática no sêmen ovino congelado nas diferentes estações do ano..... 69
- Tabela 6** – Recuperação espermática, motilidade progressiva e vigor espermático de sêmen ovino, após Swim up e taxa de clivagem na FIV heteróloga com oócitos bovinos.....70

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albumina Sérica Bovina
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
ECC	Escore de Condição Corporal
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
HOS	Teste Hiposmótico
LH	Hormônio Luteinizante
PE	Perímetro escrotal
PHE	Penicilamina, Hipotaurina, Epinefrina
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SFB	Soro Fetal Bovino
SOF	Synthetic oviduct fluid
TALP	Tyrodé's albumina lactato e piruvato
TTR	Teste de termo resistência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1	SAZONALIDADE REPRODUTIVA NA ESPÉCIE OVINA	25
2.1.1	Sazonalidade reprodutiva em carneiros	28
2.2	AVALIAÇÃO ANDROLÓGICA	30
2.2.1	Biometria testicular	30
2.2.2	Espermograma	31
2.2.2.1	<i>Coleta do sêmen</i>	31
2.2.2.2	<i>Características do ejaculado ovino</i>	32
2.2.2.3	<i>Testes in vitro de avaliação seminal</i>	37
3	CAPÍTULO 1. AVALIAÇÃO MENSAL DA FERTILIDADE DE CARNEIROS DE RAÇAS LEITEIRAS	41
3.1	INTRODUÇÃO	41
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.2.1	Escore de Condição Corporal (ECC)	42
3.2.2	Características Testiculares	43
3.2.3	Coleta de sêmen	43
3.2.4	Volume ejaculado e Aspecto seminal	43
3.2.5	Turbilhão ou movimento em massa	44
3.2.6	Motilidade progressiva e vigor espermático	44
3.2.7	Concentração espermática	44
3.2.8	Morfologia espermática	45
3.2.9	Teste de Termo Resistência	45
3.2.10	Análise estatística	46
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.4	CONCLUSÕES	56

4	CAPÍTULO 2. CARACTERÍSTICAS DE CONGELABILIDADE E FECUNDIDADE DO SÊMEN OVINO, CONGELADO NAS DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO	59
4.1	INTRODUÇÃO	59
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	60
4.2.1	Congelamento do sêmen	60
4.2.2	Teste de termo resistência (TTR)	61
4.2.3	Teste Hiposmótico (HOS)	61
4.2.1	Morfologia espermática	62
4.2.2	Teste de migração ascendente “Swim-up”	62
4.2.3	Fertilização <i>in vitro</i> (FIV) heteróloga	63
4.2.4	Análise estatística	63
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.4	CONCLUSÕES	70
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1 INTRODUÇÃO

A sazonalidade da reprodução é um processo fisiológico adaptativo utilizado pela maioria dos animais selvagens. Consiste na restrição da atividade reprodutiva a uma determinada época do ano, de modo que os nascimentos ocorram num momento favorável visando a sobrevivência dos recém-nascidos, em função das mudanças de temperatura e oferta de alimentos (LINCOLN; SHORT, 1980). Não há dúvidas que uma estação reprodutiva definida pode ser uma importante estratégia para sobrevivência de algumas espécies animais (ROSA; BRYANT, 2003). Entretanto, a seleção genética dos animais de produção resultou no prolongamento da fase reprodutiva ou mesmo na perda da influência sazonal sobre essa atividade. Todavia, os ovinos apesar de serem animais de produção e sofrerem constante melhoramento genético, ainda mantêm a característica de estacionalidade reprodutiva.

O fotoperíodo anual é indicado como o fator desencadeante deste fenômeno, haja visto que, é nas épocas de menor incidência luminosa que estes animais manifestam a atividade reprodutiva (OLIVEIRA, 2012). Mesmo assim, outros fatores, tais como temperatura ambiente, estado nutricional, interação social, parto e lactação, funcionam como moduladores da sazonalidade reprodutiva (HAFEZ; HAFEZ, 2004). A adaptação às características cíclicas apresentadas pela maioria dos ambientes terrestres é um mecanismo importante para manutenção da vida. Neste contexto, mecanismos temporais que desencadeiam ritmos endógenos diários (circadianos) e sazonais exercem efeitos reguladores sobre a fisiologia e comportamento animal (GERLACH; AURICH, 2000). Portanto, compreender a funcionalidade do organismo animal frente às variações ambientais e sazonais permite entender os fatores envolvidos no metabolismo e comportamento, podendo auxiliar no manejo reprodutivo, na seleção de raças ou linhagens e ainda otimizar as biotécnicas utilizadas na conservação de material genético.

Todas as raças de ovelhas oriundas de regiões de clima temperado são sensíveis às mudanças no fotoperíodo. Raças originárias de países de clima temperado não mudam expressivamente a duração da estação reprodutiva quando deslocadas para climas tropicais. Além disso, grande parte dos animais apresenta uma estação de anestro, nestas condições. Os ovinos originários de altas latitudes são normalmente submetidos a grandes variações luminosas ao longo do ano e observa-se que, na ausência desta variação, parecem manifestar o mesmo padrão

sazonal de seus ancestrais, sugerindo um componente genético na sazonalidade reprodutiva (LINCOLN et al., 1990).

No Brasil, a ovinocultura vem se destacando entre os pequenos, médios e grandes produtores, como alternativa de produção e renda. Por isso, existe uma grande necessidade de se conhecer o material genético e o potencial reprodutivo e produtivo dos animais (PACHECO; QUIRINO, 2010).

A ovinocultura leiteira é uma atividade recente no Brasil, tendo iniciado com maior expressão em 1992, quando foram importados os primeiros ovinos da raça Lacaune, provenientes da França (BRITO et al., 2006). Estes animais tiveram como destino o estado do Rio Grande do Sul, originando, a partir de então, a maioria dos rebanhos existentes no Brasil. Os ovinos da raça Milchschaft foram introduzidos anos mais tarde, por volta de 2008, sendo importados de países como Uruguai e Argentina. Assim, os rebanhos de ovinos leiteiros estão sendo trabalhados a poucas décadas no Brasil, sendo uma atividade ainda incipiente em relação a produção de leite bovino já consolidada (BIANCHI et al., 2016), sendo que o leite ovino contribui com apenas 0,002% da produção nacional de leite entre as diferentes espécies.

Conforme Bianchi et al. (2016), o rebanho nacional de ovinos de leite, chega quase a 7 mil animais, sendo Santa Catarina o estado com maior produção leiteira, com cerca de 300 mil litros produzidos anualmente, e o detentor do maior rebanho de matrizes (cerca de 2.400 fêmeas).

Os ovinos Lacaune e Milchschaft são originários de países europeus e estão disseminados no mundo todo. No Brasil estão distribuídos, sobretudo, na região sul, especialmente em Santa Catarina e Rio Grande do Sul, onde são criados voltados para a produção de queijos finos, iogurtes e sorvetes. As ovelhas da raça Lacaune, originárias da França, são excelentes produtoras de leite, chegando a produzir cerca de 1,5 L/dia no pico de lactação, sendo este destinado a produção de queijos, principalmente tipo Roquefort. Os animais da raça Milchschaft produzem leite rico em gordura e proteína (6,5% e 4,5% respectivamente), sendo ideal para produzir queijos finos de ótima qualidade, devido ao alto rendimento e persistência de lactação. Por serem raças de dupla aptidão, são economicamente interessantes, pois as fêmeas são destinadas a produção leiteira e venda de matrizes, e os machos podem servir como reprodutores ou destinados para abate, produzindo uma carne de excelente qualidade (CASA DA OVELHA, 2015).

Apesar de ser uma atividade recente, a ovinocultura leiteira pode ser vista como uma alternativa sustentável, de baixo investimento inicial e de fácil adoção pela mão de obra familiar (SILVA, 2014). Isto se justifica pela característica do leite ovino, que possui alta concentração de sólidos totais, tais como gordura e caseína, possuindo características desejáveis para a indústria de processamento. O leite é empregado para fabricação de queijos e iogurtes, gerando um expressivo valor agregado no produto final, contribuindo no aumento da renda do produtor (SILVA, 2014), tornando a atividade economicamente viável para pequenas e médias propriedades.

Por suas características, a ovinocultura leiteira tem gerado uma demanda significativa por tecnologias que possibilitem manter a produção leiteira constante o ano todo. Essa busca, tem se concentrado principalmente na sazonalidade reprodutiva da espécie, buscando dessa forma, minimizar ou inibir o efeito do fotoperíodo sobre a reprodução. Nas fêmeas, o desenvolvimento de protocolos de sincronização e indução do cio, fora da estação reprodutiva, tem se mostrado eficientes para obtenção de partos o ano todo. Entretanto, nos machos, o congelamento de sêmen, ainda apresenta dificuldades em produzir resultados satisfatórios. Muito disso, se deve aos meios utilizados no processo de congelamento e o processo de criopreservação em si. Porém, ainda são escassos os estudos sobre o efeito do fotoperíodo sobre a atividade reprodutiva dos carneiros, e esse (fotoperíodo) pode ser um fator muito influenciador, tanto dos resultados obtidos com o congelamento de sêmen, como das taxas de prenhez quando realizada monta natural ao longo do ano.

Assim, sabendo-se que a espécie ovina apresenta sazonalidade reprodutiva e pela escassez de estudos avaliando a qualidade seminal dos reprodutores dessas duas raças ao longo do ano, fica caracterizada a necessidade destas investigações. Este estudo foi conduzido com o intuito de avaliar o efeito da sazonalidade sobre a qualidade do sêmen fresco de carneiros de raças leiteiras ao longo do ano, e quando este for submetido ao processo de criopreservação nas diferentes estações. Buscando assim, otimizar o uso dos reprodutores e uma melhor estação para congelamento de sêmen.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SAZONALIDADE REPRODUTIVA NA ESPÉCIE OVINA

O processo reprodutivo dos mamíferos selvagens e domésticos é caracterizado por períodos alternados de atividade e inatividade reprodutiva. Essa condição, está muito associada às mudanças na estação do ano, gestação, lactação e contínuas mudanças sexuais em função das fases de vida dos animais (SÁ; SÁ, 2006). Essencialmente, esse mecanismo procura ajustar os momentos em que as necessidades energéticas dos animais são maiores (fase final do desenvolvimento fetal, fase inicial da lactação e desenvolvimento da cria) ao período do ano em que as condições climáticas e a disponibilidade de alimentos são vantajosas. Por outro lado, a sazonalidade reprodutiva tende a concentrar os partos num período curto de tempo, conferindo assim, vantagem na luta pela preservação das espécies, principalmente das que são alvo de predação (VALENTIM et al., 2006). A atividade reprodutiva na espécie ovina segue um padrão restrito a determinados períodos, conferindo a denominação de espécie poliéstrica estacional. Sob influência do fotoperíodo, a reprodução desses animais é marcada por épocas de ausência de comportamento sexual e outras em que há o retorno à ciclicidade (OLIVEIRA, 2012).

Os ovinos são considerados poliéstricos sazonais, ou seja, apresentam um padrão sazonal de reprodução (ZIEBA et al., 2011), mais especificamente de dias curtos, época do ano quando o fotoperíodo (número de horas-luz do dia) é menor, permanecendo em anestro no restante do período. Este efeito é definido primeiramente pela latitude e em segundo lugar pela raça (FONSECA, 2006). A origem geográfica e a latitude onde se encontram são fatores que influenciam o efeito da luz sobre a atividade reprodutiva da espécie. Os ovinos originários de regiões temperadas ou frias, do globo terrestre, apresentam uma atividade reprodutiva sazonal, que é ditada pelo ciclo anual de variação do período diário de luz (VALENTIM et al., 2006). Neste contexto, nos animais originários ou localizados em regiões próximas da linha do equador, a estacionalidade reprodutiva não é tão marcante (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Já nas regiões de clima temperado a atividade reprodutiva ocorre durante o outono e inverno, períodos de menor incidência luminosa (AZEVEDO et al., 2008).

Segundo Leboeuf et al. (2000), a duração da estação reprodutiva é inversa à latitude, sendo maior quando a latitude é menor. Desta forma, maiores latitudes causam marcada estacionalidade em pequenos ruminantes. No hemisfério Sul, independente da especialização de produção ou raça, a estacionalidade reprodutiva dos ovinos ocorre entre os meses de março a maio, ou mais especificamente, no outono (BICUDO et al., 2005). Todavia, falta de alimentos e temperaturas altas restringem a atividade sexual, podendo afetar a atividade reprodutiva durante alguns meses do ano (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

O fotoperíodo afeta diretamente a atividade reprodutiva dos ovinos, através do sistema neuroendócrino, e indiretamente através da disponibilidade de alimentos (VALENTIM et al., 2006). A estacionalidade reprodutiva é regulada pela glândula pineal que produz o hormônio melatonina (MACCHI; BRUCE, 2004), que é produzido e secretado de forma rítmica durante a noite (THIÉRY et al., 2002; HAFEZ e HAFEZ, 2004) e produzido em maior concentração nos períodos de menor duração da luz do dia (AZEVEDO et al., 2008). A informação luminosa, captada pela retina, é transmitida por via nervosa, até a glândula pineal, condicionando a secreção de melatonina. Este hormônio é produzido segundo um ritmo endógeno diário, definido pelos núcleos supraquiasmáticos, sincronizado pelo fotoperíodo diário pela ação da luz (VALENTIM et al., 2006). Conforme os dias começam a ficar mais curtos, a exposição dos animais à melatonina aumenta, informando ao organismo a duração da noite e o correspondente período do ano (SRINIVASAN et al., 2009).

Nos ovinos, espécie considerada de dias curtos, o aumento da secreção de melatonina estimula a secreção de Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo. No caso de animais de dias longos, como os equinos, o aumento da exposição à melatonina tem efeito contrário, inibe a secreção de GnRH pelo hipotálamo. Desta forma, as diferenças na extensão do dia são capazes de ligar ou desligar a atividade sexual de forma espécie-específica (SRINIVASAN et al., 2009).

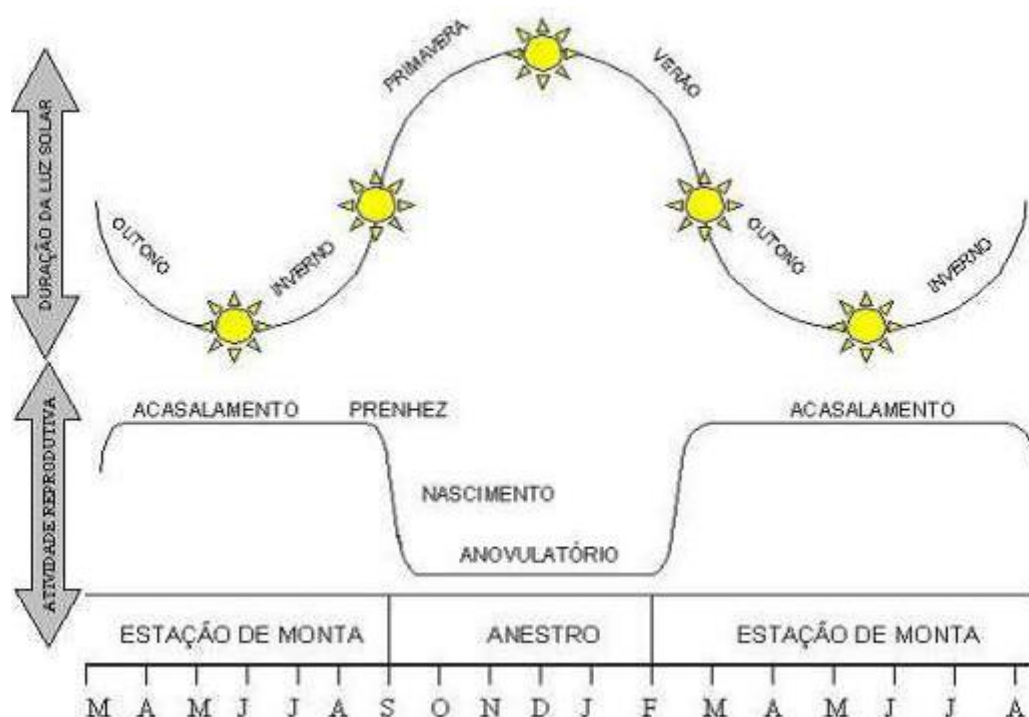
Durante a estação reprodutiva dos ovinos, a redução da luminosidade diária estimula uma maior produção e secreção de melatonina pela glândula pineal, elevando a produção de gonadotrofinas pela hipófise. Assim, estes acabam manifestando atividade reprodutiva, apenas na época do ano em que o número de horas luz dos dias são menores (OLIVEIRA, 2012). Embora a melatonina atue em vários níveis do eixo reprodutivo, sua ação principal dá-se a nível do sistema nervoso

central, relacionado a modificações da frequência de liberação de GnRH/Hormônio Luteinizante (LH) e da atividade das gônadas (VALENTIM et al., 2006).

Conforme Valentim et al. (2006), a ação da melatonina pode ser comprovada através da utilização de implantes de melatonina durante o anestro dos animais, possibilitando a obtenção de resultados reprodutivos semelhantes aos que ocorrem durante a estação reprodutiva. Já quando os ovinos são sujeitos a um regime luminoso de “dias longos”, reduz-se a secreção de GnRH/LH e, conseqüentemente, deprime a atividade reprodutiva. Entretanto, é importante ressaltar que além da sazonalidade, outros fatores, como os nutricionais e climáticos, podem influenciar negativamente a reprodução de pequenos ruminantes, reduzindo a fertilidade e a prolificidade do rebanho, mesmo em locais de baixa latitude (OLIVEIRA, 2012).

Um esquema do princípio fisiológico da estacionalidade reprodutiva em ovinos, diretamente ligado à luminosidade solar, pode ser observado na Figura 1.

Figura 1 – Esquema da estacionalidade reprodutiva em ovinos.



Fonte: GRANADOS (2006).

2.1.1 Sazonalidade reprodutiva em carneiros

A reprodução dos carneiros é controlada através de modificações que ocorrem no eixo gonadotrófico, por meio de variações na secreção de LH pulsátil, regulada pela produção e secreção de melatonina (THIÉRY et al., 2002). A maior liberação de GnRH pelo hipotálamo, e de LH, que age sobre as gônadas, é nos períodos de menor incidência luminosa. Sendo assim, é durante o fotoperíodo decrescente que se observa maior diâmetro testicular, produção de testosterona e atividade sexual dos machos (DELGADILLO et al., 1992). A produção de testosterona e dihidrotestosterona que atuam sobre a fisiologia das glândulas anexas, também é influenciada pelo fotoperíodo, exercendo grande influência sobre a funcionalidade dessas glândulas (CUNHA et al., 2002; LA FALCI et al., 2002). Portanto, a atividade reprodutiva dos carneiros é influenciada pelo fotoperíodo (FONSCECA, 2005).

A melatonina age diretamente na produção e secreção de GnRH/LH e na atividade das gônadas, em ovinos. Esta ação é promovida através de dois mecanismos complementares: modulação direta da secreção de GnRH/LH (esteroide-independente) e alteração da sensibilidade do eixo hipotálamo-hipofisário face a retroalimentação negativa exercida pelos hormônios esteroides gonadais (esteroide-dependente). Nos carneiros, o anestro sazonal se apresenta numa redução pouco acentuada da secreção de GnRH/LH, uma vez que a retroalimentação negativa exercida pelos esteroides sexuais sobre a frequência de secreção desses hormônios é menos eficaz do que nas fêmeas (VALENTIM et al., 2006).

Como a melatonina tem efeito estimulatório sobre os hormônios reprodutivos, os pequenos ruminantes acabam se reproduzindo apenas na época do ano em que o número de horas luz dos dias são menores (OLIVEIRA, 2012). Segundo Thiéry et al. (2002), como a produção e secreção de melatonina regula a atividade reprodutiva dos carneiros, estes acabam apresentando maior atividade reprodutiva durante o período do ano em que o fotoperíodo é decrescente. Neste sentido, Casão et al. (2013), observaram que a administração exógena de melatonina em carneiros da raça Aragonesa, fora da estação reprodutiva, foi capaz de induzir aumento nas concentrações de melatonina endógena, testosterona e 17-beta estradiol, além de elevar a atividade da glutathione peroxidase e glutathione reductase (enzimas antioxidantes), mostrando um efeito benéfico à manutenção da integridade espermática. As enzimas antioxidantes impedem a formação de espécies reativas de

oxigênio (ROS) e apoptose do DNA espermático, evitando assim a redução da capacidade fertilizante dos espermatozoides. Portanto, a melatonina além de regular a reprodução dos ovinos tem papel fundamental na manutenção da fertilidade dos carneiros.

O período compreendido como fase de transição entre estação reprodutiva e não reprodutiva é marcado por diversas alterações no sistema reprodutivo dos ovinos. Estas constituem expressiva parcela da ineficiência reprodutiva dos rebanhos, principalmente por afetarem os carneiros que são os principais responsáveis pela fertilidade (DANTAS, 2009). Durante essa fase são observadas diminuição no perímetro escrotal e peso testicular, no volume ejaculado, na concentração espermática, além de significativo aumento de anomalias nos espermatozoides (SOUSA, 2010). Conforme Sá; Sá (2006), os machos de todas as espécies animais apresentam produção espermática durante o ano todo, entretanto, em ovinos, a capacidade fertilizante é superior no outono e inferior na primavera, comprovando o efeito marcante do fotoperíodo. Todavia, a atividade reprodutiva dos carneiros pode ser afetada por inúmeros fatores, os quais atuam na fisiologia testicular e das glândulas acessórias (SÁ; SÁ, 2001).

O fotoperíodo e a variação estacional da temperatura ambiente afetam os ciclos sexuais anuais (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Segundo Rege et al. (2000), a sazonalidade reprodutiva dos carneiros criados em regiões de clima temperado, ocorre em virtude do fotoperíodo e temperatura que marcam a estação do ano. Já nas regiões tropicais, a sazonalidade está mais relacionada a quantidade e qualidade da forragem na estação seca. Conforme Maia et al. (2011), a umidade relativa e a temperatura do ambiente também interferem na capacidade reprodutiva dos ovinos, pois o aumento de temperatura corpórea, acarreta em aumento da temperatura dos testículos causando degeneração do parênquima (HAFEZ; JAINUDEEN, 2004), levando principalmente a queda da motilidade e aumento da porcentagem de espermatozoides anormais (COELHO et al., 2008).

A porcentagem de espermatozoides vivos e normais é um indicador fundamental para prever a função testicular. Além disso, uma das melhores formas para se avaliar o efeito da estação do ano sobre a viabilidade espermática, é o número total de espermatozoides normais (VIEIRA et al., 2008). Variações de 5 - 8% nas anormalidades morfológicas dos espermatozoides são normalmente observadas durante a estação reprodutiva, sendo que fora dela são encontradas cerca de 10 -

18% de anormalidades espermáticas (TULI; HOLTZ, 1995). Santos et al. (2006), induzindo fotoperíodo artificial em bodes, observaram que as alterações morfológicas dos espermatozoides, que chegaram a aproximadamente 20% antes do tratamento, reduziram para 16,4% com o tratamento de luz artificial, comprovando a influência do fotoperíodo sobre as características seminais.

2.2 AVALIAÇÃO ANDROLÓGICA

O objetivo da realização do exame andrológico é determinar se os machos são férteis, subférteis ou estéreis, de modo que estes possam ou não ser descartados do rebanho. Este é o teste mais acurado da fertilidade de um reprodutor e da sua capacidade de fecundar uma fêmea fértil (GONÇALVES et al., 2008). Na avaliação andrológica rotineira de reprodutores, avaliações de sêmen são realizadas para predição da fertilidade, sendo convencionalmente feitas avaliação de motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática, na tentativa de obter informações sobre o estado da espermatogênese e do potencial gamético (CORREA et al., 1997). Este método de avaliação a campo é indicado para seleção e comercialização de reprodutores, diagnóstico de subfertilidade ou infertilidade, diagnóstico da ocorrência da puberdade (FOLHADELLA, 2008; GONÇALVES et al., 2008) e a variação sazonal dessas características ao longo do ano em carneiros.

2.2.1 Biometria testicular

A avaliação da circunferência escrotal é fundamental para avaliar a capacidade de um reprodutor produzir espermatozoides, bem como é o melhor método de avaliar a potência espermatogênica (SINGH, 2006). É nos testículos que se encontram os túbulos seminíferos onde ocorre a espermatogênese, sendo que estes ocupam 85 a 86% do volume testicular dos ovinos (WROBEL et al., 1995). Portanto, o tamanho testicular está diretamente relacionado ao número de túbulos seminíferos e a capacidade de produção de espermatozoides (GONÇALVES et al., 2008). Yarney et al. (1990), observaram em carneiros Suffolk uma correlação significativa entre a circunferência escrotal, produção espermática, número de coberturas, motilidade e concentração de espermatozoides. No Brasil, o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA - 2013) estabelece que a circunferência escrotal em carneiros é

variável entre as raças, entre faixas etárias e de acordo com a época do ano. Porém, é desejável um padrão mínimo de 30 cm de circunferência escrotal para carneiros sexualmente maduros.

Figura 2 - Avaliação da circunferência escrotal em carneiros



Fonte: Próprio Autor, 2017.

2.2.2 Espermograma

2.2.2.1 Coleta do sêmen

A coleta do sêmen pode ser realizada através do uso de eletroejaculador ou vagina artificial (FOLHADELLA, 2008, SILVEIRA 2008), sendo a vagina artificial com uso de manequim o método mais fisiológico, pois simula as condições da vagina e assemelha-se à monta natural, permitindo que o animal ejacule naturalmente (HAFEZ; HAFEZ, 2004). O sêmen é colhido em condições próximas da ideal para posterior análise com finalidade de exame espermático e emprego para processamento. Esta técnica pode ser realizada com a utilização de manequins ou fêmea (FEITOSA, 2004).

A coleta por eletroejaculação também é uma alternativa, entretanto promove algumas alterações na composição do sêmen, tais como maior volume ejaculado e menor concentração espermática, muito em função de maior estimulação das glândulas acessórias, que são responsáveis pela produção de líquido seminal. Este método geralmente é indicado para machos que não realizam o salto e/ou não aceitam

a vagina artificial, servindo apenas para obtenção de amostra para espermograma (REICHENBACH et al., 2008). Também, quando se utiliza eletroejaculação, o carneiro pode urinar, verificando-se um forte odor, sêmen amarelo e diluído (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Além disso, promove um maior estresse ao animal, em virtude dos estímulos elétricos necessários para promover a ejaculação.

Figura 3 - Coleta de sêmen com vagina artificial



Fonte: Próprio Autor, 2017.

2.2.2.2 *Características do ejaculado ovino*

De acordo com Singh (2006), o exame da qualidade seminal deve ser realizado com sêmen fresco. O sêmen é composto basicamente por plasma seminal e espermatozoides. O plasma seminal é o meio de suspensão e o veículo de transporte dos espermatozoides, além de fornecer elementos essenciais à manutenção e desempenho dos espermatozoides (GONÇALVES et al., 2008) nos carneiros.

2.2.2.2.1 *Aspecto do sêmen*

O aspecto do sêmen é representado pela coloração e aparência que dependem da concentração espermática e possível presença de elementos, sendo a avaliação realizada visualmente (JACOB et al., 2008). Hafez; Hafez (2004), descrevem que o sêmen deve ser relativamente uniforme e de aparência opaca, o que indica alta concentração espermática. Segundo Jacob et al. (2008) e Silveira (2008), a coloração normal geralmente varia de esbranquiçada, branca, marfim ou amarelada, ou ainda

de acordo com Hafez e Hafez (2004), alguns reprodutores podem apresentar coloração amarelada do sêmen, devido à presença de riboflavina que é inócua. Alterações de coloração como vermelha, marrom e cinza-escura que são indicativos de presença de sangue vivo, sangue hemolisado e sujeira, respectivamente, ou ainda apresentar-se com aspecto coalhado, contendo grumos de material, indicando infecção, não devem ser usados (JACOB et al., 2008; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O odor característico normal do sêmen é semelhante ao da gema de ovo. As alterações geralmente ocorrem com a presença de urina no sêmen e nos processos infecciosos (GONÇALVES et al., 2008). Alterações de coloração também podem ser examinadas através da avaliação do odor do ejaculado, uma vez que esse é um bom indicativo de alteração na composição de sêmen. A presença de riboflavina pode ser diferenciada da presença de urina através do odor.

2.2.2.2.2 Volume ejaculado

O volume ejaculado em ovinos varia de 0,5 a 3mL, sofrendo influência do regime de serviço, método de colheita, tempo de excitação, entre outros (NEVES et al., 2008). Tutida et al. (1999), observaram redução de volume ejaculado em carneiros durante o outono e inverno e aumento na primavera e verão (fora da estação reprodutiva). Conforme Hafez; Hafez (2004), animais jovens ou de menor tamanho dentro da mesma espécie produzem volumes de sêmen menores, sendo que ejaculações frequentes também resultam em volumes subsequentes menores. Contudo, pequenos volumes ejaculados não são prejudiciais, porém, se acompanhados de baixa concentração espermática a produção total declina. Segundo Tutida et al. (1999), carneiros podem apresentar volumes ejaculados abaixo do que é descrito na literatura, em função da individualidade dos animais.

2.2.2.2.3 Turbilhão ou movimento em massa

Segundo Jacob et al. (2008); Gonçalves et al. (2008) e Silveira (2008), turbilhão é o movimento intenso e giratório em forma de ondas, provocado no sêmen por um grupo de espermatozoides, observado em uma gota de sêmen. A intensidade do movimento é resultado da motilidade, do vigor e da concentração espermática. Para a avaliação do turbilhão, basta colocar uma gota de sêmen sobre uma lâmina

previamente aquecida a 37 °C, sem lamínula, e levar ao microscópio com objetivas de 10 a 20x. Conforme o CBRA (2013), a interpretação deve ser dada utilizando-se uma escala de 0 - 5, sendo 0 a ausência total de movimento e 5 o valor máximo dado ao movimento de massa, sendo adotado como referência o valor mínimo de 3, para ovinos.

2.2.2.2.4 Motilidade espermática

Motilidade espermática é um dos principais parâmetros na avaliação da capacidade fecundante do sêmen, devendo expressar o percentual de espermatozoides móveis. O exame deve ser realizado com sêmen fresco e puro, utilizando uma gotícula entre lâmina e lamínula, em aumento de 10 a 40x, numa temperatura ideal de 37 °C (GONÇALVES et al., 2008; JACOB et al., 2008; SILVEIRA, 2008).

Para Hafez e Hafez (2004), a avaliação do sêmen a fresco é um indicador de seu desempenho no próprio fluido das glândulas acessórias. Porém quando a visualização da motilidade se torna dificultosa, tornando difícil a avaliação da motilidade individual, devido à alta concentração espermática, pode diluir-se uma amostra de sêmen em um diluidor de boa qualidade.

De acordo com Gonçalves et al. (2008), o índice de motilidade total é correspondente a porcentagem do número total de espermatozoides móveis em uma amostra de sêmen, e o índice de motilidade progressiva se refere apenas à proporção (em %) do número de espermatozoides com motilidade progressiva na amostra, e esse índice apresenta correlação à fertilidade do sêmen. Conforme o CBRA (2013), na avaliação do sêmen de carneiros, este deve apresentar uma motilidade progressiva mínima de 80%.

2.2.2.2.5 Vigor espermático

O vigor representa a intensidade de movimentação dos espermatozoides com motilidade progressiva. A avaliação é subjetiva e o resultado expresso de acordo com a classificação que vai de 0 a 5, sendo 0 ausência de movimentos progressivos com deslocamento de cauda fraco e inexpressivo, e 5 o vigor máximo (GONÇALVES et al.,

2008; JACOB et al., 2008; SILVEIRA, 2008). Para a avaliação, o vigor espermático em carneiros sexualmente maduros, deve ter o valor mínimo de 3 (CBRA, 2013).

2.2.2.2.6 Concentração espermática

A avaliação da concentração espermática é realizada para identificar a quantidade de espermatozoides presentes no ejaculado (HAFEZ; HAFEZ, 2004), geralmente expressa em $10^9/\text{mL}$ (bilhões/mL). Esta concentração pode ser obtida através de exame com câmara de Neubauer ou por espectrofotometria ou *Micro-cell-counter* (GONÇALVES et al., 2008; JACOB et al., 2008; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A concentração varia principalmente em virtude do método de colheita de sêmen. Entretanto, pode variar devido à frequência de coletas, a estação do ano, em função da raça e do estado de nutrição do carneiro. Quando se realiza colheitas frequentes (seis a dez ejaculados por semana), a concentração inicialmente tende a diminuir, tornando-se constante após um período de adaptação (GONÇALVES et al., 2008). De acordo com Hafez; Hafez (2004), para carneiros sexualmente maduros, o ejaculado deve apresentar uma concentração espermática mínima de $3,5 - 6,0 \times 10^9$ células/ml.

2.2.2.2.7 Morfologia espermática

A avaliação da morfologia espermática é um fator indispensável na determinação da qualidade do sêmen e do potencial fecundante dos espermatozoides. Alterações na anatomia celular estão diretamente correlacionadas à baixa fertilidade do reprodutor. Para o processo de fecundação é necessário à capacitação espermática, a ligação à zona pelúcida, a penetração no ovócito e a fusão com o oolema (SOARES; GUERRA, 2009), o que gera a necessidade de espermatozoides saudáveis e vigorosos. Os espermatozoides são compostos por inúmeras estruturas que, se afetadas, comprometem a capacidade de fecundação. As membranas acrossomal e plasmática, que são fundamentais na capacitação espermática, sendo sua integridade estrutural e funcional um fator limitante (ROTA et al., 2000), pois interfere tanto no metabolismo celular como na capacitação do espermatozoide, na reação acrossômica e na união do espermatozoide à superfície do óvulo (NEVES et al., 2008). Conforme Hafez; Hafez (2004), existe correlação

positiva entre espermatozoides morfologicamente normais e motilidade espermática. Todas as ejaculações contêm alguns espermatozoides anormais. Porém, quando 20% ou mais são anormais, a fertilidade do carneiro é questionável. Anormalidades acima de 15% podem comprometer os resultados de um programa de inseminação ou inviabilizar a criopreservação do sêmen, por isso, a importância da análise morfológica (MONREAL et al., 2012).

De acordo com Hafez e Hafez (2004), todas as amostras de sêmen possuem espermatozoides com anormalidades, sendo estas, a representação da mais alta relação com a fertilidade dos rebanhos. O estresse térmico, períodos de altas temperaturas e umidade relativa elevada no ambiente, provoca alta incidência de deformações espermáticas, podendo manter um reprodutor infértil por até seis semanas, apresentando grande número de espermatozoides deformados durante o período de recuperação. De acordo com Reichenbach et al. (2008), os defeitos espermáticos comumente verificados no espermograma são classificados conforme a estrutura espermática envolvida: acrossomo, cabeça, peça intermediária e cauda. Conforme os autores, os defeitos são classificados individualmente em: Patologias de acrossoma, Pouchformation, Gota Citoplasmática Proximal, Subdesenvolvido, Formas teratológicas, Defeitos de peça intermediária, Cauda fortemente enrolada/dobrada, Estreito na base, Cauda enrolada na cabeça, Pseudogota, Piriforme, Cabeça pequena anormal, Coloração anormal, Ulceração de cabeça, Cabeça com contorno anormal, Gota citoplasmática distal, Cauda enrolada, Cabeça delgada, Cabeça isolada normal, Abaxial, Retroaxial e oblíqua, Cauda dobrada, Cabeça pequena normal, Cabeças gigantes, curtas ou largas e Acrossoma destacado. A classificação dos defeitos de morfologia espermática proposta por Erick Blom na década de 1970, trata de classificar os defeitos espermáticos em defeitos maiores ou principais, que são mais importantes por estarem associados com subfertilidade e esterilidade, possivelmente de natureza hereditária e/ou alterações testiculares; e defeitos menores ou secundários, que tem menor importância na avaliação da fertilidade do macho, não estando associados diretamente a processos patológicos testiculares, sendo parte desses defeitos adquirida durante a passagem e permanência dos espermatozoides pelos epidídimos e vias espermáticas. Na técnica descrita por Blom, os defeitos maiores devem ser contados juntos, avaliando cerca de 200 células. Já os defeitos menores, devem ser contados separados e apenas

considerados no total os que excedam 10 a 15% no espermograma (REICHENBACH et al., 2008).

Diversas técnicas podem ser utilizadas para realizar a avaliação da morfologia espermática, dentre elas, a coloração com eosina-nigrosina, a coloração de Williams, a coloração de Cerovsky e a preparação úmida. Após a preparação da lâmina, esta deve ser avaliada em microscópio óptico em aumento de 1.000x, contando-se 200 células em diferentes campos (JACOB et al., 2008). O CBRA (2013) estabelece que para as características seminais é desejado um padrão mínimo de mais de 80% de espermatozoides normais.

2.2.2.2.8 Teste de Termo Resistência (TTR)

Teste de Termo Resistência (TTR) é um teste complementar na avaliação da qualidade seminal, devendo ser realizado em associação com outros testes de avaliação espermática, para prever a fertilidade de uma amostra de sêmen (CUNHA et al., 2012). As provas de exaustão a temperaturas que mimetizam o trato reprodutivo feminino são utilizadas para correlacionar a capacidade dos espermatozoides em suportar longos períodos de tempo em determinada temperatura, com a capacidade de fecundação (ARRUDA et al., 1992).

Conforme Harrison; Vickers (1990), a redução da motilidade e vigor espermático bovino durante o TTR pode estar relacionado a perda de componentes intracelulares ou lesões estruturais na cauda dos espermatozoides. Segundo Santos et al. (2006), sêmen que apresenta maior motilidade após a coleta e pós-descongelamento, apresenta também, maior motilidade após o TTR, o que representa maior longevidade espermática.

2.2.2.3 Testes *in vitro* de avaliação seminal

De acordo com Martinez (1993); Corcini (2010), os testes convencionais que avaliam a qualidade seminal não permitem prever o potencial fertilizante de uma amostra, mas apenas dão indícios se a mesma está dentro dos parâmetros aceitáveis. Isso ocorre devido ao fato de outros fatores, ainda desconhecidos, poderem interferir na capacidade fecundante. Desta forma, é necessário o emprego simultâneo de

diferentes testes *in vitro*, para aumentar a acurácia na predição da fertilidade de um macho.

2.2.2.3.1 Teste Hiposmótico (HOS)

O teste hiposmótico (HOS) avalia a integridade de membrana espermática e deve ser utilizado como um dos preditores da capacidade fertilizante do sêmen (ROTA et al., 2000), já que a viabilidade da membrana plasmática é importante para diversos eventos fisiológicos que ocorrem durante a fertilização (capacitação, reação acrossômica e fusão dos espermatozoides com o oócito) (SIQUEIRA et al., 2007). Conforme Jeyendran et al. (1984), quanto mais espermatozoides mantiverem a membrana plasmática íntegra, melhor será a qualidade seminal.

O teste HOS se caracteriza pelo transporte de fluidos através da membrana plasmática intacta dos espermatozoides, para a manutenção do equilíbrio osmótico. O influxo de líquido, predominantemente na região das fibras da cauda promove um inchaço e com isso o enrolamento da cauda do espermatozoide. As células espermáticas “inchadas” ou HOS positivas (reativas ao HOS) são classificadas como de membrana plasmática íntegra (DREVIUS, 1972; JEYENDRAN et al., 1984). De acordo com Melo et al. (2005) a capacidade do teste hiposmótico (HOS) em avaliar a integridade de membrana plasmática dos espermatozoides, faz deste um teste fundamental na avaliação *in vitro* do sêmen criopreservado, uma vez que tanto o congelamento quanto o resfriamento podem produzir danos na membrana.

2.2.2.3.2 Teste de migração ascendente “Swim-up”

Inúmeros métodos de preparação espermática são utilizados rotineiramente nos sistemas de fertilização *in vitro* (FIV). Dentre estes métodos se destaca o método de migração ascendente “Swim-up” (DODE et al., 2002), que tem por finalidade separar os espermatozoides mais viáveis, removendo-os do plasma seminal e dos crioprotetores, além de iniciar a capacitação espermática (PARRISH et al., 1995).

Parrish et al. (1995), descreveram a técnica para bovinos, onde foram colocados 250 µL de uma amostra de sêmen sob 1 mL de meio TALP (Tyrode's albumina lactato e piruvato), em tubo plástico de 12 x 55 mm. Após uma hora de incubação a 39 °C, 850 µL da camada superior de cada tubo, contendo os

espermatozoides móveis é retirado e centrifugado a 200 giros, por 10 minutos. O sobrenadante é descartado e o pellet ressuspendido e equilibrado em 1 mL de meio TALP por 5 minutos a 22 °C. Os autores observaram, menor taxa de recuperação de espermatozoides quando comparado ao método de Percoll®. Entretanto, verificaram um aumento nas taxas de clivagem com diferença na habilidade dos espermatozoides penetrarem oócitos *in vitro*, após o emprego do procedimento Swim-up.

O princípio do teste consiste na migração ascendente dos espermatozoides de maior viabilidade, que desta forma são recuperados dos menos aptos e dos debris e restos de crioprotetores. Desta forma, quanto maior a quantidade de espermatozoides recuperados, maior será a viabilidade do sêmen avaliado, o que permite indicar o método como um meio alternativo de avaliação *in vitro* de sêmen.

2.2.2.3.3 Fertilização *in vitro* heteróloga

A fertilização *in vitro* (FIV) é o método mais adequado para avaliar a fertilidade do sêmen, já que este avalia as interações entre espermatozoides e oócito que acontecem durante a fertilização *in vivo*, permitindo a avaliação dos diferentes momentos das fases iniciais de desenvolvimento embrionário (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2009). Entretanto devido à dificuldade em se obter oócitos de fêmeas da mesma espécie, muitas vezes é realizada a FIV heteróloga, já que os espermatozoides de uma espécie são capazes de penetrar oócitos de outra. García-Álvarez et al. (2009), avaliaram a fertilidade de espermatozoides ovinos utilizando FIV heteróloga com oócitos bovinos com zona pelúcida intacta e observaram uma correlação significativa ($r^2=0,760$) entre animais inicialmente classificados como de alta fertilidade ($\geq 42\%$) e taxa de fecundação de oócitos (55%), haja visto que estes apresentaram um maior número de embriões produzidos em relação aos animais classificados como de baixa fertilidade ($\leq 41\%$ e 39% de fertilização). Faria (2011), verificou que a utilização de FIV heteróloga com oócitos bovinos é eficiente em diagnosticar a capacidade fecundante de sêmen de garanhões, evidenciando diferenças significativas na taxa de fertilização entre machos. Assim como Martinez et al. (1993), que evidenciaram a possibilidade de avaliar a capacidade fertilizante de espermatozoides de javalis na FIV com oócitos suínos.

3 CAPÍTULO 1. AVALIAÇÃO MENSAL DA FERTILIDADE DE CARNEIROS DE RAÇAS LEITEIRAS

3.1 INTRODUÇÃO

A espécie ovina é caracterizada por apresentar atividade reprodutiva sazonal, ou seja, entra em atividade reprodutiva apenas em uma determinada época do ano, sendo considerada, portanto, poliéstrica estacional (OLIVEIRA, 2012; ZIEBA et al., 2011). Este mecanismo é regido pelas atividades hormonais do próprio animal, pela raça e influenciado pelo fotoperíodo, que controla toda a atividade dos hormônios reprodutivos (OLIVEIRA, 2012). A ação do fotoperíodo sobre a atividade reprodutiva ocorre estimulando a maior ou menor produção hormonal, fazendo com que os animais entrem em atividade reprodutiva ou permaneçam em anestro, durante épocas do ano (AZEVEDO et al., 2008).

Este sistema ocorre através de estímulos luminosos que são captados pelo nervo óptico dos ovinos e que estimulam a produção de melatonina pela glândula pineal (MACCHI; BRUCE, 2004). Este hormônio atua sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, promovendo o bloqueio ou liberação dos hormônios reprodutivos. Os estímulos para produção de melatonina em maior concentração ocorrem quando o fotoperíodo se torna decrescente (AZEVEDO et al., 2008). Portanto, a atividade reprodutiva da espécie ovina ocorre mais especificamente nos meses do ano em ocorre a redução do número de horas-luz do dia (FONSECA, 2005; OLIVEIRA, 2012).

Nas ovelhas esta atividade é bem caracterizada, e sofre grande influência do fotoperíodo (SÁ; SÁ, 2006). Entretanto, nos machos, embora também ocorra este efeito, existem poucos trabalhos avaliando a real influência desse mecanismo e sua intensidade sobre a atividade reprodutiva, especialmente em reprodutores de raças leiteiras. Em função da importância individual do macho dentro do rebanho, e principalmente pela necessidade de coberturas ao longo de todo o ano, para manter uma constante produção de leite, a avaliação de sua capacidade reprodutiva ao longo do ano é de grande importância. Assim, este trabalho tem por objetivo, avaliar a capacidade reprodutiva através dos parâmetros seminais de carneiros de raças leiteiras, ao longo do ano.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Reprodução Animal Professor Assis Roberto de Bem/ CAV – UDESC, na Estação Experimental de Pesquisa Agropecuária (EPAGRI) de Lages – SC e na Fazenda Pinheiro Seco, em Bom Retiro – SC.

Para o estudo foram utilizados 13 machos hígidos, com idade entre 6 e 8 anos, sendo 2 da raça Milchschaf e 11 da raça Lacaune, pertencentes a EPAGRI e a Fazenda Pinheiro Seco, ambas localizadas na Serra Catarinense, com latitude 27°47'50" e 27°48'57" sul e longitude 49°29'21" e 50°19'33" oeste, respectivamente, e aproximadamente 1000 metros de altitude.

O clima da região é bem característico, classificado como temperado subtropical, com temperatura média anual de 16 °C, variando de -4 °C (sensação térmica de -10 °C) no inverno a 30 °C no verão. A precipitação média anual é aproximadamente 124 mm e umidade relativa de 80%. A luminosidade média na região é de 1766,4 horas de sol, variando de 208,8 horas de sol mensais no verão a 147 horas mensais no inverno.

Os carneiros foram mantidos em piquetes/baias coletivas durante o experimento e foram alimentados e manejados de acordo com a rotina das propriedades.

Foram realizadas avaliações mensais ao longo de 12 meses, sendo avaliada a condição corporal dos animais, seguida da avaliação testicular, coleta e avaliação do sêmen de cada carneiro.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UDESC/CAV, sob o protocolo N° 7413071216.

3.2.1 Escore de Condição Corporal (ECC)

A avaliação foi realizada sempre pelo mesmo operador, por meio de observação e através da palpação da região lombar para determinar o volume de massa muscular e gordura existente, sendo o escore classificado em uma escala de 1 - 5, onde 1 caracteriza animais extremamente magros e 5 animais obesos.

3.2.2 Características Testiculares

Para avaliação das características testiculares, os carneiros inicialmente foram submetidos a uma avaliação do tônus testicular por meio de palpação, sendo este classificado numa escala de 0 a 4, conforme Santos; Simplício (2000), sendo 0= flácida; 1= firme elástica diminuída; 2= firme elástica; 3= firme elástica aumentada e 4= endurecida (fibrose). Após essa avaliação, foi tomada a medida do comprimento testicular em centímetros, de ambos os testículos, direito e esquerdo, de cada carneiro. Para a tomada dessa medida, cada testículo era palpado e com o auxílio de uma fita métrica foi mensurado o comprimento do corpo do testículo, excluindo-se a cabeça e cauda do epidídimo. Por fim, foi feita a aferição da biometria testicular. Para tal, os testículos foram retraídos para a porção final da bolsa escrotal e com uma fita métrica foi realizada a medida do perímetro escrotal na porção média dos testículos.

3.2.3 Coleta de sêmen

A coleta de sêmen foi realizada com vagina artificial, aquecida a aproximadamente 40 °C, sendo utilizado uma ovelha como manequim. Como os animais já eram condicionados a coleta com vagina artificial, não foi utilizado ovelha em estro como manequim. A cada mês, foram realizadas duas coletas de cada carneiro, com intervalo de aproximadamente 45 minutos entre elas. Foi estabelecido que o primeiro ejaculado seria utilizado apenas para mensurar o volume e o segundo para realizar as avaliações como aspecto, turbilhão, motilidade, vigor, concentração, TTR e morfologia.

3.2.4 Volume ejaculado e Aspecto seminal

A avaliação do volume ejaculado e do aspecto seminal foi realizada visualmente no tubo coletor de sêmen, imediatamente após a coleta. Para a mensuração do volume foi utilizado uma pipeta automática, de escala de 100 µL a 1000 µL, onde foi graduado em escala de mililitros (mL). O aspecto do sêmen foi avaliado visualmente e classificado de acordo com a coloração e consistência em Marmóreo, Cremoso, Leitoso ou Aquoso. Após essas avaliações iniciais era realizado o espermograma.

3.2.5 Turbilhão ou movimento em massa

A avaliação do turbilhão foi realizada através da deposição de uma gota de sêmen in natura (10 µL) sobre uma lâmina previamente aquecida (37 °C) e observado ao microscópio óptico utilizando objetiva de 10x (aumento de 100x). O turbilhão foi avaliado e classificado numa escala de 0 a 5, sendo 0 – total ausência de movimento e 5 – intenso movimento massal da amostra, conforme o CBRA (2013).

3.2.6 Motilidade progressiva e vigor espermático

Para avaliar a motilidade progressiva e o vigor espermático, inicialmente foi realizado uma diluição prévia do sêmen ejaculado (1:400) em meio de avaliação Tris Gema. Após a diluição, uma amostra do sêmen diluído (10 - 20 µL), foi depositada entre lâmina e lamínula e avaliada em microscópio óptico, com aumento de 100 - 400x. Na avaliação, foi estimado o percentual de espermatozoides móveis e em movimento progressivo, em pelo menos três campos da lâmina, realizando uma estimativa de 0 - 100% dos espermatozoides móveis. Durante a avaliação da motilidade também era avaliado o vigor espermático, feito pela observação da intensidade dos movimentos dos espermatozoides, classificada numa escala de 1 - 5, onde 1 representa espermatozoides com movimento lento, oscilatório e 5 o vigor máximo (movimento progressivo retilíneo e muito rápido). Estas avaliações eram realizadas com base nas informações do CBRA (2013).

3.2.7 Concentração espermática

Para calcular a concentração espermática, uma gota de sêmen in natura (10 µL) de cada ejaculado foi diluída em 3990 µL de H₂O em tubo cônico, obtendo diluição de 1:400. Após a homogeneização, uma alíquota da amostra era utilizada para preencher ambos os lados de uma câmara de Neubauer, com auxílio de uma pipeta automática. Após preenchida a câmara, aguardava-se 5 minutos e então era realizada a contagem dos quadrados da câmara, em microscópio óptico em aumento de 100x a 400x. A concentração final foi expressa em células/mL, conforme o CBRA (2013), utilizando para o cálculo, a seguinte fórmula:

Figura 4 - Fórmula para cálculo de concentração espermática em câmara de Neubauer



$$\frac{A}{\frac{1}{10} \cdot \frac{N}{25} \cdot \frac{1}{B}}$$

A: Nº espermatozoides contados; N: Nº quadrados contados; B: Fator de diluição;
1/10: Altura da câmara

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

3.2.8 Morfologia espermática

A avaliação da morfologia espermática foi procedida para identificar as alterações de conformação dos espermatozoides, classificando-as em defeitos maiores e menores, conforme o CBRA (2013). Para tal, uma gota de sêmen foi colocada em uma lâmina previamente aquecida a 37 °C, e confeccionado o esfregaço. Após a secagem dos esfregaços, procedeu-se a coloração das lâminas através do método de Cerovsky segundo CBRA (2013). Com as lâminas já coradas e secas, procedia-se a avaliação da morfologia dos espermatozoides, sendo avaliadas no mínimo 200 células e identificado e anotado os defeitos de forma e estrutura encontrados, com auxílio de microscópio óptico, com aumento de 400x. Os defeitos eram caracterizados e computados como defeitos maiores e menores, seguindo os padrões estabelecidos pelo CBRA (2013).

3.2.9 Teste de Termo Resistência

Do ejaculado colhido de cada carneiro, 100 µL de sêmen era diluído em uma proporção de 1:1 + 3 com diluente Tris Gema, em tubo do tipo ependorf. Essa amostra

era então incubada em banho-maria a 37 °C durante 3 horas. As avaliações de motilidade e vigor espermático eram realizadas a cada hora de incubação. Para a avaliação, uma alíquota de sêmen (10 µL) era depositada entre lâmina e lamínula e submetida a avaliação em microscópio óptico em aumento de 100x – 400x, observando-se o percentual de células com motilidade progressiva e vigor espermático no mínimo em três campos da lâmina, conforme estipulado pelo CBRA (2013).

3.2.10 Análise estatística

Os resultados obtidos durante o período de experimento foram avaliados estatisticamente usando o software JMP versão 5, 2002 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), considerando significativo $p \leq 0,05$.

No modelo estatístico delineado para os carneiros de raças leiteiras avaliados, foi considerado como efeito fixo o carneiro e como efeito aleatório o mês de coleta de dados e a estação do ano. Os carneiros foram avaliados entre raças e entre carneiros, quanto a diferenças estatística para os resultados obtidos, e em não havendo diferença significativa, cada carneiro foi considerado como uma repetição, dentro de cada mês de avaliação.

Os valores foram avaliados previamente quanto a normalidade através do teste de Shapiro-Wilk. O teste de Tukey foi aplicado para comparar os valores obtidos por ANOVA, sempre que os p -valores fossem menores que 5% ($p < 0,05$). Utilizou-se a ANOVA em dados de medições como PE, volume ejaculado e concentração espermática. As avaliações que não apresentaram distribuição normal, como turbilhão, motilidade progressiva, vigor espermático, morfologia espermática, foram avaliadas pelo teste não paramétrico de Wilcoxon (Qui-quadrado), com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo avaliou pela primeira vez os parâmetros seminais de carneiros de raças leiteiras, nas diferentes estações do ano, no planalto de Santa Catarina - Brasil.

Um dos pré-requisitos para o pleno desempenho das funções fisiológicas dos animais domésticos, incluindo a reprodução, é a manutenção de um status sanitário

adequado. Afecções moderadas ou graves, sistêmicas ou do aparelho reprodutivo, afetam a fertilidade masculina, reduzindo a vida reprodutiva dos carneiros, aumentando o descarte de reprodutores por lesões crônicas e reduzindo a produtividade do rebanho, pela diminuição da fertilidade (RIEDLER; WEST, 2011; MEJID et al., 2010). De acordo com Goulestsou et al. (2004), a avaliação clínica da capacidade reprodutiva dos carneiros deve fazer parte dos programas de manejo de sanidade ovina, pois a maioria das enfermidades que afetam a capacidade reprodutiva dos machos é facilmente detectada através da avaliação clínica.

Durante o período de execução do experimento, todos os carneiros estavam hígidos, não sendo evidenciado qualquer tipo de enfermidade nos animais. Desta forma, trabalhou-se com a hipótese de não haver interferência de condições sanitárias nas características reprodutivas avaliadas.

Além da condição sanitária, a condição nutricional é fundamental para o desenvolvimento das funções vitais e secundárias dos organismos vivos. Segundo Fourie et al. (2004), carneiros com baixa condição nutricional apresentam redução da fertilidade. Porém, o contrário também é verdadeiro. Machos obesos apresentam acúmulo de gordura na região do cordão espermático, o que interfere na termorregulação testicular e consequentemente na fertilidade. Durante os 12 meses de avaliação do estudo, os 13 carneiros utilizados foram submetidos mensalmente a avaliação da condição nutricional, através da avaliação do ECC. A condição corporal observada no período variou de 2 a 3,5 (média= 2,8) nos carneiros Milchshaf, e 3 a 4,5 (média= 3,8) nos carneiros Lacaune, numa escala de avaliação de 1 a 5, indicando uma boa condição nutricional dos animais. Além disso, a variação individual na condição corporal dos mesmos não apresentou diferença significativa, não influenciando os parâmetros avaliados.

A avaliação da integridade testicular foi realizada por avaliação do tônus testicular. Essa avaliação permite identificar alterações patológicas e fisiológicas que ocorrem nos testículos e que interferem diretamente na capacidade espermatogênica. Durante a avaliação da consistência/tônus testicular não foram evidenciadas alterações que pudessem sugerir afecções patológicas. Entretanto foram evidenciadas variações no tônus testicular ao longo dos meses, sendo observada uma maior consistência (fribroelástica) nos meses de maio até agosto (período mais frio do ano), em relação aos meses de setembro a janeiro (período mais quente) (Gráfico 1). Esta variação observada, demonstra o efeito da sazonalidade sobre a consistência

testicular de carneiros leiteiros, haja visto que, durante os meses que compreendem o outono e inverno os carneiros apresentaram melhor consistência testicular em relação aos meses da primavera e verão. Constatação semelhante foi descrita por Maia et al. (2011), que observaram a influência da temperatura ambiente sobre a capacidade reprodutiva de carneiros. Os autores verificaram que a elevação da temperatura ambiente, acarreta em aumento na temperatura testicular dos machos, causando algum grau de degeneração testicular, tornando os testículos mais flácidos. Corroborando com os autores, Clarke; Tilbrook (1992) discorrem que a temperatura testicular deve ser mantida em 5 °C abaixo da temperatura corporal, e que temperaturas ambientais muito elevadas, podem alterar drasticamente a fertilidade dos carneiros. Entretanto essa elevação de temperatura não foi tão crítica a ponto de causar a infertilidade temporária nem comprometer seriamente os testículos. Com o decréscimo da temperatura, a consistência testicular voltou ao normal, corroborando os achados de Mucciolo et al. (1974), que provocando insolação testicular em carneiros da raça Crioula, observaram aumento de anormalidades espermáticas e histológicas do parênquima testicular, que retornaram aos limites fisiológicos após o período experimental.

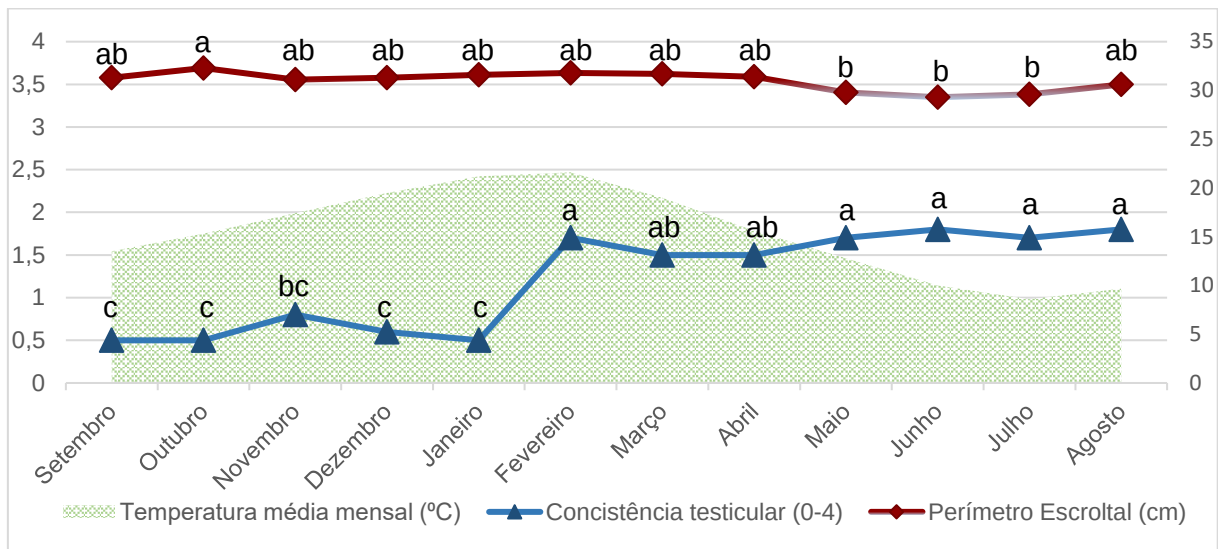
As mensurações do PE permitiram observar variações mensais significativas no tamanho testicular, independentemente da idade dos carneiros avaliados. O maior valor médio de PE foi observado no mês de outubro ($32,3 \pm 2,9$ cm), enquanto os menores valores foram evidenciados nos meses de maio a julho (coincidindo com o período final de queda da temperatura ambiente). Observando os dados apresentados no Gráfico 1, pode-se inferir uma tendência na variação dos valores de PE em função da temperatura média do mês da avaliação. A medida que a temperatura média mensal subiu, aumentou o tamanho dos testículos, embora de maneira discreta. Além disso, observa-se aumento do perímetro escrotal conforme os animais se aproximam da estação reprodutiva, dita como outono, e ocorre redução na saída da estação (inverno).

Por serem mantidos estabulados durante todo o período de avaliação, os carneiros não foram expostos a variações nas condições alimentares externas, o que justifica a pequena variação no ECC e a ausência de diferença estatística entre os resultados observados. Desta forma, permite-se inferir que a variação na circunferência escrotal dos carneiros ocorreu apenas em função da temperatura ambiental e da sazonalidade. Esta verificação pode ser justificada e corrobora com os

achados de Kafi et al. (2004), avaliando carneiros Karakul; Yerney et al. (1990) e Mickelsen et al. (1981), que concluíram não haver relação entre o peso corporal e o perímetro escrotal nos animais estudados. Estes dados diferem dos observados por Braun et al. (1980), que concluíram haver correlação entre peso corporal e diâmetro testicular, verificado pela observação de carneiros mais pesados apresentarem maior PE. A estação do ano e a raça exercem maior influência sobre o perímetro escrotal, do que o aumento do peso corporal. Conforme Hötzel et al. (2003); Milczewski et al. (2015), o fotoperíodo é mais influente que a nutrição nas oscilações do tamanho testicular durante as estações do ano, já que mesmo mantendo uma dieta padrão ao longo das estações, esta não impediu a diminuição do PE no inverno em carneiros Suffolk.

A possível causa das variações obtidas para consistência testicular e PE durante as avaliações, são corroboradas com os achados de Milczewski et al. (2015), que avaliaram a histologia testicular de carneiros Suffolk, em baixa latitude (25°25'40"S), nas diferentes estações do ano. No estudo, os autores observaram que os diâmetros dos túbulos seminíferos variaram significativamente, sendo em média 1,32 vezes maiores no final do verão, quando ocorreu a maior CE, em relação ao período de menor PE que ocorreu no inverno. Para um crescimento médio de 30,71% na PE no verão, houve um aumento médio correspondente de 32,03% no diâmetro dos túbulos seminíferos e 37,76% na espessura média das camadas celulares dos túbulos. Na contagem das diferentes células da linhagem germinativa, os autores verificaram a presença de um número significativamente maior de espermatogônias, espermatócitos, espermátide redonda e espermátide alongada/espermatozoide ($p < 0,001$) nos túbulos seminíferos com maior diâmetro, fato ocorrido no final do verão.

Gráfico 1 – Variação mensal no perímetro escrotal (PE) e consistência testicular observados em carneiros de raças leiteiras durante o período de um ano



Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística entre os meses, $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2018.

A avaliação do sêmen ao longo do ano é de suma importância, haja visto que podem ocorrer variações que interferem nas taxas de prenhez e inviabilizam a sua utilização nas biotecnologias da reprodução. O processo de espermatogênese é dinâmico e contínuo, onde ocorre a transformação de células germinativas primordiais em espermatozoides. A duração média do ciclo espermatogênico completo em ovinos é de 42,28 dias (CARDOSO; QUEIROZ, 1998). Desta forma, existe uma antecipação nas características fisiológicas, que melhoram o desempenho reprodutivo dos machos em relação às fêmeas, sendo estes sensibilizados pelo fotoperíodo cerca de 45 a 30 dias mais cedo que as fêmeas. Essa antecipação é muito importante, pois ovelhas em anestro podem ovular poucos dias após um estímulo hormonal, determinado pelo fotoperíodo, enquanto que os carneiros necessitam aproximadamente 45 para completar a espermatogênese (ROSA; BRYANT, 2003).

Na avaliação das características do sêmen colhido mensalmente de cada carneiro, os resultados foram tabulados em valores médios mensais e comparados entre os meses. Não foi observada alteração no aspecto do sêmen ao longo de todo o período.

Para a variável volume ejaculado, os valores mensais estudados são as médias dos dois ejaculados colhidos de cada carneiro, em cada mês de avaliação (Gráfico 2).

Foi verificada uma variação de 0,4 – 1,5 mL ejaculado, sendo o menor valor obtido no mês de março e o maior no mês de junho. Tutida et al. (1999) descrevem que o volume ejaculado pode variar em função do indivíduo. Barbas et al. (2001) constataram haver influência da estação do ano sobre o volume ejaculado de carneiros Merino Regional e Serra da Estrela no Vale do Santarém/Portugal (latitude 39° N, altitude 73 m), que apresentaram maior volume no período do verão e outono, assim como Kafi et al. (2004), avaliando carneiros Karakul (Província de Fars/Irã, latitude 29°N, altitude 1630m) e Gündogan (2007) (Turquia, latitude 38°N, longitude 30°W, altitude 1021m) que obtiveram maiores volumes de sêmen no outono. Karagiannidis et al. (2000), verificaram redução do volume ejaculado de carneiros Chios e Friesian, durante a primavera em Thessaloniki/Grécia (latitude 40°N, longitude 22°E, altitude 32m). Diferindo dos autores, Milczewski et al. (2015) observaram menor volume ejaculado durante o outono e inverno em carneiros Suffolk em baixa latitude (25°S). Assim como Ibrahim (1997), que observando carneiros egípcios nos Emirados Árabes Unidos (latitude 24°N, longitude 55°L, altitude 312m), obteve menores volumes de ejaculado no outono em relação às outras estações do ano. Estas variações podem ser devido a particularidades de cada raça ou da temperatura ambiental da região onde são criados (KARAGIANNIDIS et al., 2000).

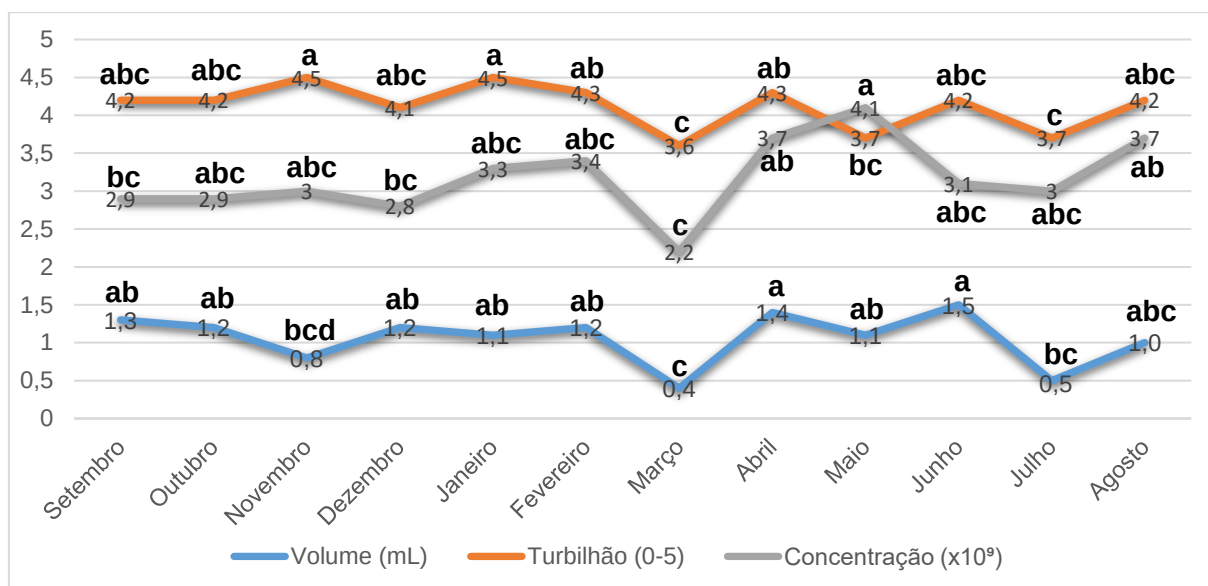
Todavia, como os carneiros deste estudo eram mantidos sob o regime de manejo da propriedade, também foram utilizados nas coberturas das fêmeas, ao longo do ano. Isso pode ter sido, ao menos em parte, a causa do menor volume ejaculado observado no mês de março (0,4 mL $\pm$ 0,2), quando os animais foram submetidos a um regime de montas mais intenso. Segundo Neves et al. (2008), o volume ejaculado sofre interferência do regime de serviço, do método de colheita e do tempo de excitação. Corroborando com estas informações, Hafez; Hafez (2004) enfatizam que ejaculações frequentes resultam em volumes subsequentes menores e estes não são prejudiciais se apresentarem uma adequada concentração e viabilidade espermática.

O turbilhão foi a primeira característica avaliada microscopicamente, e esteve presente na totalidade dos ejaculados. O menor valor observado no mês de março (3,6) (Gráfico 2), coincide com o menor valor de concentração observado para o mesmo mês. Conforme Cardoso; Queiroz (1988), em ovinos adultos, o processo de divisão das espermatogônias inicia em uma sequência de tempo e em uma posição precisa ao longo do túbulo seminífero formando, dessa forma, ondas de maturação celular. Assim, uma porção do túbulo que contém um tipo de associação celular é

seguida por uma porção do túbulo que contém um estágio precedente ou subsequente de tipo celular. E assim, cada série completa de associação celular determina o ciclo dos túbulos seminíferos que inicia em intervalos regulares de 10,57 dias. Como a duração da espermatogênese é igual ao tempo transcorrido por cinco séries destes estágios (10,5 dias), o processo de produção de uma série de células espermáticas leva cerca de 42,28 dias (MILCZEWSKI et al., 2015). Desta forma, como a produção espermática compreende um complexo processo, é possível que a utilização dos carneiros para a monta tenha provocado um esgotamento das reservas espermáticas que compreendiam a produção final de uma série de ciclos espermáticos, coincidindo com o dia da coleta, apresentando os resultados obtidos para turbilhão e concentração espermática no mês de março.

Na avaliação da concentração espermática, os valores médios mensais apresentaram pouca variação, com exceção de maio e março, onde evidenciou-se a maior e a menor concentração espermática ($4,1 \pm 0,9 \times 10^9$; $2,2 \pm 0,6 \times 10^9$ células/mL), respectivamente, que diferiram significativamente (Gráfico 2). A baixa concentração no mês de março, remete ao mesmo fator influenciador do volume e turbilhão observados no mesmo mês. Esses baixos resultados podem ser justificados pelo uso dos carneiros em um regime de monta mais intenso, em relação aos demais meses. Entretanto, apesar de haver essa redução na concentração espermática no mês de março, esta ficou dentro dos parâmetros estipulados pelo CBRA (2013), que estipula uma concentração mínima de 1 bilhão de células espermáticas por mL de sêmen fresco. Conforme Gonçalves et al. (2008), a concentração tende a diminuir quando são realizadas colheitas frequentes (6 a 10 ejaculados por semana), tornando-se constante após um período de adaptação. Segundo Barbas et al. (2001), a sazonalidade exerce influência sobre a concentração espermática de carneiros da raça Merino e Serra da Estrela, sendo observado redução significativa no outono em relação as demais estações. Sarlós et al. (2013), evidenciaram maior concentração espermática durante o verão e menor no inverno, em carneiros Racka em Herceghalom/Hungria (latitude 47°N, longitude 18°L). Assim como Ibrahim (1997), que identificou maior concentração espermática durante o verão, e concentrações constantes no inverno e primavera. Estes resultados diferem de Tutida et al. (1999), que verificaram concentração espermática constante durante todo o ano, em carneiros das raças Bergamácia, Corriedale e Hampshire Down em Maringá/PR (latitude 23°S, longitude 51°W, altitude 596m).

Gráfico 2 – Variação mensal no volume ejaculado, turbilhão e concentração espermática ($\times 10^9/\text{mL}$), observados em carneiros de raças leiteiras durante o período de um ano



Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística entre os meses, $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2018.

Geralmente o TTR é utilizado para avaliar a viabilidade seminal pós-descongelamento. Entretanto, buscou-se avaliar no sêmen fresco, para observar o comportamento do sêmen submetido a temperatura controlada por três horas. Os resultados da motilidade progressiva e vigor espermático do sêmen fresco, avaliada pela porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva foi maior na primavera ($88,5\% \pm 3,2$) em relação ao outono ($82,7\% \pm 6,0$), não havendo diferença destes na comparação com o verão ($84,6\% \pm 4,3$) e o inverno ($86,2\% \pm 5,1$) (Tabela 1). Karagiannidis et al. (2000), observaram que a época do ano influencia na motilidade, encontrando valores piores no verão, quando avaliado em regiões de clima temperado (Thessaloniki/Grécia). Diferente dos resultados encontrados no presente estudo, Mandiki et al. (1998) (Namour/Bélgica); Rege et al. (2000) (planalto central da Etiópia); Feliciano Silva; Nunes (1984), não observaram diferença significativa na motilidade espermática, nas diferentes estações. Em todas as estações houve uma diminuição gradativa da motilidade ao longo das 3h de TTR (Tabela 1), sendo que no outono esta diminuição já foi significativa com uma hora de TTR. Nas demais estações, a motilidade diminuiu significativamente somente com duas horas de TTR. Na comparação entre as diferentes estações ao final do TTR, na primavera houve maior porcentagem de espermatozoides móveis (vivos) em relação ao outono e ao

inverno, sendo semelhante ao verão. No outono, a motilidade ao final do TTR, foi semelhante a observada no inverno e no verão, e no verão foi superior a observada no inverno. O vigor do sêmen fresco, foi inferior no verão em relação às demais estações, sendo estas semelhantes entre si (Tabela 1). Ao final do TTR, o vigor dos espermatozoides na primavera foi superior as demais estações, sendo o vigor no verão e no outono semelhantes, e superiores ao vigor no inverno. Portanto, pode-se inferir que a partir dos resultados obtidos da viabilidade do sêmen fresco ao final das avaliações, o inverno apresentou resultados inferiores às demais estações. Verifica-se, portanto, a influência da estação na viabilidade espermática, demonstrando que no inverno os carneiros apresentam sêmen de menor qualidade. Os resultados de motilidade pós coleta do presente estudo estão de acordo com os achados de Mickelsen et al. (1981), com carneiros Suffolk e Lincoln que também observaram maiores valores de motilidade na primavera e verão, e menores valores no outono, diferindo apenas no inverno, no noroeste dos Estados Unidos. Estes resultados se assemelham aos obtidos por Tutida et al. (1999), em carneiros das raças Bergamacia e Corriedale (Maringá/PR – latitude 23°S, longitude 51°W, altitude 596m). Entretanto para a raça Hampshire Down, os autores observaram maior motilidade durante o verão em relação as demais estações. Em contraste, Oberst et al. (2011) em Bento Gonçalves/RS (latitude 29°S), observaram menor motilidade espermática durante a primavera. Assim como Barbas et al. (2001) no Vale do Santarém/Portugal e Dufour et al. (1984) no Canadá, que observaram redução significativa da motilidade espermática durante a primavera. Já Milczewski et al. (2015), não observaram diferença significativa na motilidade e vigor entre as estações, em carneiros Suffolk em baixa latitude (25°25'40"S). Karagiannidis et al. (2000), avaliando carneiros Chios e Friesian em Thessaloniki/Grécia (latitude 40°N, longitude 22°E), obtiveram valores de motilidade progressiva inferiores no verão. Kafi et al. (2004), avaliando carneiros Karakul na Província de Fars/Irã (latitude 29°N), obtiveram melhor qualidade seminal no final do verão e outono. A variação entre autores é esperada, haja visto que as características seminais apresentam variação estacional, mas também são influenciadas pela espécie, raça e localidade onde os animais são criados. Nossos resultados obtidos no TTR são condizentes com os descritos por Santos et al. (2006), onde tanto motilidade quanto vigor durante o TTR, apresentam comportamento semelhante, sendo altos nas primeiras horas do teste, diminuindo nas horas intermediárias e estabilizando em valores baixos nas horas finais do teste.

Tabela 1 – Motilidade progressiva e vigor do sêmen fresco de carneiros de raças leiteiras, avaliados pós coleta e durante o teste de termo resistência

Estação	Motilidade (0 - 100%)				Vigor (1 - 5)			
	h0	h1	h2	h3	h0	h1	h2	h3
Primavera	88,5 ± 3,2 ^{aA}	83,5 ± 5,9 ^{aAB}	78,1 ± 5,6 ^{aB}	66,5 ± 7,7 ^{aC}	4,3 ± 0,4 ^{xX}	3,9 ± 0,3 ^{xy}	3,3 ± 0,4 ^{xZ}	3,0 ± 0,2 ^{xZ}
Verão	84,6 ± 4,3 ^{abA}	82,3 ± 5,3 ^{aA}	71,5 ± 8,3 ^{abB}	66,7 ± 9,3 ^{abC}	3,5 ± 0,5 ^{yX}	3,3 ± 0,5 ^{yY}	2,9 ± 0,3 ^{yY}	2,5 ± 0,4 ^{yZ}
Outono	82,7 ± 6,0 ^{bA}	76,2 ± 4,6 ^{abB}	66,2 ± 6,2 ^{bC}	54,2 ± 4,9 ^{bcD}	4,0 ± 0,6 ^{xx}	3,5 ± 0,6 ^{xyX}	2,9 ± 0,4 ^{yY}	2,4 ± 0,4 ^{yY}
Inverno	86,2 ± 5,1 ^{abA}	80,8 ± 2,8 ^{bA}	65,4 ± 8,8 ^{bB}	46,9 ± 10,3 ^{cC}	4,2 ± 0,4 ^{xx}	3,4 ± 0,5 ^{xyY}	2,5 ± 0,5 ^{zz}	2,1 ± 0,3 ^{zz}

Valores com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa entre as estações (a-c; x-z) $p < 0,05$. Valores com letras diferentes na mesma linha diferem entre os tratamentos (A-C; X-Z) $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Os resultados obtidos através da avaliação da morfologia espermática são apresentados em forma de médias mensais de defeitos maiores e menores (Tabela 2). Embora seja observada diferença estatística entre os meses, todos os defeitos ficaram dentro dos padrões estipulados para sêmen fresco ovino, pelo CBRA (2013). Na avaliação dos resultados dos defeitos maiores, observa-se que a porcentagem de defeitos dos meses de setembro e janeiro não diferem entre si e são semelhantes aos observados nos meses de novembro, abril e junho. Entretanto são maiores que os observados para os demais meses. Para os defeitos classificados como menores, observa-se que a porcentagem de defeitos para o mês de dezembro, são semelhantes aos encontrados nos meses de outubro, novembro, janeiro e fevereiro, e maiores que os defeitos dos outros meses. Conforme Hafez; Hafez (2004), a porcentagem de espermatozoides anormais varia com a estação, sendo observado número maior de espermatozoides anormais na primavera e, à medida que avança a estação de monta, esse número vai declinando. Isso pode ser observado no presente estudo, para a variável defeitos menores, onde observou-se diminuição dos defeitos espermáticos à medida que os animais avançavam os meses e a estação reprodutiva. De acordo com Tuli; Holtz (1995), a porcentagem total de espermatozoides anormais durante a estação reprodutiva pode variar de 5-8% e fora dela de 10-18%. No presente estudo, os resultados obtidos se mantiveram inferiores tanto na estação reprodutiva, quanto fora dela, não apresentando mais de 4,5% de defeitos. Santos et al. (2006), atribuem o fotoperíodo como fator de influência na morfologia espermática, tendo evidenciando até 20% de defeitos antes do tratamento com fotoperíodo induzido. Monreal et al.

(2012) observaram maior porcentagem de patologias durante a primavera e verão e na estação seca. Os autores atribuem não só a estação, como fator de influência, mas também a disponibilidade de alimentos. Corroborando, Martí et al. (2012) evidenciaram aumento das patologias espermáticas fora da estação reprodutiva. Semelhante ao observado em nosso estudo, Mickelsen et al. (1981) também evidenciaram variações nas patologias espermáticas em carneiros Suffolk e Lincoln criados no Noroeste dos Estados Unidos, observando maior porcentagem de defeitos nos meses de fevereiro, junho e agosto, revelando o efeito estacional sobre a morfologia espermática, possivelmente em função de alterações hormonais e bioquímicas que promovem uma maior chance de malformação dos espermatozoides.

Tabela 2 – Médias das porcentagens de defeitos espermáticos observados mensalmente no sêmen de carneiros de raças leiteiras

Mês	Defeitos maiores (%)	Defeitos menores (%)
Setembro	1,2 ± 0,5 ^a	1,5 ± 0,8 ^{cde}
Outubro	0,4 ± 0,4 ^b	2,8 ± 1,3 ^{abcd}
Novembro	0,2 ± 0,8 ^{ab}	3,0 ± 1,2 ^{abcd}
Dezembro	0,4 ± 0,4 ^b	4,2 ± 2,0 ^a
Janeiro	0,6 ± 1,2 ^a	2,8 ± 1,4 ^{abcd}
Fevereiro	0,7 ± 0,3 ^b	3,1 ± 1,5 ^{ab}
Março	0,4 ± 0,4 ^b	1,6 ± 0,9 ^{bcde}
Abril	0,5 ± 0,5 ^{ab}	2,0 ± 0,9 ^{bcde}
Maio	0,5 ± 0,2 ^b	1,4 ± 0,8 ^{de}
Junho	0,4 ± 0,6 ^{ab}	1,1 ± 1,0 ^e
Julho	0,6 ± 0,2 ^b	1,8 ± 1,1 ^{bcde}
Agosto	0,3 ± 0,5 ^{ab}	0,7 ± 0,6 ^e

Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem entre os meses, $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

3.4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos durante o período de avaliação confirmam que os machos das raças Milchschaft e Lacaune sofrem efeitos da sazonalidade. Observou-se que a temperatura e a estação do ano influenciam as características testiculares e seminais. A análise dos dados revelou aumento na consistência testicular

(fribroelástica) durante a estação reprodutiva e durante o inverno (meses de fevereiro a agosto início da estação reprodutiva e inverno respectivamente).

Na avaliação do perímetro escrotal, ao contrário do esperado, foi observado maior PE nas épocas do ano com temperaturas mais elevadas, bem como na estação reprodutiva. Já o inverno determinou o menor perímetro escrotal, demonstrando que além de influência sazonal, existe influência da temperatura ambiente.

Em relação as características seminais, observou-se que existe influência da estação do ano na qualidade do sêmen, com melhores resultados na primavera (estação não reprodutiva) do que o outono (estação reprodutiva), ao contrário do que era esperado. Além disso, foi verificado que no inverno, quando os animais estão saindo da estação reprodutiva, a qualidade do sêmen é inferior as demais estações. Por fim, embora tenham sido observadas variações nas características reprodutivas dos carneiros de raças leiteiras ao longo do ano, os dados obtidos demonstram que o padrão seminal é adequado durante todos os meses do ano.

4 CAPÍTULO 2. CARACTERÍSTICAS DE CONGELABILIDADE E FECUNDIDADE DO SÊMEN OVINO, CONGELADO NAS DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO

4.1 INTRODUÇÃO

As biotecnologias de reprodução assistida tem se mostrado como instrumentos eficazes na reprodução de espécies ameaçadas de extinção e na preservação de material genético. Dentre essas biotécnicas se destaca a criopreservação de sêmen, que conciliada a inseminação artificial, vem sendo amplamente aplicada (GARCÍA-ÁLVARES et al., 2009).

A possibilidade do congelamento de sêmen trouxe novas perspectivas para a inseminação artificial, permitindo a maximização do melhoramento genético e aumento da progênie de um macho, em diversos lugares simultaneamente e de forma acelerada (LEBOEUF et al., 1998). Entretanto, a utilização de sêmen criopreservado ovino tem sido limitada, devido aos baixos índices de fertilidade conseguidos com a inseminação artificial (MAXWELL; WATSON, 1996).

A baixa taxa de fertilidade de espermatozoides ovinos criopreservados se deve às alterações ultra estruturais, bioquímicas e funcionais ocorridas numa boa parte da população espermática, resultando em insuficiência na motilidade e perda de viabilidade dos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea (MEDRANO et al., 2017; SALAMON; MAXWELL, 2000). Muitas dessas alterações são produzidas por variações térmicas e osmóticas, bem como a produção de níveis excessivos de espécies reativas de oxigênio (ROS), que causam estresse oxidativo nas células, afetando a motilidade espermática através de mudanças nas funções mitocondriais (MEDRANO et al., 2017; JANG et al., 2010). De acordo com Corcini (2010); Martinez et al., (1993), inúmeros são os fatores que afetam a viabilidade seminal após o congelamento; muitos desses são conhecidos e outros ainda precisam ser elucidados.

Os testes convencionais utilizados rotineiramente na avaliação do sêmen, a exemplo da viabilidade, motilidade progressiva, concentração, morfologia, podem ser bons indicadores, porém não permitem predizer o real potencial fertilizante de um carneiro. A fertilização do oócito pelo espermatozoide é um processo complexo que envolve uma série de eventos (TSAKMAKIDIS, 2010). Por isso, a avaliação de um único parâmetro não garante que o sêmen seja fértil, apenas dá indícios se a amostra está dentro dos parâmetros aceitáveis (CORCINI, 2010; MARTINEZ et al., 1993).

Portanto, é necessário a combinação de várias técnicas de avaliação e uma análise multifatorial mais apropriada, para diagnóstico da funcionalidade e integridade dos espermatozoides criopreservados (MELO; HENRY, 1999).

O sucesso no processo de congelamento de sêmen ovino e nas taxas de prenhes na IA não dependem unicamente da qualidade do diluente utilizado, do protocolo de sincronização ou do método de inseminação, mas sim da qualidade do sêmen a ser congelado, que sofre a influência da sazonalidade. Desta forma, o presente estudo tem por objetivo avaliar a influência da sazonalidade sobre a viabilidade do sêmen ovino após o descongelamento.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Em cada estação do ano procedeu-se uma coleta de sêmen de 13 carneiros de raça leiteira, para o congelamento. Após todas as avaliações rotineiras iniciais do sêmen fresco, procedeu-se a realização do congelamento das amostras de sêmen de cada carneiro, para que estas fossem posteriormente submetidas a avaliações pós-descongelamento.

4.2.1 Congelamento do sêmen

Após a primeira coleta de sêmen de cada carneiro, para obtenção da informação de volume ejaculado, foi realizada uma segunda coleta para congelamento e avaliações posteriores. Foram realizadas as avaliações iniciais do sêmen e então determinada a concentração espermática para realizar a diluição do sêmen para o congelamento. A diluição foi realizada em duas etapas, inicialmente com a adição da fração A, contendo tris-gema sem glicerol, seguida da adição da fração B, composta de tris-gema com 10% de glicerol, obtendo-se uma concentração final de tris-gema com 5% de glicerol. O sêmen de cada carneiro, foi então acondicionado em palhetas de 0,25 mL na concentração de 100×10^6 células/palheta e em seguida submetido à curva de resfriamento em caixa isotérmica, com uma taxa média de resfriamento de $0,25 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ até atingir $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, permanecendo na caixa durante 4 horas para estabilização. Feito isso, foi realizada a curva de congelamento, onde as palhetas foram suspensas em vapor de nitrogênio, a 5 centímetros do nitrogênio líquido,

durante 20 minutos. Logo após, foram mergulhadas em nitrogênio líquido, raqueadas e armazenadas em botijão criogênico a -196°C .

4.2.2 Teste de termo resistência (TTR)

Assim como procedido com o sêmen fresco, foi realizado TTR com o sêmen descongelado de cada carneiro, em cada estação do ano. Para tal, as palhetas foram descongeladas em banho-maria à 37°C durante 20 segundos e após submetidas a avaliação de motilidade progressiva e vigor espermático. Após a avaliação inicial, as amostras foram incubadas em banho-maria à 37°C durante 3 horas, sendo feitas avaliações de motilidade progressiva e vigor espermático a cada hora.

4.2.3 Teste Hiposmótico (HOS)

O teste hiposmótico foi utilizado para avaliar a funcionalidade da membrana espermática baseando-se nas propriedades da manutenção do equilíbrio osmótico entre o ambiente intra e extracelular. Para tal, foi utilizado 10 μL de sêmen descongelado e diluído em 100 μL de solução de citrato de sódio e frutose (solução hiposmótica com 80 mOsm), adaptado de Correa; Zavos (1994), que não observaram diferença estatística entre os resultados, quando o sêmen foi avaliado com solução hiposmótica com 75 ou 100 mOsm. Essa amostra foi incubada em banho-maria a 37°C por 15 min, e em seguida uma gota dessa amostra (10 μL) colocada entre lâmina e lamínula para avaliação em microscópio óptico em aumento de 400x, onde um mínimo de 200 células foi avaliado quanto a presença de cauda dobrada (células com membrana plasmática íntegra) ou não, e o resultado expresso em percentual de espermatozoides positivos ou reativos ao teste hiposmótico. Para o resultado final foi subtraído o número de espermatozoides com cauda dobrada, observados pelo teste de morfologia espermática, seguindo a fórmula:

$$\text{HOS (\%)} = (\% \text{ de alterações na região da cauda no teste HOS}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda dos espermatozoides antes do teste HOS}).$$

A avaliação foi realizada conforme os padrões estipulados pelo CBRA (2013).

4.2.1 Morfologia espermática

Para avaliar a morfologia espermática do sêmen congelado em cada estação, concomitante as avaliações realizadas durante o descongelamento das amostras de sêmen, uma gota de cada amostra foi depositada em lâmina previamente aquecida a 37 °C e realizado esfregaço. Posterior ao período de secagem das lâminas, procedeu-se a coloração dessas lâminas através da técnica de coloração de Cerovski, conforme descrito no manual do CBRA (2013). Por fim, realizou-se a avaliação da morfologia espermática em microscópio óptico, em aumento de 400x, onde foram contados um mínimo de 200 células e contabilizados os defeitos, e estes classificados em defeitos maiores e menores.

4.2.2 Teste de migração ascendente “Swim-up”

Inúmeros métodos de preparação espermática são utilizados rotineiramente nos sistemas de fertilização *in vitro* (FIV). Estes métodos, dentre eles o Swim-up (DODE et al., 2002), tem por objetivo remover o plasma seminal/crioprotetores, aumentar a qualidade espermática e iniciar a capacitação (PARRISH et al., 1995).

O Swim-up é uma metodologia que utiliza a motilidade espermática como método de seleção de espermatozoides. Tem como princípio a remoção do plasma seminal, células mortas, debris e contaminantes presentes na amostra de sêmen, e seleção dos espermatozoides mais viáveis. Para a realização da técnica, foi colocado em um tubo cônico de 15 mL, 200 µL de meio SPERM-Talp e em seguida, adicionado na porção inferior do tubo, sob o meio, 100 µL de sêmen, com auxílio de uma pipeta automática. Esse sêmen com o meio de cultura foi incubado em banho-maria a 38,5 °C durante 50 minutos, para que ocorresse a migração espermática. Após o tempo de incubação, o sobrenadante da amostra (100 µL) foi retirado com uma pipeta e acondicionado em outro recipiente para realização das avaliações. Dessa amostra recolhida, cerca de 10 µL foi colocado entre lâmina e lamínula e avaliado quanto a motilidade progressiva e vigor espermático, em microscópio óptico, em aumento de 100x. Após essa avaliação, 10 µL da amostra foi diluído em 90 µL de água, respeitando uma diluição 1:10, para proceder a contagem de células espermáticas em câmara de Neubauer, para realização do cálculo de concentração espermática no

teste de Swim-up. Procedeu-se ao menos duas repetições para o sêmen de cada carneiro, congelado em cada estação do ano.

4.2.3 Fertilização *in vitro* (FIV) heteróloga

Foi realizada com o sêmen congelado em cada estação do ano para avaliar a fertilidade do sêmen coletado, e a influência da estação sobre este. Para a FIV heteróloga, foi utilizada a metodologia proposta por García-Álvarez et al. (2009) onde se utilizou ovários provenientes de abatedouro com folículos de 2 a 8 mm de diâmetro, que foram puncionados com o auxílio de uma bomba de sucção a vácuo. Após sedimentação (15 minutos) os oócitos foram recuperados em placa de Petri em líquido folicular centrifugado, sob lupa estereomicroscópica. Após a busca, os oócitos foram selecionados de acordo com o aspecto morfológico, utilizando-se apenas oócitos de qualidade boa ou excelente no experimento. Grupos de oócitos frescos (n=50) foram maturados poços de placas Nunc, contendo 500 µL de meio de maturação, composto por TCM199 suplementado com FSH, LH e soro fetal bovino (SFB). Os oócitos foram maturados durante 22-24 horas, a 38,5 °C em atmosfera com 5% de CO₂ em ar, com umidade saturada. Para a FIV, foi utilizado sêmen dos carneiros coletados durante as 4 estações. Os oócitos maturados e os espermatozoides foram co-incubados em meio SOFaaci, suplementado com 6 mg/mL de BSA, 10% de SFB e PHE, durante 18-22 horas. O cultivo *in vitro* (CIV), foi realizado em placas de 96 poços contendo 100 µL de meio SOFaaci (HOLM et al., 1999), suplementado com 10% de SFB, sob óleo mineral, em atmosfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂, a 38,5 °C durante 2 dias, para avaliação de clivagem.

4.2.4 Análise estatística

Os resultados obtidos durante o período de experimento foram avaliados estatisticamente usando o software JMP versão 5, 2002 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), considerando significativo $p \leq 0,05$.

No modelo estatístico delineado para as avaliações realizadas no sêmen congelado em cada estação, os carneiros de raças leiteiras foram considerados como efeito fixo, e como efeito aleatório a estação do ano em que foi realizado o congelamento. Os carneiros foram avaliados entre raças e entre carneiros, quanto a

diferenças estatística para os resultados obtidos, nas avaliações pós-descongelamento do sêmen, para cada estação de congelamento, e em não havendo diferença significativa, cada carneiro, dentro de cada estação do ano, foi considerado como uma repetição.

Os valores foram avaliados previamente quanto a normalidade através do teste de Shapiro-Wilk. O teste de Tukey foi aplicado para comparar os valores obtidos por ANOVA, sempre que os p -valores fossem menores que 5% ($p < 0,05$). Utilizou-se a ANOVA em dados como o teste hiposmótico. As avaliações que não apresentaram distribuição normal, foram avaliadas pelo teste não paramétrico de Wilcoxon (Qui-quadrado), com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O advento da criopreservação do sêmen trouxe novas perspectivas para a ovinocultura, possibilitando maximizar o uso dos reprodutores, além de permitir a troca de material genético sem a necessidade de gastos com a compra e transporte de novos carneiros. Entretanto, os resultados obtidos após a criopreservação ainda são insatisfatórios, haja visto, a grande variação da qualidade do sêmen obtida após o descongelamento (MAXWELL; WATSON, 1996; LEBOEUF et al., 1998), causada por inúmeros fatores que vem sendo estudados. O presente estudo avaliou a influência da sazonalidade sobre a viabilidade seminal após o processo de criopreservação. Os resultados obtidos nas avaliações bem como as considerações pertinentes são desenvolvidos a seguir.

Os testes laboratoriais de avaliação do sêmen após o descongelamento, são importantes não só para a predição da fertilidade, mas também para o estudo de novos meios de preservação. A motilidade, o vigor e o teste de termorresistência são rotineiramente utilizados (LUZ et al., 2000). O TTR mimetiza a condição a que o sêmen é submetido dentro do trato reprodutivo da fêmea.

Na avaliação da motilidade progressiva e vigor do sêmen após-descongelamento, observou-se que o sêmen congelado no outono apresentou motilidade superior ao sêmen congelado no verão, sendo estes semelhantes aos resultados obtidos na primavera e no inverno. No outono a motilidade do sêmen pós-descongelamento sofreu redução já na primeira hora de TTR. No inverno, a redução ocorreu somente a partir da segunda hora. Na primavera e no verão a motilidade

reduziu somente com 3h de TTR. Ao final do teste de TTR a motilidade do congelamento do outono foi superior a observada no verão, sendo estes semelhantes a primavera e ao inverno. O vigor do sêmen congelado foi semelhante entre as estações desde zero até duas horas de TTR. Após 3h, o vigor observado no verão foi inferior ao do inverno, e estes foram semelhantes ao outono e primavera. Na primavera o vigor reduziu somente na terceira hora de TTR, enquanto nas demais estações houve redução significativa a partir da segunda hora (Tabela 3). Diferente do observado em carneiros de raças leiteiras, Tuli; Holtz (1995), observaram, no sêmen de bodes Boer na Etiópia, não haver diferença significativa entre a motilidade pós descongelamento no verão e outono, ao passo que no inverno a motilidade foi maior que na primavera.

Os resultados obtidos neste estudo, onde observou-se redução da motilidade progressiva e vigor espermático após o descongelamento, até as três horas de avaliação do TTR, estão em acordo com os achados de Cunha et al. (2012), que observaram motilidade de 76% e vigor 3 logo após o descongelamento, contra 46% e 2,6 ao final do TTR. Harrison; Vickers (1990) descrevem que a redução na motilidade e vigor espermático durante o TTR podem estar relacionados com a perda de componentes intracelulares ou lesões estruturais na cauda dos espermatozoides. Isto levaria a uma perda da resistência espermática e queda na sobrevivência celular, refletindo de forma negativa nas taxas de prenhez, quando utilizado esse sêmen.

De acordo com Luz et al. (2000), sêmen ovino que apresenta menos de 20% de motilidade após TTR, proporciona índices de prenhez insatisfatórios. Assim, com os resultados obtidos, é possível que o sêmen de carneiros de raças leiteiras, quando congelado na estação verão, nas condições do presente estudo, também apresentem menores resultados de prenhez. Santos et al. (2006) relatam que sêmen que apresenta maior motilidade pós-descongelamento, apresentam também maior motilidade após o TTR, caracterizando maior longevidade espermática. Os achados deste estudo vão de encontro ao observado pelos autores, sendo observado que no outono o sêmen apresenta melhor motilidade pós descongelamento e ao final do TTR. D'Alessandro; Martemucci (2003) observaram redução drástica da motilidade progressiva ao final do TTR, no sêmen de carneiros Leccese no sul da Itália (latitude 41° N), apresentando mais de 20% de queda na motilidade. Em contraste, no presente estudo, os carneiros Lacaune e Milchschaft produziram uma menor redução da motilidade (10% em média).

Desta forma, como o sêmen apresentou motilidade progressiva e vigor espermático inferiores no verão, seria interessante não congelar sêmen destes carneiros, nessa estação.

Tabela 3 – Motilidade progressiva e vigor espermático no pós-descongelamento do sêmen ovino, congelado nas distintas estações do ano

Estação	Motilidade (0 -100%)				Vigor (1 - 5)			
	h0	h1	h2	h3	h0	h1	h2	h3
Primavera	40,6 ± 9,7 ^{abA}	35,5 ± 10,6 ^{aAB}	34,5 ± 10,4 ^{abAB}	31,7 ± 9,6 ^{abB}	3,1 ± 0,4 ^{xx}	3,0 ± 0,5 ^{xyY}	2,9 ± 0,4 ^{xyY}	2,8 ± 0,4 ^{xyY}
Verão	37,3 ± 10,4 ^{bA}	37,3 ± 9,8 ^{aA}	35,2 ± 12,0 ^{bAB}	27,1 ± 11,7 ^{bB}	3,2 ± 0,4 ^{xx}	3,0 ± 0,4 ^{xx}	2,7 ± 0,4 ^{xy}	2,5 ± 0,5 ^{yY}
Outono	43,0 ± 6,7 ^{aA}	40,6 ± 4,6 ^{abB}	37,5 ± 6,4 ^{aBC}	33,9 ± 6,4 ^{aC}	3,3 ± 0,4 ^{xx}	3,1 ± 0,4 ^{xyY}	2,9 ± 0,4 ^{xyZ}	2,8 ± 0,4 ^{xyZ}
Inverno	41,2 ± 6,9 ^{abA}	38,6 ± 8,4 ^{bAB}	35,3 ± 9,3 ^{abBC}	32,4 ± 10,0 ^{abC}	3,2 ± 0,4 ^{xx}	3,0 ± 0,4 ^{xyY}	2,9 ± 0,4 ^{xy}	2,8 ± 0,5 ^{xy}

Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística entre as estações (a-b; x-y) $p < 0,05$; Letras diferentes na mesma linha apresentam diferença entre os tratamentos (A-C; X-Z) $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Na avaliação da taxa de sobrevivência espermática ao congelamento, observou-se que a proporção de espermatozoides que sobreviveram ao congelamento foi superior no outono em relação ao verão, sendo ambas estações semelhantes a primavera e ao inverno. Pode-se verificar a existência de variação estacional na taxa de sobrevivência espermática pós congelamento, haja visto que, no outono foi de aproximadamente 52% e no verão 44%, indicando a existência da influência da sazonalidade sobre a criotolerância espermática (Tabela 4). D'Alessandro; Martemucci (2003) no Sul da Itália (latitude 41°N), observaram maior taxa de sobrevivência de sêmen de carneiros Leccese congelado no verão e outono em relação ao inverno e primavera, diferindo parcialmente do observado neste estudo. Segundo os autores, a sobrevivência pós-descongelamento sofre influência estacional, entretanto existe efeito individual do macho, o que pode justificar as diferenças observadas. De acordo com Luz et al. (2000), amostras de sêmen que apresentam motilidade progressiva acima de 40%, logo após o descongelamento, proporcionam um maior percentual de prenhez, em relação aos que tiveram menor motilidade. Conforme Santos et al. (2006), fatores externos que influenciem na quantidade hormonal produzida pelo macho e nos substratos necessários para

manutenção da viabilidade espermática após a ejaculação, acabam determinando menor resistência dos espermatozoides às mudanças de temperatura, durante a criopreservação. Isso interfere na taxa de sobrevivência pós-descongelamento. Corroborando, Silva et al. (2011), descrevem que o estresse térmico interfere diretamente na espermatogênese, afetando a viabilidade pós congelamento, já que reduz a resistência dos espermatozoides ao processo de criopreservação. Desta forma, pode-se dizer que a estação afeta diretamente a taxa de sobrevivência dos espermatozoides ao processo de criopreservação, como observado neste estudo, onde a taxa de sobrevivência ao congelamento foi menor na estação com temperaturas mais elevadas em relação a estação de temperaturas mais amenas, demonstrando que o estresse térmico tem influência sobre a resistência e qualidade dos espermatozoides. Hafez; Hafez (2004) descrevem haver efeito estacional sobre a qualidade e morfologia espermática, com mais defeitos durante a primavera e declínio a medida que a estação de monta avança. Desta forma, os espermatozoides apresentam menor resistência fora da estação reprodutiva, ou ainda, existem alterações hormonais e bioquímicas, influenciadas pela sazonalidade, que afetam a qualidade espermática e a sua resistência a criopreservação. Os resultados obtidos permitem inferir que não é interessante congelar sêmen na estação com temperaturas mais elevadas (verão), devendo o processo ser realizado em estações mais favoráveis, possibilitando melhor qualidade seminal após o descongelamento.

Tabela 4 – Motilidade progressiva do sêmen ovino fresco e descongelado, e taxa de sobrevivência à criopreservação nas diferentes estações do ano

	Motilidade fresco (0 – 100%)	Motilidade descongelado (0 – 100%)	* Sobrevivência pós congelamento (%)
Primavera	88,5 ± 3,2 ^a	40,6 ± 9,7 ^{ab}	46,1 ± 11,5 ^{ab}
Verão	84,6 ± 4,3 ^{ab}	37,3 ± 10,4 ^b	44,2 ± 13,0 ^b
Outono	82,7 ± 6,0 ^b	43,0 ± 6,7 ^a	51,6 ± 7,4 ^a
Inverno	86,2 ± 5,1 ^{ab}	41,2 ± 6,9 ^{ab}	48,3 ± 9,2 ^{ab}

Valores com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença entre as estações, $p < 0,05$.

* Diferença entre a porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva no sêmen fresco (vivos) e a porcentagem de espermatozoides vivos após o descongelamento.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

A avaliação da morfologia espermática e da integridade de membrana (HOS), são testes essenciais na avaliação do potencial fertilizante de uma amostra de sêmen, uma vez que espermatozoides morfologicamente normais e com membranas íntegras, são pré-requisitos para os eventos relacionados ao processo de fertilização (SOARES; GUERRA, 2009). No presente trabalho não foram observadas diferenças significativas na avaliação morfológica e no teste HOS entre as estações. Além disso, os resultados obtidos para patologias espermáticas foram baixos e insignificantes para a fertilidade dos reprodutores. Para os resultados ao HOS, estes apresentam uma variação de 27,9 a 45,6% de células reativas ao teste. Entretanto, pode-se verificar uma baixa resposta do sêmen ovino ao teste hiposmótico, em todas as estações (Tabela 5). Oliveira et al. (2013) também obtiveram baixos resultados quando avaliaram sêmen caprino. Estes diferem dos achados de Correa; Zavos (1994), os quais observaram cerca de 56% de células íntegras (reativas ao HOS) na avaliação de amostras de sêmen bovino, quando utilizada solução hiposmótica com 75, 100 e 300 mOsm. Segundo Huang et al. (2000), altas temperaturas diárias, em torno de 35 – 39 °C, podem influenciar a qualidade espermática, alterando o processo de maturação espermática no epidídimo, comprometendo a estrutura das membranas. Isso pode justificar baixos índices de reatividade ao teste HOS, em estações com temperaturas elevadas. Porém essa justificativa não se aplica ao presente estudo, já que os resultados no HOS foram baixos em todas as estações, mesmo naquela em que a temperatura média foi inferior a 20 °C. Uma explicação plausível para os baixos

índices no teste HOS, possivelmente se deva a danos na integridade de membrana plasmática dos espermatozoides durante o processo de congelamento/descongelamento, levando a diminuição da capacidade desses reagirem ao aumento de volume celular em resposta a baixa osmolaridade (HOSSAIN et al. 1998).

Tabela 5 – Viabilidade espermática determinada pela morfologia e integridade de membrana plasmática no sêmen ovino congelado nas diferentes estações do ano

	Defeitos maiores (%)	Defeitos Menores (%)	HOS (%)
Primavera	1,1 ± 0,9	1,0 ± 1,2	38,3 ± 4,7
Verão	0,8 ± 0,7	0,8 ± 0,6	32,9 ± 5,0
Outono	1,1 ± 1,1	0,8 ± 0,7	40,1 ± 3,1
Inverno	1,0 ± 0,9	1,0 ± 0,8	39,5 ± 6,1

HOS: Teste Hiposmótico;
 $p > 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Outras formas de avaliar a qualidade seminal e o potencial fertilizante é através dos testes de seleção espermática e da fertilização *in vitro*. No estudo em questão, utilizou-se como método de seleção espermática o teste de migração ascendente “Swim up”, que tem por finalidade selecionar os melhores espermatozoides (com maior potencial de fertilidade), através da sua habilidade de migração (PARRISH et al., 1995). Na avaliação do sêmen congelado quanto a sua viabilidade após submissão ao Swim up, a taxa de recuperação dos espermatozoides, a porcentagem de espermatozoides móveis e o vigor não variou nas diferentes estações (Tabela 6). Para avaliar o potencial fertilizante dos espermatozoides *in vitro*, fez-se a utilização da fertilização *in vitro* heteróloga com oócitos bovinos. Nesta avaliação verificou-se, que a taxa de clivagem foi semelhante entre as diferentes estações, demonstrando não haver diferença significativa entre os resultados obtidos (Tabela 6). Com os resultados obtidos, pode-se supor que não há influência da sazonalidade sobre as variáveis estudadas, principalmente Motilidade, Vigor e Taxa de Clivagem. Esta similaridade pode ser motivada pelo processo de seleção espermática, que acaba sempre por selecionar os melhores espermatozoides (viáveis), não permitindo haver diferença

entre os tratamentos. Entretanto, considerando o fato de que a sazonalidade pode influenciar a viabilidade/qualidade inicial do sêmen congelado, esta pode refletir na taxa de recuperação celular após o Swim up. Esta suposição não foi confirmada no presente estudo, não havendo diferença significativa na taxa de recuperação entre as estações. Segundo Martí et al. (2006), o método de Swim up apresenta bons resultados na taxa de clivagem na produção de embriões *in vitro*. Porém, apresenta a desvantagem de baixa recuperação de espermatozoides (PARRISH et al., 1995), corroborando com os achados deste estudo, onde apesar de não haver diferença estacional entre as avaliações de Swim up, a taxa de recuperação foi baixa. Apesar de não haver diferença entre a taxa de clivagem nas estações, a FIV heteróloga é um método eficiente para avaliar *in vitro* a fertilidade de carneiros (GARCÍA-ÁLVARES et al., 2009), do que somente avaliações básicas do sêmen. Segundo Tsakmakidis (2010) a FIV heteróloga é uma ferramenta útil na predição da fertilidade de carneiros. Além disso, Byrne et al. (2000); O'Meara et al. (2005) sugerem que a FIV com sêmen de carneiro descongelado, permite uma avaliação válida da capacidade do sêmen para realizar fertilização *in vivo*.

Tabela 6 - Recuperação espermática, motilidade progressiva e vigor espermático de sêmen ovino, após Swim up e taxa de clivagem na FIV heteróloga com oócitos bovinos

Swim up	Taxa de recuperação	Motilidade	Vigor	Taxa de clivagem
Primavera	9,7 ± 6,1	75,8 ± 18,0	3,3 ± 0,5	46,5 ± 9,9
Verão	10,3 ± 9,7	69,3 ± 11,7	3,2 ± 0,4	52,6 ± 5,9
Outono	18,4 ± 20,1	71,7 ± 4,1	3,1 ± 0,2	50,5 ± 6,6
Inverno	20,5 ± 28,0	71,4 ± 12,1	3,1 ± 0,3	45,5 ± 11,8

$p > 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 CONCLUSÕES

Através da avaliação dos resultados obtidos durante o experimento, pode-se concluir que existe influência da sazonalidade sobre a criotolerância espermática de carneiros leiteiros, tendo maior sobrevivência no outono, em relação ao verão,

indicando uma possível influência das temperaturas mais elevadas. Entretanto, contrariando o que era esperado, mesmo com tais diferenças, não existe efeito da sazonalidade sobre as taxas de clivagem após FIV heteróloga com sêmen descongelado, demonstrando que é possível congelar sêmen de carneiros leiteiros em qualquer estação, com boa viabilidade. Além disso, não existe efeito estacional sobre a morfologia espermática e integridade de membrana das células, permitindo congelar sêmen de carneiros de raças leiteiras em qualquer estação do ano, sem prejuízos na viabilidade. Ainda, como existe efeito estacional sobre a motilidade do sêmen após o descongelamento, e esta ser melhor durante o outono (estação reprodutiva), é interessante o desenvolvimento de novos estudos que permitam melhorar a qualidade do sêmen quando congelado nas estações menos favoráveis, permitindo otimizar o uso dos reprodutores e também o congelamento de sêmen.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRUDA, R. P. de; BARNABE, V. H.; ALENCAR, M. M.; BARNABE, R. C. Evaluation of frozen bull semen. Quick and slow thermoresistance tests: effects on fertility. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.29, p. 131–137, 1992
- AZEVEDO, D. M. M. R.; MARTINS FILHO, R.; ALVES, A. A.; ARAÚJO, A. A. de; BRAGA LÔBO, R. N. Comportamento sexual de ovinos e caprinos machos: uma revisão. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia – PUBVET**, v.2, n.6, [S. l.: s. n.], fev. 2008. Art. 140. Disponível em: <<http://pubvet.com.br/material/Azeve55wf.pdf>>. Acesso em: 24 ago. 2016.
- BARBAS, J. P.; SOUSA, J. P. F.; FERREIRA, G. M. B. C.; BAPTISTA, M. C.; HORTA, A. E. M. Variação anual das características seminais de carneiros Merino Regional e Serra da Estrela, em sêmen fresco. **Revista Portuguesa de Zootecnia**, v.8, n.2, p.312-323, 2001.
- BIANCHI, A. E.; GOMES MONTEIRO, A. L.; MORAIS, O. R de; BATISTA, R.; CAMARGO DEBORTOLI, E. de. Caracterização dos sistemas produtivos de ovinos de leite no Brasil. Radar Técnico-Ovinos e Caprinos, **MilkPoint**, 2016. Disponível em:<<http://www.milkpoint.com.br/radartecnico/ovinoscaprinos/caracterizacaodossistemasprodutivosdeovinosdeleitenobrasil102577n.aspx>>. Acesso em: 10 mar. 2018 às 10:00 horas.
- BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C.; SILVA MARIA, M. S.; SOUSA, D. B.; RODELLO, L. Aspectos peculiares da inseminação artificial em ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.33, (Supl 1), p.127-130, 2005.
- BRAUN, W. F.; THOMPSON, J. M.; ROSS, C. V. Ram scrotal circumference measurements. **Theriogenology**, v.13, p.221-229, 1980.
- BRITO, M. A.; GONZÁLEZ, F. D.; RIBEIRO, L. A.; CAMPOS, R.; LACERDA, L.; BARBOSA, P. R.; BERGMANN, G. Composição do sangue e do leite em ovinos leiteiros do sul do Brasil: variações na gestação e na lactação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 3, n. 36, p. 942-948, 2006.
- BYRNE, G. P.; LONERGAN, P.; WADE, M.; DUFFY, E. P.; DONAVAN, A.; HANRAHAN, J. P.; BOLAND, M. P. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.265-275, 2000.
- CARDOSO, F. M.; QUEIROZ, G. F. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and daily sperm production of Brazilian hairy rams. **Animal Reproduction Science**, v.17, p.77-88, 1988.
- CASA DA OVELHA. Lacaune – conheça essa raça de ovelhas. **Casa da ovelha e parque da ovelha**. 2015. Disponível em:

<<http://casadaovelhaoficial.blogspot.com.br/2015/01/lacaune-conheca-essa-raca-de-ovelhas.html>>. Acesso em: 22 mar. 2018, às 15:00 horas.

CASAO, A.; PÉREZ-PÉ, R.; ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. The effect of exogenous melatonin during the non-reproductive season on the seminal plasma hormonal profile and the antioxidante defence system of Rasa Aragonesa rams. **Animal Reproduction Science**, v.138, p.168-174, 2013.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal** / Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Belo Horizonte: CBRA, 3º ed., 2013. 104p.

CLARKE, I. J.; TILBROOK, A. J. Influence of non-photoperiodic environmental factors on reproduction in domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 219-228, 1992.

COELHO, L. A.; SASA, A.; BICUDO, S. D.; BALIEIRO, J. C. C. Concentrações plasmáticas de testosterona, triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) em bodes submetidos ao estresse calórico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.6, p.1338-1345, 2008.

CORCINI, C. D. **Estudo de testes *in vitro* para a predição de fertilidade de machos mamíferos**. 2010. Tese (Doutorado em Reprodução animal) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

CORREA, J. R.; ZAVOS, P. M. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. **Theriogenology**, v.42, p.351-360, 1994.

CORREA, J. R.; PACE, M. M.; ZAVOS, P. P. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in artificial insemination program. **Theriogenology**, v.48, p.721-31, 1997.

CUNHA, E. R. da; SILVA, C. G. da; MARTINS, C. F. Estudo comparativo dos testes de termo-ressistência rápido, lento e fisiológico em sêmen criopreservando bovino importado. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA: a produção animal no mundo em transformação, 49, 2012, Brasília, **Anais...** Brasília, 2012.

CUNHA, G. R.; RISBRIDGER, G.; WANG, H.; YOUNG, P. Evidence that epithelial mesenchymal estrogen receptor-? mediates effects of estrogen on prostatic epithelium. **Development Biology**, Pasadena, v.229, n.2, p.432-442, 2002.

D'ALESSANDRO, A. G.; MARTEMUCCI, G. Evaluation of seasonal variations of sêmen freezability in Leccese ram. **Animal Reproduction Science**, v.79, p.93-102, 2003.

DANTAS, V. M. **Efeito da sazonalidade nas características reprodutivas de bodes e carneiros**. 2009. Revisão de Literatura (Seminário I) – Faculdade de

Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.

DELGADILLO, J. A.; LEBOEUF, B.; CHEMINEAU, P. Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by photoperiodic cycles in goat bucks. **Small Ruminant Research**, v.9, p.47-59, 1992.

DODE, M. A. N.; RODOVALHO, N. C.; UENO, V. G.; FERNANDES, C. E. The effect of sperm preparation and co-incubation time on in vitro fertilization of *bos indicus* oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.69, p.15-23, 2002.

DREVIUS, L. O. The permeability of bull spermatozoa to water, polyhydric alcohols and univalent anions and the effects of the anions upon the kinetic activity of spermatozoa and sperm models. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.28, p.41-54, 1972.

DUFOUR, J. J.; FAHMY, M. H.; MINVIELLE, F. Seasonal changes in breeding activities, testicular size, testosterone concentration and seminal characteristics in rams with long or short breeding season. **Jornal Animal Science**. v.58, p.416-422, 1984.

FARIA, N. I. G. **Fertilização *in vitro* Heteróloga utilizando ovócitos de bovino e sêmen de garanhão**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Zootécnica) – Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo, 2011.

FEITOSA, F. Semiologia Veterinária a arte do diagnóstico. 7.ed. São Paulo, 2004. 412-423.

FELICIANO SILVA, A. E. D.; NUNES, J. F. Estacionalidade na atividade sexual e qualidade do sêmen nos ovinos deslançados das raças Santa Inês e Somalis. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.8, n.4, p.207-214, 1984.

FOLHADELLA, I. de M. Biotecnologia do touro. In: PALHANO, HELCIMAR B. **Reprodução em bovinos: Fisiopatologia, terapêutica, manejo e biotecnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: L.F. Livros, 2008. cap.9, p.167–179.

FONSECA, J. F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em caprinos e ovinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005, Goiânia, **Anais...**, Goiânia, 2005.

FONSECA, J. F. da. **Biotechnologias da reprodução em ovinos e caprinos**. Sobral, CE: Embrapa Caprinos, 2006. 30 P. (Documentos/ Embrapa Caprinos, ISSN 1676-7659; 64).

FOURIE, P. J.; SCHWALBACH, L. M.; NESER, F. W. C.; VAN der WESTHUIZEN, C. Scrotal, testicular and semen characteristics of young Dorper rams managed under intensive and extensive conditions. **Small Ruminant Research**, v. 54, p. 53-59, 2004.

GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; ESTESO, M. C.; PÉREZ-GUZMÁN, M. D.; SOER, A. J. Heterologous in vitro fertilization is a good procedure to assess the fertility of thawed ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.71, p.643-650, 2009.

GERLACH, T.; AURICH, J. E. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster – a review. **Animal Reproduction Science**, v.58, p.197-213, 2000.

GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, M. A. L. de; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M. M.; VISINTIN, J. A.; COSTA, L. F. S. da. Produção In Vitro de Embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R. de; FREITAS, V. J. de F. Biotécnicas aplicadas a reprodução animal. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. cap.14, p. 271-272.

GRANADOS, L. B. C. 2006. In: **Aspectos Gerais na reprodução de caprinos e ovinos**. Luis Bernabe Castillo Granados, Ângelo José Burla Dias e Monique Pessanha de Sales. – 1º ed. Campos dos Goytacazes – Projeto PROEX/UENF.

GÜNDOĞAN, M. Seasonal variation in serum testosterone, T3 and andrological parameters of two Turkish sheep breeds. **Small Ruminant Research**, v.67, p.312-316, 2007.

HAFEZ, E. S. E.; JAINUDEEN, M. R. Falhas reprodutivas em machos. IN: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. (Eds). **Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. 513 p.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal Reproduction and Fertility**, v.88, p.343-352, 1990.

HOLM, P.; BOOTH, P. J.; SCHMIDT, M. H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and Myoinositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, v.52, p.683-700, 1999.

HOSSAIN, A. M.; RIZK, B.; BARIK, S.; HUFF, C.; THORNEYCROFT, I. H. Time course of hypoosmotic swellings of human spermatozoa: evidence of ordered transition between swelling subtypes. **Human Reproduction**, v.13, p.1578-1583, 1998.

HÖTZEL, M. J.; WALKDEN-BROWN, S.; FISHER, J. S.; MARTIN, G. B. Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male Merino and Suffolk sheep: responses to a nutritional stimulus in the breeding and non-breeding seasons. **Reproduction, Fertility and Development**, v.15, p.1-9, 2003.

HUANG, S. Y.; KUO, Y. H.; LEE, Y. P.; TSOU, H. L.; LIN, E. C.; LEE, W. C. Association of heat shock protein 70 with semen quality in boars. **Animal Reproduction Science**, v.63, p.231-240, 2000.

IBRAHIM, S. A. Seasonal variations in semen quality of local and crossbred rams

raised in the United Arab Emirates. **Animal Reproduction Science**, v.49, p.61-167, 1997.

JACOB, J. C. F.; FOLHADELLA, I. de M.; TRÉS, J. E. Anatomia e fisiopatologia do aparelho genital do macho. In: PALHANO, H. B. **Reprodução em bovinos: Fisiopatologia, terapêutica, manejo e biotecnologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: L.F. Livros, 2008. cap.8, p.149 – 165.

JANG, H. Y.; KIM, Y. H.; KIM, B. W.; PARK, I.C.; CHEONG, H.T.; KIM, J. T.; PARK, C. K.; KONG, H. S.; LEE, H. K.; YANG, B. K. Ameliorative effects of melatonina against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on boar sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.943–950, 2010.

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

KAFI, M.; SAFDARIAN, M.; HASHEMI, M. Seasonal variation in semen characteristics, scrotal circumference and libido of Persian Karakul rams. **Small Ruminant Research**. v.53, n.1-2, p.133-139, jun. 2004.

KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S; ALEXOPOULOS, C.; AMARANTIDIS, I. Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. **Small Ruminant Research**. v. 35, n. 1-2, p. 125-130, jul. 2000.

LEBOEUF, B.; MANFREDI, E.; BOUE, P.; PIACÈRE, A.; BRICE, G.; BARIL, G.; BROQUA, C.; HUMBLLOT, P.; TERQUI, M. Artificial insemination of dairy goats in France. **Livestock Production Science**, v.55, p.193-203, 1998.

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

LINCOLN, G. A.; SHORT, R. V. Seasonal breeding: nature's contraceptive. **Recent Progress in Hormone Research**, v.36, p.1-51, 1980. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?hl=pt-R&lr=&id=eXXAAgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=Seasonal+breeding:+nature%E2%80%99s+contraceptive&ots=tdNyG0ejTm&sig=UUbkgBC6UWmf6aMcg2ZNfRpOddc#v=onepage&q&f=true>>. Acesso em: 07/12/2017 às 14:37 h.

LINCOLN, G. A.; LINCOLN, C. E.; NEILLY, S. M. Seasonal cycles in the blood plasma concentration of FSH, inhibin and testosterone, and testicular size in rams of wild, feral and domesticated breeds of sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.623-633, 1990.

LUZ, S. L. N. da; NEVES, J. P.; GONÇALVES, P. B. D. Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, v.37, n.2, 2000.

MACCHI, M. M.; BRUCE, J. N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. **Frontiers in Neuroendocrinology**. 3-4. ed., v.25, p.177-195, set./dez. 2004.

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, abr./jun. 2011.

Disponível em: <

<http://adcon.rn.gov.br/ACERVO/EMPARN/DOC/DOC0000000000000415.PDF>>.

Acesso em: 23 ago. 2016.

MANDIKI, S. N. M.; DERYCKE, G.; BISTER J. L., PAQUAY, R. Influence of season and age on sexual maturation parameters of Texel, Suffolk and Ile-de-France rams. 1. Testicular size, semen quality and reproductive capacity. **Small Ruminant Research**, v.28, n.1, p. 67-79, 1998.

MARTÍ, E.; PÉREZ-PÉ, R.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Comparative Study of Four Different Sperm Washing Methods Using Apoptotic Markers in Ram Spermatozoa. **Journal of Andrology**. v.27, n.6, p.746-53, 2006.

MARTÍ, J. I.; APARICIO, I. M.; LEAL, C. L. V.; GARCÍA-HERREROS, M. Seasonal dynamics of sperm morphometric subpopulations and its association with sperm quality parameters in ram ejaculates. **Theriogenology**, v.78, p.528-541, 2012.

MARTINEZ, E.; VÁZQUEZ, J. M.; MATAS, C.; ROCA, J.; COY, P.; GADEA, J. Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. **Theriogenology**, v.40, p.547-557, 1993.

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

MEDRANO, A.; CONTRERAS, C. F.; HERRERA, F.; ALCANTAR-RODRIGUEZ, A. Melatonin as an antioxidant preserving sperm from domestic animals. **Asian Pacific Journal of Reproduction**. V.6, n.6, p.241-245, 2017.

MEJID, J.; MATHIAS, L. A.; ROBLES, C. A. Clinical manifestations of brucellosis in domestic animals and humans. **Open Veterinary Science Journal**. v.4, p.119-126, 2010.

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

MELO, M. I. V.; HENRY, M.; BEKER, A. R. C. L. Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen equino resfriado com diferentes diluidores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.6, p.757-763, 2005.

MICKELSEN, W. D.; PAISLEY, L. G.; DAHMEN, J. J. The effect of season on the scrotal circumference and sperm motility and morphology in rams. **Theriogenology**, v.16, p.45-51, 1981.

MILCZEWSKI, V.; CHAHAD-EHLERS, S.; SPERCOSKI, K. M.; MORAIS, R. N.; SOCCOL, V. T. Quantifying the effect of seasonality on testicular function of Suffolk ram in lower latitude. **Small Ruminant Research**. v.124, p.68-75, mar. 2015.

MONREAL, A. C. D.; ANJOS, D. S. dos; SOUZA, A. S. de; SOUZA, M. I. L. de. Morfologia espermática de carneiros nativos. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v.15, n.1, p.19-23, jan./jun. 2012.

MUCCIOLO, R. G; BARNABE, R. C.; BARNABE, V. H. Variações no quadro espermático de carneiros submetidos a degeneração testicular experimental. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Universidade de São Paulo, v.11, p.155-177, 1974.

NEVES, J. P.; NUNES, F. J.; MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H. de; MELLO SALGUEIRO, C. C. de; ALMEIDA, J. L. Inseminação artificial em pequenos ruminantes. IN: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R. de; FEGUEIREDO FREITAS, V. J. de. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. ed. 2, São Paulo: ROCA, 2008.

OBERST, E. R.; SMIRDELE, W. A.; BRITO, M. A.; MARSCNER, T. R.; RIBEIRO, L. A.; MATTOS, R. C. Seasonal variation in sêmen quality of lacaune rams in Brazil. **Brazilian Journal Veterinarian Animal Science**, São Paulo, v.48, n.4, p.319-324, 2011.

OLIVEIRA, M. E. F. Influência da sazonalidade na reprodução das ovelhas e cabras. Radar Técnico-Ovinos e Caprinos, **MilkPoint**, 2012. Disponível em:< <https://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/ovinos-e-caprinos/influencia-da-sazonalidade-na-reproducao-das-ovelhas-e-cabras-81049n.aspx>>. Acesso em: 07 dez. 2017 às 14:00 horas.

OLIVEIRA, I. R. S. de; ALVES, H. M.; CASTELO, T. S.; BEZERRA, F. S. B.; SUASSUNA BEZERRA, A. C. D.; SILVA, A. R. Correlação entre o teste hiposmótico e a avaliação clássica do sêmen de caprinos. **Ciência Animal Brasileira**, v.14, n.2, p.216-221, abr./jun. 2013.

O'MEARA, J. P.; HANRAHAN, A.; DONOVAN, S.; FAIR, D.; RIZOS, M.; WADE, M.; BOLAND, M. P.; EVANS, A. C.; LONERGAN, P. Relationship between in vitro fertilisation of ewe oocytes and the fertility of ewes following cervical artificial insemination with frozen-thawed ram sêmen. **Theriogenology**, v.64, p.1797-1808, 2005.

PACHECO, A.; QUIRINO, C. R. Comportamento sexual em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.34, n.2, p.87-97, 2010.

PARRISH, J. J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either Swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v.44, p.859-869, 1995.

REGE, J. E. O.; TOE, F.; MUKASA-MUGERWA, E.; TEMBELY, S.; ANINDO, D.; BAKER, R. L.; LAHLOU-KASSI, A. Reproductive characteristics of Ethiopian

highland sheep. II. Genetic parameters of semen characteristics and their relationships with testicular measurements in ram lambs. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.37, p.173-187, 2000.

REICHENBACH, Horst-Dieter; FERRUGEM MORAES, J. C.; NEVES, J. P. Tecnologia do semen e inseminação artificial em bovinos. IN: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R. de; FEGUEIREDO FREITAS, V. J. de. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. ed. 2, São Paulo: ROCA, 2008.

ROSA, H. J. D.; BRYANT, M. J. Seasonality of reproduction in sheep. **Small Ruminant Research**, v.48, p.155-171, 2003.

ROTA, A.; PENZO, N.; VINCENTI, L.; MANTOVANI, R. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v.53, p.1425-1420, 2000.

SÁ, C. O. de; SÁ, J. L. de. **Estacionalidade reprodutiva**. 2001. Disponível em: <http://www.crisa.vet.br/exten_2001/estacional.htm>. Acesso em: 23 out. 2017.

SÁ, C. O.; SÁ, J. L. de. Radar técnico: Estacionalidade reprodutiva em ovinos. **MILKPOINT**. 2006. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/ovinos-e-caprinos/estacionalidade-reprodutiva-em-ovinos-155n.aspx>>. Acesso em: 23 out. 2017.

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

SANTOS; D. O.; SIMPLÍCIO, A. A. Parâmetros escroto-testiculares e de sêmen em caprinos adultos submetidos à insulação escrotal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.9, p.1835-1841, set. 2000.

SANTOS, A. D. F.; TORRES, C. A. A.; FONSECA, J. F.; BORGES, A. M.; COSTA, E. P.; GUIMARÃES, J. D.; ROVAY, H. Parâmetros reprodutivos de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.5, p.1926-1933, 2006.

SARLÓS, P.; EGERSEZGI, I.; BALOGH, O.; MOLNÁR, A.; CSEH, S.; RÁTKY, J. Seasonal changes of scrotal circumference, blood plasma testosterone concentration and sêmen characteristics in Racka rams. **Small Ruminant Research**, v.111, p.90-95, 2013.

SILVA, M. F. C. da. **Caracterização do leite e do queijo de ovelhas da raça bergamácia suplementadas com óleo ou farelo de linhaça (*Linum usitatissimum* L.)**. 2014, 71 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu, São Paulo, 2014.

SILVA, S. V.; SOARES, A. T.; BATISTA, A. M.; ALMEIDA, F. C.; GUERRA, M. M. P. Interferência da condição climática na integridade de espermatozoides ovinos

submetidos à criopreservação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.6, p.1309-1314, 2011.

SILVEIRA, J. **Avaliação de touros no sistema de monta natural**. [S.l.:s.n.], 2008. Disponível em:
<<http://rehagro.com.br/plus/modulos/noticias/ler.php?cdnoticia=1804>>. Acesso em:
14 jan. 2018 às 15:00 horas.

SINGH, B. K.; ANDREI, E. **Compêndio de andrologia e inseminação artificial em animais de fazenda**. São Paulo: Andrei, 2006. 331 p.

SIQUEIRA, J. B.; GUIMARÃES, J. D.; COSTA, E. P. da; HENRY, M.; TORRES, C. A. A.; SILVA, M. V. G. B. da; SILVA SILVEIRA, T. da. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.2, p.387-395, 2007.

SOARES, A. T.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v.3, p.53-63, 2009.

SOUSA, F. M. L. **Estudo das características do aparelho reprodutivo, epitélio seminífero e mapas eletroforéticos bidimensionais do plasma seminal de carneiros morada nova**. 2010. 92 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

SRINIVASAN, V.; SPENCE, W. D.; PANDI-PERUMAL, S. R.; ZAKHARIA, R.; BHATNAGAR, K. P.; BRZEZINSKI, A. Melatonin and human reproduction: Shedding light on the darkness hormone. **Gynecological Endocrinology**, v.25, n.12, p.779–785, dez. 2009.

THIÉRY, J. C.; CHEMINEAU, P.; HERNANDEZ, X.; MIGAUD, M.; MALPAUX, B. Neuroendocrine interactions and seasonality. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.87-100, 2002.

TSAKMAKIDIS, I. A. Ram sêmen evaluation: Development and efficiency of modern techniques. **Small Ruminant Research**, v.92, p.126-130, 2010.

TULI, R. K.; HOLTZ, W. Effect of season on the freezability of Boer goat semen the northern temperate zone. **Theriogenology**, v.43, n.8, p.1359-1363, 1995.

TUTIDA, L.; BARBOSA, O. R.; MARTINS, E. N.; MACEDO, A. F. de; ROCHA ROMAN, M. J. da; SIMONELLI, S. M. Influência das estações do ano nas características seminais de carneiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.28, n.5, p.1141-1147, 1999.

VALENTIM, R. C.; CORREIA, T. M.; AZEVEDO, J. M. T. de. Utilização de implantes de melatonina em ovinos. **Alb'eitar**, v.2, n.6, nov-dez. 2006.

VIEIRA, R. J.; CARDOSO, F. T. S.; AZEVEDO, L. M.; CUNHA, L. A. L.; SALVIANO, M. B. Influência da morfologia escrotal e da época do ano na qualidade de sêmen de

caprinos criados no Piauí. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.3, n.4, p.376-380, 2008.

WROBEL, K. H.; REICHOLD, J.; SCHIMMEL, M. Quantitative morphology of the ovine seminiferous epithelium. **Annals of Anatomy**, v.177, p.1-14, 1995.

YARNEY, T. A.; SANFORD, L. M.; PALMER, W. M. Pubertal development of ram lambs: body weight and testicular size measurements as indices of post-pubertal reproductive function. **Canadian Journal of Animal Science**, v.70, p.139, 1990.

ZIEBA, D. A.; KIRSZ, K.; MOLIK, E.; ROMANOWICZ, K.; WOJTOWICZ, A. K. Effects of orexigenic peptides and leptin on melatonin secretion during different photoperiods in seasonal breeding ewes: An in vitro study. **Domestic Animal Endocrinology**, v.40, p.139–146, 2011.

Anexo 1- Características reprodutivas de carneiros de raças leiteiras avaliadas durante 12 meses

Mês	PE (cm)	Consistência	Vol (mL)	Turbilhão	Motilidade	Vigor	Concentração x10 ⁹ /mL	TTR h1 mot.	TTR h1 vig.	TTR h2 mot.	TTR h2 vig.	TTR h3 mot.	TTR h3 vig.	Defeitos maiores (%)	Defeitos menores (%)
Setembro	31,1 ± 1,8 ^{ab}	0,5 ± 0,5 ^c	1,3 ± 0,7 ^{ab}	4,2 ± 0,5 ^{abc}	84,2 ± 3,4 ^{abcd}	3,7 ± 0,5 ^{ab}	2,9 ± 1,0x10 ⁹ ^c	80,4 ± 4,3 ^{ab}	3,0 ± 0,1 ^c	68,5 ± 9,7 ^{abc}	3,0 ± 0,1 ^{bc}	62,3 ± 9,3 ^{abc}	2,7 ± 0,3 ^{abcd}	1,2 ± 0,5 ^a	1,5 ± 0,8 ^{cde}
Outubro	32,3 ± 2,3 ^a	0,5 ± 0,5 ^c	1,2 ± 0,4 ^{ab}	4,2 ± 0,5 ^{bc}	88,8 ± 2,2 ^a	3,9 ± 0,3 ^{ab}	2,9 ± 0,6x10 ⁹ ^{abc}	82,4 ± 4,8 ^{ab}	3,8 ± 0,4 ^{ab}	76,9 ± 5,2 ^a	3,5 ± 0,4 ^a	72,3 ± 7,8 ^a	3,1 ± 0,4 ^a	0,4 ± 0,4 ^b	2,8 ± 1,3 ^{abcd}
Novembro	31,1 ± 2,5 ^{ab}	0,8 ± 0,5 ^{bc}	0,8 ± 0,3 ^{bcd}	4,5 ± 0,5 ^a	88,5 ± 3,2 ^a	4,3 ± 0,4 ^a	3,0 ± 0,8x10 ⁹ ^{abc}	83,4 ± 5,9 ^f	3,9 ± 0,2 ^{ab}	78,1 ± 5,6 ^f	3,3 ± 0,4 ^{ab}	66,5 ± 7,7 ^{abc}	3,0 ± 0,2 ^{ab}	0,8 ± 0,5 ^{ab}	3,0 ± 1,2 ^{abcd}
Dezembro	31,3 ± 1,8 ^{ab}	0,6 ± 0,7 ^c	1,2 ± 0,5 ^{ab}	4,1 ± 0,5 ^{abc}	86,9 ± 3,6 ^{abc}	4,1 ± 0,4 ^{ab}	2,8 ± 0,7x10 ⁹ ^{bc}	86,5 ± 4,3 ^a	4,1 ± 0,6 ^a	77,3 ± 5,6 ^f	3,3 ± 0,5 ^{ab}	68,1 ± 6,0 ^{ab}	2,8 ± 0,4 ^{abc}	0,4 ± 0,6 ^b	4,2 ± 2 ^a
Janeiro	31,6 ± 2,0 ^{ab}	0,5 ± 0,5 ^c	1,1 ± 0,4 ^{ab}	4,5 ± 0,5 ^a	88,1 ± 3,3 ^{ab}	4,1 ± 0,3 ^{ab}	3,3 ± 0,6x10 ⁹ ^{abc}	86,2 ± 3,0 ^d	3,7 ± 0,7 ^{ab}	73,5 ± 7,5 ^{ab}	3,1 ± 0,3 ^{abc}	60,4 ± 12,7 ^{abc}	2,5 ± 0,6 ^{abcd}	1,2 ± 0,8 ^a	2,8 ± 1,4 ^{abcd}
Fevereiro	31,8 ± 2,4 ^{ab}	1,7 ± 0,6 ^a	1,2 ± 0,3 ^{ab}	4,3 ± 0,6 ^{ab}	86,5 ± 2,4 ^{abc}	3,9 ± 0,8 ^{ab}	3,4 ± 0,9x10 ⁹ ^{abc}	81,2 ± 6,2 ^{ab}	3,4 ± 0,4 ^{bc}	70,0 ± 10,6 ^{ab}	3,1 ± 0,5 ^{abc}	55,4 ± 14,2 ^{cde}	2,5 ± 0,7 ^{bcd}	0,3 ± 0,3 ^b	3,1 ± 1,5 ^{ab}
Março	31,7 ± 1,9 ^{ab}	1,5 ± 0,7 ^{ab}	0,4 ± 0,2 ^d	3,6 ± 0,5 ^c	84,6 ± 4,3 ^{abc}	3,5 ± 0,5 ^b	2,2 ± 0,6x10 ⁹ ^c	82,3 ± 5,3 ^{ab}	3,3 ± 0,5 ^{bc}	71,5 ± 8,3 ^{ab}	2,9 ± 0,3 ^{bcd}	62,7 ± 9,3 ^{abc}	2,5 ± 0,4 ^{bcd}	0,4 ± 0,5 ^b	1,6 ± 0,9 ^{bcd}
Abril	31,4 ± 1,9 ^{ab}	1,5 ± 0,7 ^{ab}	1,4 ± 0,4 ^a	4,3 ± 0,4 ^{ab}	83,8 ± 4,2 ^{abcd}	4,3 ± 0,4 ^a	3,7 ± 1,3x10 ⁹ ^{ab}	80,4 ± 3,8 ^{ab}	4,0 ± 0,5 ^{ab}	73,1 ± 3,8 ^{ab}	3,1 ± 0,5 ^{abc}	58,8 ± 7,1 ^{bcd}	2,5 ± 0,5 ^{abcd}	0,5 ± 0,7 ^{ab}	2,0 ± 0,9 ^{bcd}
Mai	29,8 ± 1,8 ^b	1,7 ± 0,5 ^a	1,1 ± 0,4 ^{ab}	3,7 ± 0,6 ^{bc}	82,3 ± 6,3 ^{cd}	3,7 ± 0,5 ^{ab}	4,1 ± 0,9x10 ⁹ ^a	80,8 ± 6,1 ^{ab}	3,7 ± 0,4 ^{ab}	70,0 ± 7,1 ^{ab}	2,8 ± 0,4 ^{bcd}	56,2 ± 10,4 ^{bcd}	2,3 ± 0,5 ^{cd}	0,2 ± 0,3 ^b	1,4 ± 0,8 ^{de}
Junho	29,3 ± 2,2 ^b	1,8 ± 0,4 ^a	1,5 ± 0,3 ^a	4,2 ± 0,5 ^{abc}	82,7 ± 6,0 ^{bcd}	4,0 ± 0,6 ^{ab}	3,1 ± 0,6x10 ⁹ ^{abc}	76,2 ± 4,6 ^{bc}	3,5 ± 0,6 ^{abc}	66,2 ± 6,2 ^{bc}	2,9 ± 0,4 ^{bcd}	54,2 ± 4,9 ^{cde}	2,4 ± 0,4 ^{bcd}	0,6 ± 0,8 ^{ab}	1,1 ± 1,0 ^e
Julho	29,6 ± 2,1 ^b	1,7 ± 0,6 ^a	0,5 ± 0,3 ^{cd}	3,7 ± 0,5 ^c	78,8 ± 5,8 ^d	3,8 ± 0,5 ^{ab}	3,0 ± 1,2x10 ⁹ ^{abc}	71,5 ± 8,5 ^c	3,5 ± 0,6 ^{abc}	60,0 ± 9,1 ^c	2,7 ± 0,5 ^{cd}	46,9 ± 9,5 ^{de}	2,2 ± 0,6 ^d	0,2 ± 0,3 ^b	1,8 ± 1,1 ^{bcd}
Agosto	30,6 ± 1,5 ^{ab}	1,8 ± 0,4 ^a	1,0 ± 0,4 ^{abc}	4,2 ± 0,6 ^{abc}	85,4 ± 5,2 ^{abc}	4,2 ± 0,4 ^a	3,7 ± 1,0x10 ⁹ ^{ab}	80,8 ± 2,8 ^{ab}	3,4 ± 0,5 ^{bc}	63,8 ± 9,6 ^{bc}	2,4 ± 0,5 ^d	46,2 ± 10,4 ^e	2,1 ± 0,3 ^d	0,5 ± 0,7 ^{ab}	0,7 ± 0,6 ^e

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre os meses, p<0,05.

Consistência (0-4); Turbilhão (0-5); Motilidade (%); Vigor (1-5); TTR motilidade (%); TTR vigor (1-5);

Abreviauras: TTR, Teste de termorresistência; mot, motilidade; vig, vigor.