

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS DOM PEDRITO
CURSO DE BACHARELADO EM ZOOTECNIA**

VIVIANE FLORES PENTEADO

**AVALIAÇÃO DE SÊMEN OVINO TEXEL CRIOPRESERVADO EM TRIS GEMA
DE OVO SOBRE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MELATONINA
MANIPULADA – RESULTADOS PRELIMINARES**

**Dom Pedrito
2017**

VIVIANE FLORES PENTEADO

**AVALIAÇÃO DE SÊMEN OVINO TEXEL CRIOPRESERVADO EM TRIS GEMA
DE OVO SOBRE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MELATONINA
MANIPULADA- RESULTADOS PRELIMINARES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Zootecnia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharela em Zootecnia.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Pires Neves

**Dom Pedrito
2017**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo (a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

P858a Penteadó, Viviane Flores

AVALIAÇÃO DE SÊMEN OVINO TEXEL CRIOPRESERVADO EM TRIS
GEMA DE OVO SOBRE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
MELATONINA MANIPULADA- RESULTADOS PRELIMINARES

49 p.

Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade
Federal do Pampa, ZOOTECNIA, 2017.

"Orientação: Adriana Pires Neves".

1. Reprodução. 2. Ovinos. 3. Texel. 4. Criopreservação. 5. Sêmen. I. Título.

VIVIANE FLORES PENTEADO

**AVALIAÇÃO DE SÊMEN OVINO TEXEL CRIOPRESERVADO EM TRIS GEMA
DE OVO SOBRE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MELATONINA
MANIPULADA- RESULTADOS PRELIMINARES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Bacharelado em Zootecnia da
Universidade Federal do Pampa, como
requisito parcial para obtenção do Título de
Bacharela em Zootecnia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 30/06/2017.

Banca examinadora:

Méd. Vet. Prof.^a Dr.^a Adriana Pires Neves
Orientadora
UNIPAMPA

Méd. Vet. Dra. Gladis Ferreira Corrêa
UNIPAMPA

Eng. Dr. Sérgio Ivan dos Santos
UNIPAMPA

Dedico este trabalho à minha família, que é a base de todo o meu ser,
em especial ao meu filho, Felipe Penteadó Toniolo.

AGRADECIMENTO

Agradeço aos meus pais Celeste Aldenir (O Vecchio) e a Loreci (Dona Lori), por me apoiar incondicionalmente nesta jornada acadêmica que foi longa, mas chegou ao fim.

Às minhas irmãs, Fabi e Cris, pelo apoio financeiro, moral e psicológico. E que não mediram esforços juntamente a toda a nossa família em cuidar do Felipinho quando eu me fiz ausente.

Ao meu Primo Willian, que mesmo de longe me ajudou, e me entendeu nos momentos difíceis.

Ao meu cunhado Edinei que muito me ajuda em tudo que pode, meu parceiro, amigo e grande incentivador. Obrigada por me ouvir e me entender nos momentos mais difíceis que passei.

Ao Mateus, pai do meu filho, obrigada pelo incentivo.

Ao Davi, meu sobrinho, meu coração, obrigada pelo teu sorriso, teus beijos, teu amor incondicional e verdadeiro. Tia Bi te ama muito meu coraçãozinho.

Ao meu filho Felipe peço que me desculpe a ausência, com certeza foi por um bom motivo. Te agradeço por existir em minha vida, tu és a razão de tudo! A espera foi grande e a recompensa será maior ainda, eu te prometo. Te amo.

À minha orientadora Adriana, que me ajudou desde o primeiro ano de faculdade e nunca desistiu de mim, e que me apoiou nas horas boas e ruins! E principalmente pelos nossos churrascos, de onde viriam a surgir grandes ideias e oportunidades.

Ao Professor Serginho, o homem da estatística, parceiro de viagens, churrascos e das conversas filosóficas da vida!

Ao Cristiano Feltrin, obrigada por abrir as portas da tua casa e me ajudar no experimento e acreditar que esta loucura seria possível.

Ao Gabriel Vodzik, que me ajudou incansavelmente na pesquisa e realização deste experimento! Sem ele nada seria possível.

À Paola minha Zootecnista favorita, ruiva do meu coração que me ajudou nos momentos mais difíceis que surgiram no decorrer deste trabalho, e durante a graduação toda, obrigada pelas pasteladas, massas com queijo e pela pomba gira citrus! Agradeço pela amizade improvável, incansável, insubstituível e inabalável que nos une!

Às minhas colegas de graduação Sílvia, Joana, Gabriella, Ana Cecília e Mônica...pelas risadas, pelo choro e principalmente por me aguentarem nestes dias tão difíceis, cumplicidade que vou levar para a vida toda! Nem sempre o que nos aproxima são as coisas em comum, muitas vezes é a diferença que une as pessoas!

Aos meus vizinhos, Dona Maria, Sr. Ricardo, Dona Marta e a Família Rosa obrigada pelas palavras ditas nos momentos certos, pelo prato de bolo alcançado enquanto eu estudava, pelos

mates, conversas e risadas, fazendo diminuir a saudade de casa. Famílias que me acolheram aqui em Dom Pedrito fazendo minha morada.

A UNIPAMPA, por me oferecer condições de estudo e oportunidade de graduação.

Agradeço a Deus pelas oportunidades recebidas e pelo conhecimento adquirido ao longo de toda esta jornada.

“Inspiração vem dos outros! Motivação vem de dentro de nós!”

Autor Desconhecido

RESUMO

A inseminação artificial com uso do sêmen criopreservado é uma ferramenta valiosa em programas de melhoramento genético e conservação de raças ovinas. Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da adição da melatonina manipulada em diferentes concentrações, no sêmen de carneiros da raça Texel diluído em TRIS- Gema de Ovo, analisando após a criopreservação, se houve mudança nas características qualitativas do sêmen. Foram coletados dois ejaculados de quatro carneiros com idade de 8 meses a 2 anos, por meio de vagina artificial adaptada para ovinos. Posteriormente, os ejaculados coletados foram divididos em três alíquotas iguais e diluídas uma em Tris-Gema de Ovo, e as demais em solução TRIS-Gema de Ovo adicionado de melatonina manipulada 2 mMol e 4 mMol, para a concentração final de 100×10^6 espermatozoides/mL, após mantidos em banho maria a 34°C. Então, as amostras foram resfriadas em câmara fria a 5°C por uma hora, envasadas em palhetas de 0,25 mL e lacradas com álcool polivinílico. Logo após, foram acondicionadas sob vapores do nitrogênio líquido, por 10 minutos, a 8 cm da lâmina líquida e após congeladas com nitrogênio líquido -196°C. Após 40 dias de criopreservação as amostras foram analisadas no programa de software CASA® quanto à motilidade espermática e integridade da membrana pelo teste hiposmótico, após o descongelamento. As amostras controle e dos tratamentos 1 e 2 obtiveram uma grande variabilidade entre valores explanados no presente trabalho. Demonstrando que os resultados preliminares obtidos com este experimento são satisfatórios.

Palavras-Chave: Carneiro. Reprodução. Congelação.

ABSTRACT

Artificial insemination with cryopreserved semen is a valuable tool to genetic improvement programs and ovine breed conservation. The aim of this work was to evaluate the effect of adding pharmacy melatonin in different concentrations, to semen of Texel rams, previously diluted in TRIS-Egg yolk, analysing semen parameters after cryopreservation. Two ejaculates of four rams, aged from 8 months-2 year, with aid of an artificial vagina. These ejaculates were split into three aliquots, and so diluted: one in Tris-egg yolk, and the others in TRIS-egg yolk with melatonin at 2mMol and 4 mMol, to a final concentration of 100×10^6 sperm/mL. Samples were kept on a waterbath at 34°C. Then they were cooled at 5°C for one hour, filled into 0,25 mL straws. After closing with polyvinyl alcohol, straws were kept for 10 minutes over liquid nitrogen at 8cm from the liquid, and then frozen with liquid nitrogen at -196°C. Samples were thawed at least one week after freezing, and analysed with computerized microscopy through the CASA® system, for: sperm motility, velocity; with HOST test membrane integrity was verified. There was no difference between control and treatments 1 and 2. Demonstrating that the preliminary results obtained with this experiment are satisfactory.

.

Keywords: Ram. Reproduction. Freezing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – TESTE HIPOSMÓTICO	25
------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - As características do sêmen de caprinos e ovinos.....	21
Tabela 2 - Determinação da motilidade massal.....	22
Tabela 3 -Concentração do sêmen de carneiro e bode de acordo com a consistência do sêmen.	23
Tabela 4 - Principais causas e consequências das injúrias antes, durante e após a criopreservação nas células espermáticas.	31
Tabela 5 – Avaliação macroscópica dos carneiros utilizados	38
Tabela 6 - Avaliação macroscópica dos carneiros utilizados	38
Tabela 7 – Análise do CASA Amostras Controle	39
Tabela 8 – Análise do CASA tratamento 1 2 μ mOL.....	40
Tabela 9 - Análise do CASA tratamento 2 4 μ mOL	40
Tabela 10 - Resultado do hiposmótico	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Percentagem

μ L - Microlitros

CASA - *Computer assisted sperm analysis*

EROS - Espécies reativas de oxigênio (do inglês reactive oxygen species)

FIV - Fertilização in vitro

GL – Glicerol

GPx - glutationa peroxidase

HOST - Teste hipoosmótico (do inglês hypoosmotic swelling test)

IA - Inseminação artificial

MI - Mobilidade individual

ml - Mililitros

m Mol - Milimolar

MM - Mobilidade Massal

MEL - Melatonina Manipulada

PIV - Produção in vitro

SF - sêmen fresco

Spz - Espermatozoide

TRIS - tris (hidroximetil) aminometano

TE - Transferência de Embriões

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Objetivo geral	17
1.1.2	Objetivos específicos	18
1.2	Justificativa	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	Panorama da ovinocultura	19
2.2	Raças ovinas- TEXEL	19
2.3	Sêmen ovino e suas características	20
2.4	Avaliação do sêmen	21
2.4.1	Motilidade do espermatozoide	22
2.4.2	Motilidade massal ou turbilhonamento	22
2.5	Avaliação da concentração com base na consistência do sêmen	23
2.6	Provas de integridade da membrana	23
2.7	Teste hiposmótico (HOST)	24
2.8	Análise seminal computadorizada (<i>computer-assisted semen analysis</i> – CASA) 25	
2.9	Inseminação artificial	26
2.10	Criopreservação sêmen	27
2.10.1	Crioprotetores	29
2.10.2	Antioxidantes o uso na criopreservação	31
2.10.3	Melatonina	32
3	METODOLOGIA	35
3.1	Local do experimento	35
3.1.1	Coletas e análises pré criopreservação do sêmen	35
3.1.2	Análises pós-criopreservação do sêmen	35
3.2	Coleta do sêmen	35
3.2.1	Avaliação inicial do sêmen	36
3.2.2	Diluição do sêmen	36
3.2.3	Congelamento do sêmen	36
3.2.4	Descongelamento do sêmen	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	44

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
---	-----------

1 INTRODUÇÃO

Os ovinos estão distribuídos por todos os continentes do planeta, apresentando uma taxa de crescimento anual de 1,5% nos últimos 5 anos. De acordo com dados da FAO 2015, o rebanho mundial era da ordem de 1,2 bilhão de animais, apresentando um leve crescimento no ano de 2016. Dentre os países com maiores rebanhos destacam-se China, Austrália, Índia, Irã e Nigéria, respectivamente com 17,00%, 6,00%, 5,00%, 4,00% e 3,40% da participação mundial. O Brasil concentra o 18º maior rebanho de ovinos (CONAB, 2016).

Na América do Sul, a população de ovinos é cerca de 87 milhões de cabeças, sendo cerca de 55 milhões nos países do MERCOSUL, quantidade que equivale a 64% e 5% da população ovina da América do Sul e mundial, respectivamente (MUELLER, 1998). O efetivo de ovinos foi de 18,41 milhões em 2015, uma variação de 4,5% sobre 2014, de acordo com a Pesquisa da Pecuária Municipal (PPM) 2015, divulgada pelo IBGE em setembro de 2016. A região Nordeste concentrou 60,5% do rebanho nacional em 2015. A região Sul apareceu em seguida, representando 26,5% do efetivo da espécie, seguida pelas regiões Centro-Oeste (5,6%), Sudeste (3,8%) e Norte (3,6%). Bahia (17,2%), Pernambuco (13,1%) e Ceará (12,5%) são os estados em destaque na criação de ovinos do Nordeste do Brasil, porém o Rio Grande do Sul é o estado com o maior número de animais, representando 21,5% do total nacional. Santana do Livramento (RS), Casa Nova (BA) e Alegrete (RS) foram os municípios com os maiores efetivos de ovinos em 2015, mantendo a colocação do ano anterior (IBGE, 2016).

Atualmente, ovinos são explorados em variados sistemas de produção. Independente do sistema, a eficiência reprodutiva é um dos principais aferidores de eficiência produtiva e do sucesso da atividade como um todo. Para cada sistema, uma ou mais técnicas de reprodução podem ou devem ser aplicadas. A escolha deve ser cautelosa e levada a risca a partir de um detalhado diagnóstico e estudo das relações entre animais, bioma, instalações e manejo em geral onde a atividade é desenvolvida (FONSECA, 2011).

Além do acompanhamento do rebanho, algumas biotecnologias têm sido desenvolvidas objetivando o aumento dos índices produtivos e reprodutivos da espécie ovina, e consequentemente a sua rentabilidade. Dentre estas pode-se citar a Criopreservação de Sêmen, a Inseminação Artificial (IA), a Produção *in vitro* (PIV) e a Transferência de Embriões (TE). (COX; ALFARO, 2007; SIMPLICIO *et al.*, 2007).

O sucesso da criopreservação é parcial, uma vez que o processo de congelamento/descongelamento danifica cerca de 50% das células. Isso ocorre porque os espermatozoides ovinos apresentam alta sensibilidade ao estresse oxidativo em função

das espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas durante o processo de criopreservação, devido à baixa quantidade de antioxidantes e à alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados na membrana plasmática (BUCAK *et al.* 2007). Os ácidos graxos são essenciais para a manutenção funcional das células espermáticas Henkel (2005), mas as altas taxas de EROs podem afetar as funções mitocondriais e, conseqüentemente a motilidade espermática (DU, 2009).

A adição ao sêmen, de antioxidante, seja ele lipossolúvel ou hidrossolúvel, aumenta a tolerância espermática ao dano oxidativo, após descongelação. Além disso, os antioxidantes ainda possuem a capacidade de neutralizar os radicais livres que causam a peroxidação lipídica da membrana plasmática dos espermatozóides (BAUMBER *et al.*, 2000). Sabe-se que os espermatozóides e o plasma seminal possuem enzimas e antioxidantes responsáveis pela remoção de quelante dos radicais livres. No entanto, isto não é suficiente para a proteção celular (SMITH *et al.*, 1996).

A melatonina é um antioxidante terminal, não enzimático e não pró-oxidativo Tan *et al.* (2002), que possui a capacidade de detoxificação de radicais livres em concentrações fisiológicas e farmacológicas, sendo utilizada para prevenir as EROs (REITER *et al.*, 2007). A eficiência da função antioxidante da melatonina pode ser devido a sua capacidade quelante de radicais livres, ao estímulo sobre enzimas antioxidantes, à função da glutatona, que reduz a perda de elétrons de cadeia de transporte mitocondrial, e, finalmente, à ação sinérgica a outros antioxidantes (REITER *et al.*, 2007).

Maia *et al.* (2009) descreve que a adição de antioxidantes no meio de congelação protege os espermatozoides contra os danos causados pelos radicais livres, mas há poucos estudos que relatam o uso de melatonina no sêmen ovino. Este trabalho teve por objetivo analisar o efeito da adição de melatonina manipulada no sêmen diluído de carneiros da raça Texel submetidos à criopreservação.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a viabilidade dos espermatozóides de ovinos da raça Texel, submetidos à criopreservação com adição de melatonina manipulada no TRIS Gema de Ovo.

1.1.2 Objetivos específicos

Determinar se com o uso do diluente Tris-Gema de Ovo, acrescido de Melatonina manipulada, acrescenta uma melhora na motilidade e vigor dos espermatozoides ovinos após a criopreservação.

1.2 Justificativa

Apesar dos avanços observados nos últimos anos, a taxa de prenhez após inseminação cervical com sêmen criopreservado tem apresentado resultados insatisfatórios em ovinos. Devido às alterações físicas e osmóticas inerentes a criopreservação, este estudo visa avaliar a adição de antioxidante ao meio diluente com o objetivo final de manter a viabilidade maior do sêmen após o descongelamento, para o uso em inseminação artificial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Panorama da ovinocultura

Viana (2008) relata que uma das primeiras espécies de animais domesticadas pelo homem foram os ovinos, serviam como alimento, carne e leite, proteção pelo uso da lã, e abrigo com o uso da fibra contra intempéries do ambiente.

A ovinocultura está presente em praticamente todos os continentes, a ampla difusão da espécie se deve principalmente a seu poder de adaptação a diferentes climas, relevos e vegetações. A criação ovina está destinada tanto à exploração econômica como à subsistência das famílias de zonas rurais (VIANA, 2008).

A expansão da atividade de ovinocultura nos últimos anos se deve a diferentes fatos: mercado, manejo, melhoramento genético dentre outros. Apesar de o consumo permanecer tímido, consumo capita/ano de carne ovina no Brasil é de cerca de 0,7 Kg/ 1,0 kg, em 2013 o Brasil importou 7 mil toneladas de carne uruguaia para abastecer o mercado interno (SEBRAE, 2013). Mesmo com um rebanho de 17,5 milhões de cabeças - segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística IBGE (2013) – há demanda de carne suficiente para que o mercado brasileiro dependa de importações de diferentes países.

Programas de melhoramento genético de ovinos na América do Sul têm sido implementado principalmente no Brasil, Uruguai e Argentina. E o uso de Biotecnias Aplicadas a Reprodução tem contribuído muito para o sucesso do mesmo. Esta expansão do melhoramento de ovino no Brasil se deve, principalmente, à necessidade de aumento da produção de carne ovina no país Rezende & Perez, 2002.

O grande desafio da ovinocultura está em elevar o consumo do produto, principalmente em grandes centros, o que acarretará na maior demanda por carne no mercado. Qualquer incremento de consumo beneficiará os países produtores de carne de qualidade, inclusive o Brasil.

2.2 Raças Ovinas- TEXEL

Raça é caracterizada pela semelhança transmitida por hereditariedade entre indivíduos. Os caracteres desejados são morfológicos, fisiológicos e econômicos. O Brasil possui 26 raças de registro genealógico, cruzamentos e variedades adaptadas aos diferentes ecossistemas brasileiros. (VAZ, 2007). Dentre as quais possuem aptidões leiteiras, carniceras, laneiras,

mistas ou de dupla aptidão. As principais raças em criação, com bom nível de adaptação, no Brasil, são as produtoras de lã fina Merino Australiano e Ideal; animais de dupla aptidão, como *Corriedale*, *Romney Marsh* e *Border Leicester*; e as produtoras de carne *Suffolk*, *Hampshire Down*, *Ile de France*, *Texel*, *Poll Dorset*, Santa Inês, Morada Nova e leiteiras, encontramos a *Bergamácia*, *Lacaune* e *Milchschaf*.

A raça *Texel*, conhecida por ter tripla finalidade: Prolificidade com excelente produção de carne em regime de pasto e velocidade de crescimento das crias; Produção de lã, entre 3,5 e 4 kg/ano; Produção média de leite entre 155 e 207L por lactação (VAZ, 2007).

A raça *Texel* tem sua origem na ilha do mesmo nome, localizada ao norte da Holanda. Inicialmente, foram feitos cruzamentos da ovelha dos "polder" holandês com várias raças inglesas como a *Leicester*, *Wensleydale* e o *Lincoln*. Posteriormente, alguns criadores insatisfeitos com a cruza daí proveniente passaram a criar seus próprios ovinos, resultando um animal grande, precoce e com lã de boa qualidade. Após diversas gerações de eficiente seleção, o *Texel* surge hoje, como uma raça de ovino tipo carne, de excelente qualidade e baixo teor de gordura. No Brasil, a raça foi introduzida em 1972, pelos criadores Halley Marques e Ligia Vargas Souto que importaram da Holanda 18 fêmeas e 2 machos para suas fazendas, no município de Itaqui/RS (ARCO, 2017).

O *Texel* possui tamanho médio, com tendências para grande. Sua massa muscular é forte, de formato arredondado, evidenciando todo o seu vigor e vivacidade. Devido a sua aptidão para a produção de carne magra, macia e suculenta; lã de boa qualidade; precocidade sexual de ganho de peso; alta fertilidade; rusticidade e carcaça melhorada, essa raça é usada em diversos cruzamentos de rebanhos, no intuito de produzir maior quantidade e qualidade de carne nobre. Trata-se da raça mais reprodutiva do mundo, já que a curto prazo os ovinos *Texel* podem se multiplicar em rítmico genético e gemelaridade de 90%, índice jamais alcançado por qualquer outra raça de ovinos (SANTOS, 2002).

2.3 Sêmen ovino e suas características

Segundo Maia (2010) o sêmen é constituído pelo plasma seminal e pelos espermatozóides, e sua composição varia entre as espécies. O plasma seminal é a mistura de fluídos produzidos nos testículos, epidídimos, canal deferente e pelas glândulas sexuais, principalmente pela vesícula seminal. É um fluido isotônico e neutro, rico em numerosas substâncias, entre elas: frutose, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido glutâmico, inositol, sódio,

potássio, cálcio, fosfolipídios, prostaglandinas, proteínas e serve para proteger e nutrir o espermatozóide.

O volume e a concentração de espermatozóides no ejaculado variam com a anatomia (tamanho do testículo) e a atividade reprodutiva ou frequência de coletas. Além das variações individuais, fatores como idade, condições climáticas, nutrição, uso de medicamentos e frequência de ejaculação podem afetar a quantidade e qualidade do sêmen. No ovino, o volume é relativamente baixo e a concentração é alta. Durante a cópula, a ejaculação é espontânea, dura somente alguns segundos e o sêmen é depositado na porção anterior da vagina.

Tabela 1 - As características do sêmen de caprinos e ovinos.

Característica seminal	Carneiro	Bode
Volume (mL)	0,8 – 2,5 (1,0)	0,5 – 1,5 (0,8)
Cor	Pérola ou marfim	Amarela
Aspecto	Leitoso a cremoso	Leitoso a cremoso
Total espermatozoide/ ejaculado (bilhões)	2 a 9 (3)	1 a 7,5 (2)
pH	5,9 a 7,3	6 a 7
Motilidade (%)	75	80
Vigor (0 a 5)	3	3
Espermatozoides normais (%)	80 a 85	80 a 90
Viáveis (pós-vital)	80	80

Fonte: Maia, 2010.

2.4 Avaliação do sêmen

Segundo Hafez (1995) não existe prova específica que seja concludente da fertilidade dos ejaculados individuais, mas a combinação de avaliação bioquímica e espermograma constitui a melhor opção disponível para determinar a capacidade fecundante do macho. Os testes utilizados na rotina de análise do sêmen consistem, basicamente, na avaliação da concentração, morfologia e motilidade espermática recomendado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

A avaliação da integridade funcional da membrana plasmática do espermatozóide, através do teste Hiposmótico, é considerada como um indicador de fertilidade por ser um requisito básico para a fertilização (MELO, 1999).

2.4.1 Motilidade do espermatozóide

A avaliação da motilidade é feita de duas maneiras: a motilidade massal ou turbilhonamento e a porcentagem de espermatozoides progressivamente móveis. A avaliação de motilidade massal só é realizada no sêmen fresco. Quando o sêmen é diluído ou descongelado, faz-se apenas a avaliação da porcentagem de espermatozoides móveis e o vigor do movimento. Uma amostra deverá apresentar no mínimo 60% de motilidade para ser utilizada imediatamente ou criopreservada (GONÇALVES *et al.*, 2008).

2.5.2 Motilidade massal ou turbilhonamento

É o tipo de movimento resultante da interação entre o movimento individual e a concentração espermática; os espermatozoides se deslocam com movimentos vigorosos formando ondas. Pessoas com visão acurada podem observar o movimento das ondas através do tubo de coleta, mas uma avaliação precisa só pode ser realizada com o uso de microscópio.

Uma gota de sêmen puro é colocada sobre uma lamina de vidro limpa e aquecida (37°C), e examinada sob microscópio óptico no aumento de 100x (objetiva de 10). A temperatura da lâmina deve ser mantida durante a avaliação usando-se uma platina aquecedora no microscópio (MAIA, 2010).

A determinação do valor da motilidade é feita usando notas numa escala de 0 (ausência de movimentos) a 5 (máximo movimento de onda) como descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - Determinação da motilidade massal

Nota	Descrição do movimento das ondas
0	Totalmente sem movimento.
1	Apenas movimento individual de poucos espermatozoides. \pm 10% de espermatozoides vivos.
2	Observam-se os movimentos espermáticos, mas não forma ondas. 20-40% de espermatozoides ativos.
3	Ondas de baixa amplitude e movimento lento. 45-65% de espermatozoides ativos.
4	Ondas rápidas e vigorosas, não forma redemoinho. 70 a 85% de espermatozoides ativos.
5	Ondas muito rápidas e densas que se juntam formando um redemoinho (difícil determinar ondas isoladas). 90% ou mais de espermatozoides vivos.

Fonte: Evans e Maxwell, (1987); Chemineau *et al.* (1991).

2.5 Avaliação da concentração com base na consistência do sêmen

Segundo Maia (2010) a consistência do sêmen depende da proporção entre espermatozoides e plasma seminal. O sêmen de consistência espessa contém mais espermatozoides que aquele fino ou aquoso. Assim, a avaliação da consistência do sêmen é uma maneira simples e rápida de estimar a concentração espermática. Na Tabela 3 são apresentados os valores de concentração do sêmen de bodes e carneiros de acordo com a sua consistência. Para elaboração da tabela, o número de espermatozoides foi determinado usando câmara de Neubauer. Sêmen opaco e aquoso não deve ser usado em inseminação artificial.

Tabela 3 -Concentração do sêmen de carneiro e bode de acordo com a consistência do sêmen.

Consistência	Número de espermatozoides ($\times 10^9/\text{ml}$)	
	Média	Variação
Cre moso espesso	5,0	4,5-6,0
Cre moso	4,0	3,5-4,5
Cre moso fino	3,0	2,5-3,5
Leitoso	2,0	1,0-2,5
Opaco	0,7	0,3-1,0
Aquoso	insignificante	

Fonte: Evans e Maxwell (1987).

2.6 Provas de integridade da membrana

A integridade da membrana plasmática do espermatozóide é um fator importante no estudo da qualidade seminal em razão da inabilidade dos espermatozoides de restaurá-la. A membrana interfere tanto no metabolismo celular como na capacitação do espermatozóide, na união do espermatozóide com o óvulo, (DE LEEUW *et al.*, 1991).

A porcentagem de espermatozoides que possuem acrossoma intacto e são capazes de sofrer reação acrossômica é considerada como uma característica seminal importante, (WOELDERS, 1990).

A congelação e a descongelação do sêmen, além de afetar a motilidade dos espermatozoides, podem lesionar seus acrossomos (MAXWELL & EVANS, 1990). Uma das maneiras de avaliar a integridade da membrana consiste em submeter os espermatozoides a um meio hipotônico, fazendo com que a água atravesse a membrana plasmática em direção ao meio intracelular na intenção de alcançar o equilíbrio osmótico, (DREVIUS, 1966).

A entrada de água se traduz no aumento do volume celular (*swelling*) que cessa ao se igualar as concentrações em ambos os lados da membrana e depois de haver produzido uma série de modificações morfológicas. Durante a reação endosmótica, o “aparelho motor” se volta bruscamente, podendo variar sua morfologia a desde reta a ligeiramente curvada ou totalmente sinuosa, mas absolutamente afuncional em todos os casos, DREVIUS (1972).

2.7 Teste Hiposmótico (HOST)

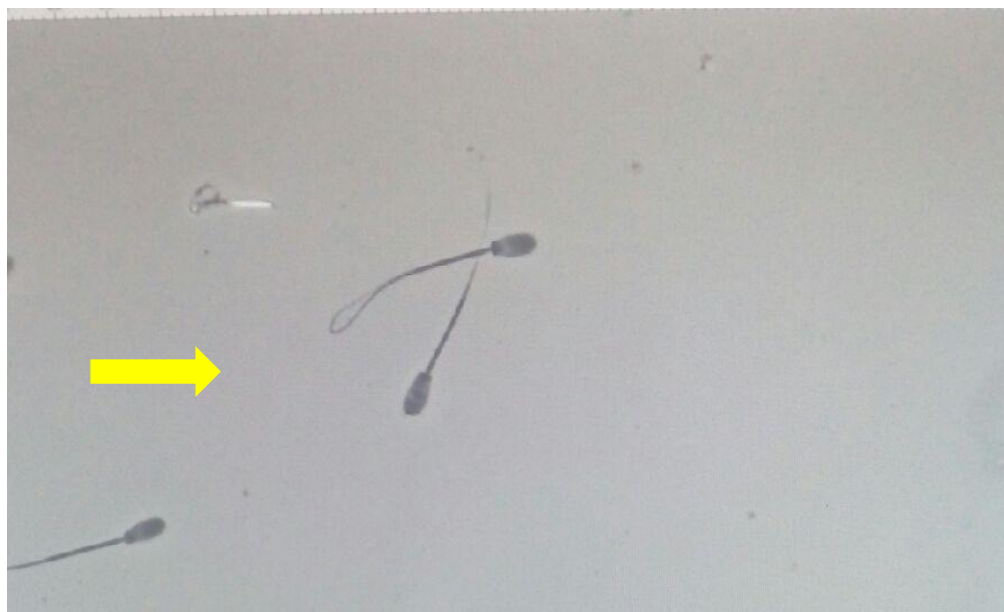
O teste se baseia no comportamento da célula espermática frente a um meio hiposmótico. Na tentativa de equilibrar o meio extra e intracelular, ocorrendo um influxo de água através da membrana, gerando assim um aumento do volume celular (edema). Com o edema, a cauda se “enrola” e esta alteração é facilmente visualizada em microscopia óptica (FONSECA *et al.*, 2005)

Jeyendran *et al.* (1984) propuseram o uso do teste hiposmótico (HOST) por ser considerado um método simples e acessível, capaz de detectar alterações intensas na funcionalidade espermática em amostras que não seriam descartadas se somente os resultados de motilidade e morfologia espermáticas fossem considerados. Este teste se caracteriza pelo influxo de fluidos para o interior da célula espermática, sob condições hiposmóticas, até que o equilíbrio entre os compartimentos seja alcançado, sendo um indicativo de que o transporte de água através da membrana está ocorrendo (INAMASSU *et al.*, 1999).

O teste hiposmótico avalia a habilidade da membrana do espermatozóide ao atravessar os diferentes gradientes de concentração ao qual ele é exposto. Caso o HOST seja negativo, a membrana é quimicamente inativa, e não tem função no processo de fertilização. A membrana é importante não apenas na motilidade do espermatozóide, mas também na reação acrossômica (entrada do espermatozoide no óvulo)

No HOST são incubados espermatozóides sob condições hiposmóticas. O transporte de água para a célula irá ocorrer quando a membrana for funcional, mostrando a cauda em forma de anel (inchaço). Isso ocorre porque a membrana ao redor da cauda é bastante permeável, permitindo então a entrada de água que irá causar distensão (*ballooning*) desta membrana de acordo com a figura 1- TESTE HIPOSMÓTICO.

Figura 1- Teste Hiposmótico.



Fonte: Zootecnista Paola Tristão, 2017.

2.8 Análise Seminal Computadorizada (*Computer-Assisted Semen Analysis – CASA*)[®]

O *Computer Assisted Sperm Analysis (CASA)*[®] é um sistema automático (hardware e software) utilizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas, fornecendo informações acuradas, precisas e significativas do movimento individual de cada célula bem como de subpopulações de células espermáticas (AMANN e KATZ, 2004).

A análise da motilidade e morfologia espermática têm sido apontadas por muitos autores como importante ferramenta na seleção de um ejaculado, sendo a determinação da porcentagem de espermatozóides móveis, o teste mais utilizado para prever a qualidade seminal (VERSTEGEN *et al.*, 2002). Tradicionalmente, a quantificação da qualidade espermática tem sido baseada na avaliação subjetiva, usando estimativa visual de parâmetros como motilidade massal e individual, contudo, estudos relatam existir uma variação de 30 a 60% na estimativa desses parâmetros devido à limitação do ser humano em quantificar as diferentes subpopulações espermáticas na amostra (AMANN e HAMMERSTEDT, 1980; VERSTEGEN *et al.*, 2002).

Os diferentes instrumentos CASA[®] têm demonstrado altos níveis de precisão e confiança usando diferentes metodologias de classificação que fornecem uma grande ferramenta para melhorar nosso conhecimento e habilidade para analisar espermatozóides

(VERSTEGEN *et al.*, 2002) tornando-se essencial à pesquisa, ao treinamento de pessoal e à padronização entre laboratórios (AMANN e HAMMERSTEDT, 1980).

Este exame tem o objetivo de tornar a análise dos parâmetros espermáticos automatizada e padronizada. Permite determinar a concentração e a motilidade dos espermatozóides, além das características do movimento exibido pelas células. O computador digitaliza as imagens dos espermatozóides e reconstrói a sua trajetória ao longo do tempo, o que permite o cálculo de diversos parâmetros que, manualmente, não é possível, como: a velocidade linear (VL), a velocidade curvilínea (VCL), a amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozóide (ADL), a linearidade (LIN) e a velocidade da trajetória média (VTM). Alguns desses parâmetros apresentam correlação com sua capacidade de penetração no muco cervical e taxas de fertilização. Alguns sistemas de análise computadorizada vêm equipados com programas que permitem a avaliação da morfologia espermática (KRAEMER *et al.*, 1998; IGUEROUADA e VERSTEGEN, 2001).

O sistema é adequado para quantificar um grande número de células com padrão de motilidade heterogêneo em um curto período de tempo Mack *et al.* (1988); Farrel *et al.*, (1996) fornecendo dados de concentração de espermatozóides/mL, morfologia, motilidade e velocidade, detectando mudanças sutis nos parâmetros sob várias condições experimentais (KRAEMER *et al.*, 1998).

Além da execução do exame, o sistema permite a catalogação de pacientes num banco de dados, assim como, o armazenamento de informações relevantes, criando um ambiente de trabalho caracterizado pela confiabilidade, versatilidade, facilidade de manuseio e de configuração. As avaliações são rapidamente executadas, e os resultados são facilmente catalogados, permitindo que seja atingido alto nível de automação em laboratórios, clínicas, empresas e universidades (VERSTEGEN *et al.*, 2002).

Embora o sistema tenha muitas vantagens, ele apresenta algumas desvantagens que tornam seu uso limitado Verstegen *et al.* (2002) o elevado custo do equipamento e a necessidade de validação, o controle de qualidade e a padronização das avaliações realizadas (DAVIS & KATZ, 1993).

2.9 Inseminação Artificial

A inseminação artificial (IA) é uma biotecnologia de reprodução em que o sêmen é obtido de um macho e depositado no sistema genital da fêmea, por meio de instrumentos

apropriados e no momento em que os espermatozóides possam encontrar o óvulo e fecundá-lo (MAIA, 2010).

Com a inseminação é possível multiplicar o número de coberturas feitas por um carneiro de alto valor genético, em uma única estação de monta, mais de 15 vezes o que seria conseguido através de monta natural. Podendo assim acelerar o melhoramento genético do rebanho, otimizando o manejo reprodutivo. Desta forma, a IA permite a multiplicação de genótipos sem multiplicar o número de reprodutores no rebanho ou mesmo eliminando-os, reduzindo os custos com a sua manutenção (EVANS e MAXWELL, 1990).

Segundo Valentim *et al.* (2016) a IA, quando associada a programas de melhoramento, permite acelerar o progresso genético através da testagem dos jovens machos sobre a sua descendência, ou pela introdução da seleção assistida por marcadores moleculares proporcionando a difusão dos melhores animais ou simplesmente dos machos, aumentando a sua descendência, uma vez que um só ejaculado permite inseminar várias fêmeas.

A IA permite evitar a difusão de doenças venéreas ou de transmissão sexual desde que se tomemos cuidados adequados. Permite ainda a obtenção de sêmen de reprodutores de outras regiões ou países, ou mesmo a utilização de material seminal de machos que já morreram.

A difusão da IA na espécie ovina e a realização do seu total potencial depende do uso de sêmen congelado e assim das técnicas disponíveis para a obtenção de uma fertilidade aceitável (Papadopoulos *et al.*, 2005). Em ovinos, a taxa de fertilidade após inseminação cervical com sêmen congelado/descongelado é geralmente baixa (8-30%) (AISEN, 2001).

Dentro da problemática da IA ovina com sêmen congelado encontra-se o fato do sêmen de carneiro não possuir uma capacidade antioxidante adequada (diferença em relação a outras espécies) Aisen *et al.* (2000) e também diferenças na composição da membrana do espermatozóide, nomeadamente nos lipídios Bucak *et al.* (2007) dificultando o sucesso da sua criopreservação.

2.10 Criopreservação Sêmen

A criopreservação de sêmen é uma técnica baseada na retirada do excesso de água do interior das células espermáticas, o que evita a formação de cristais de gelo intracelulares, que podem causar danos aos espermatozoides.

Além disso, a temperatura de congelamento em nitrogênio líquido (-196°C), a viabilidade das células é mantida por período indeterminado o que permite o uso futuro do material genético armazenado (CARNEIRO, 2007).

O processo de criopreservação envolve a diluição do sêmen em solução que deve conter diluidor, antibióticos, meio energético, antioxidante (opcional), crioprotetor intracelular e crioprotetor extracelular, a qual não devem promover a ativação das células espermáticas, mas sim permitir o armazenamento adequado (MARIA & CARNEIRO, 2012).

Os protocolos de criopreservação se baseiam na avaliação e determinação do melhor agente crioprotetor, aditivos e taxas de congelamento e descongelamento, que são modificados de espécie para espécie quando se pretende estabelecer o melhor protocolo de criopreservação (ANDREEV *et al.*, 2009). O processo da criopreservação de sêmen de ovinos, normalmente consiste de algumas etapas, são elas: colheita do sêmen, adição de diluidores e crioprotetores, envase, congelamento e armazenamento e posteriormente o descongelamento (MARIA & CARNEIRO, 2012).

Os protocolos de criopreservação de sêmen possuem limitações, e as taxas de sucesso variam entre espécies e até entre indivíduos da mesma espécie (WOODS *et al.*, 2004). As diferenças interindividuais para a criopreservação de espermatozoides são de carácter hereditário e não aleatório (HOLT, 2000). A criopreservação também contribui para minimizar perdas econômicas advindas da morte de reprodutores de alto valor comercial ou que participem de programas de revitalização de raças, para a preservação contra a extinção de raças nativas e conservação de espécies ameaçadas (WATSON, 2000).

A criopreservação permite o armazenamento de sêmen por longo período, mantido em nitrogênio líquido e viabiliza o uso do sêmen criopreservado em outras biotécnicas da reprodução.

O sucesso da criopreservação de sêmen depende da redução das crioinjúrias causadas aos espermatozoides, mantendo assim sua morfologia e potencial fertilizante. Os danos causados nos espermatozoides durante o processo de criopreservação promovem a redução da motilidade e da integridade morfológica dos espermatozoides, devido à produção excessiva das espécies reativas de oxigênio (TIRELLI *et al.*, 2005).

Todavia, o processo de criopreservação das células espermáticas resulta em diminuição da fertilidade quando comparada com sêmen fresco. Este prejuízo surge da combinação de dois aspectos, morte celular e danos na capacidade funcional dos espermatozoides sobreviventes. A motilidade e a estrutura dos espermatozoides são afetadas de diferentes formas, uma vez que ocorrem crioinjúrias simultaneamente ou nas diferentes etapas da congelação e descongelação. (GONZALEZ, 2004).

Apesar de uma elevada proporção de espermatozoides de carneiro (40-60%) preservar a sua motilidade após a criopreservação, apenas cerca de 20-30% se mantêm biologicamente

não danificados (WATSON, 2000). Um espermatozóide pode ser móvel, mas danificado, pelo que é duvidoso se tal célula irá fertilizar o oócito (SALAMON e MAXWELL, 2000).

2.10.1 Crioprotetores

Agentes crioprotetores são essenciais para a criopreservação de quase todos os sistemas biológicos Fahy (1986) crioprotetores são substâncias que revestem a célula e protegem a membrana celular dos danos causados pela criopreservação e normalmente são adicionados ao meio de diluição do sêmen (CARNEIRO, 2007).

Esses agentes devem ser adicionados aos diluidores seminais para possibilitarem a sobrevivência dos espermatozóides durante o processo de congelação e descongelação (AMANN & PICKET, 1987). Esses componentes são classificados como penetrantes, quando exercem sua ação crioprotetora dentro da célula, ou não penetrantes, cuja atividade de crioproteção ocorre fora da célula ou na sua superfície.

Entre os crioprotetores espermáticos penetrantes, o glicerol (GL) é o mais utilizado, desde a demonstração da sua eficácia Smith e Polge *et al.* (1950) e tem ação tanto intracelular como extracelular na proteção das estruturas celulares. O seu efeito crioprotetor é atribuído à sua propriedade coligativa ou de ligação com a água Salomon e Maxwell (1995) reduzindo a temperatura de congelação do meio intracelular Hammerstedt (*et al.*, 1990), prevenindo a formação de cristais de gelo.

Ele também aumenta o volume de canais de solventes descongelados, dilui as altas concentrações de sais Squires *et al.* (1999) e diminui a pressão osmótica do meio resfriado (SALAMON e MAXWELL, 1995).

O GL tem sido o crioprotetor mais usado para a congelação de sêmen ovino. Para o sêmen congelado através do método convencional lento e com o uso, principalmente, de diluidores hipertônicos, a maioria dos estudos demonstra que as melhores concentrações de glicerol encontram - se entre 6% a 8% e para a congelação espermática rápida, pelo método de pellets, melhores taxas de sobrevivência espermática são atingidas com 3 a 4% de glicerol no diluidor (SALAMON & MAXWELL, 2000). Gema de ovo e leite em pó são as substâncias frequentemente adicionadas ao meio diluidor como seu componente básico, tipicamente em combinação com glicose (VIVEIROS & GODINHO, 2009).

A ação crioprotetora da gema de ovo está relacionada à presença de lecitina e lipoproteínas e caseína no leite que protegem os espermatozóides do choque térmico durante o processo de criopreservação (MIES FILHO *et al.*, 1982).

Para que o espermatozóide fertilize o oócito, deve preservar quatro atributos gerais após o congelamento e descongelamento: metabolismo para produção de energia; motilidade progressiva; enzimas, localizadas no acrossoma e proteínas na membrana plasmática, importantes para a sobrevivência do espermatozóide dentro do trato reprodutivo da fêmea e para a ligação do mesmo com a membrana plasmática do oócito para a fertilização.

A destruição de componentes da célula espermática, associada com uma, ou mais dessas funções, reduzirá a fertilidade. Por exemplo, um espermatozóide móvel nem sempre é fértil; espermatozóides móveis usualmente têm adequada produção de energia, mas outro importante aspecto pode ter sido alterado (AMANN & PICKETT, 1987).

O aprimoramento da técnica de criopreservação de sêmen é constante, visando melhorar a viabilidade espermática pós-descongelação, utilizando diferentes diluentes, protocolos de congelação e descongelação e até mesmo adicionando antioxidantes aos diluentes.

Tabela 4 - Principais causas e consequências das injúrias antes, durante e após a criopreservação nas células espermáticas.

Causa	Consequências
Coleta de sêmen e diluição	Proteínas seminais são adicionadas ao espermatozóides, estimulam a motilidade.
Centrifugação	Viabilidade espermática depende das condições de centrifugação.
Adição de leite, gema de ovo e glicerol (GL)	Estresse osmótico passageiro; células rapidamente desidratam e então lentamente retomam o volume normal enquanto GL se interioriza na célula
Refrigeração a 5° C	Ocorrem mudanças nas membranas que podem resultar em choque térmico e/ou danos de refrigeração às membranas
Congelação celular (remoção de água do sistema em forma de gelo)	Mudanças osmóticas (perda de água) causa desidratação celular e podem resultar em danos osmóticos; redução na temperatura pode causar danos de refrigeração, formação de cristais de gelo e danos à célula
Estocagem em Nitrogênio (N2) líquido	Células devem permanecer nos canais não congelados
Descongelação (retorno da água a sua forma líquida)	Mudanças osmóticas (“adição de água”) restaura o volume celular, danos de recristalização, danos osmóticos
Remoção do GL (retirada do GL antes da IA ou só IA)	Desequilíbrio passageiro de osmolaridade, célula rapidamente aumenta seu tamanho e então vagarosamente retorna ao volume original conforme o GL deixa a célula, pode ser muito lesivo

Fonte: Adaptado de GRAHAM, (1996).

2.10.2 Antioxidantes- o uso na criopreservação

Os antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação através da inibição da produção ou dos efeitos deletérios dos radicais livres (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). Diversos antioxidantes têm sido adicionados aos diluentes de congelação com o intuito de minimizar os efeitos lesivos as membranas dos espermatozóides pelos radicais livres. Com o objetivo de reduzir danos oxidativos causados pelas EROS, pesquisadores têm adicionado substâncias antioxidantes aos diluentes de sêmen equino (BAUMBER *et al.* 2005) suíno (GADEA *et al.* 2005) e bovino (BILODEAU *et al.*, 2001).

Os antioxidantes bloqueiam os radicais evitando a peroxidação lipídica dos espermatozoides que causa danos irreversíveis as células (BAUMBER *et al.*, 2000). As células somáticas contêm antioxidantes dentro do citoplasma, porém o espermatozóide perde a maioria do seu citoplasma na maturação, dessa forma falta mecanismo que regule e realize as defesas enzimáticas (BAUMBER *et al.*, 2005).

Para proteção dos efeitos letais da formação excessiva de EROS, a célula possui um sistema de defesa antioxidante enzimático e um não enzimático, sendo o enzimático composto pelas enzimas: superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT), peroxiredoxinas (Prx), glutatona (GSH), glutatona redutase (GR) e glutatona peroxidase (GPx), e os não enzimáticos, que são compostos de baixo peso molecular, que inclui as vitaminas C e E, diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico e ácido lipóico (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

Segundo Agarwal *et al.* (2004) o controle da concentração das EROS ocorre pela inclusão de antioxidantes aos meios de refrigeração ou pelo uso de condições que reduzem a oxidação durante o congelamento.

Os antioxidantes são substâncias que agem direta ou indiretamente nas células reduzindo os efeitos tóxicos causados pelos radicais livres. Existem compostos com funções antioxidantes, sendo elas vitamina A, C, E, glutatona, catalase, selênio, zinco, melatonina e entre outros (INEU, 2007).

2.10.3 Melatonina

A melatonina é um hormônio de ocorrência natural em todos os mamíferos, sintetizado e secretado exclusivamente durante a noite pela glândula pineal, cuja secreção está diretamente relacionada ao ciclo claro-escuro. A melatonina, N-acetil-5-metoxi-triptamina, foi descoberta há cerca de 50 anos atrás e é um composto sintetizado principalmente pela glândula pineal, localizada no cérebro, mas também pela retina, timo, medula óssea, epitélio respiratório, pele, intestino, entre outros locais.

Ela tem um importante papel na regulação dos processos patológicos e fisiológicos e é considerada como um hormônio que regula o ritmo circadiano (CARPENTIERI *et al.*, 2012). Na espécie ovina, tal como em muitas outras espécies animais, a produção de melatonina aumenta sua atividade com dias curtos (fotoperíodo negativo). A luminosidade é percebida pela retina, que conduz o estímulo via nervo óptico até o núcleo supraquiasmático no hipotálamo. Estes neurônios levam o estímulo até a glândula pineal, onde é secretada a melatonina, pela luz

e estimulada pela escuridão, alcançando um pico a meio da noite e decrescendo a partir deste valor.

No Ano de 1993 foi descoberta a função da melatonina em captar radicais livres do meio, agindo como um potente antioxidante direto. Isso foi demonstrado com a radical hidroxila *in vitro*. Desde então esta substância vem sendo muito estudada e utilizada. Há estudos do efeito da melatonina na mitocôndria, no sistema imune, gastrointestinal, nervoso, possui influência benéfica no câncer, na patofisiologia da gestação, entre outros (REITER *et al.*, 2009; CARPENTIERI *et al.*, 2012).

A melatonina é uma indolamina contendo dois grupos funcionais, podendo se ligar ao receptor, ou usar sua propriedade anfifílica, dando à molécula a capacidade de entrar em qualquer célula, compartimento ou fluido corporal. Devido a sua alta solubilidade em lipídeos, passa facilmente por difusão da circulação periférica para outros fluidos ou células. Existem evidências de que a melatonina é a maior “neutralizadora” de ROS e nitrogênio, tendo este efeito em concentrações fisiológicas ou farmacológicas (CARPENTIERI *et al.*, 2012).

A natureza lipofílica da melatonina permite que ela atravesse as membranas celulares e facilmente chegue nos compartimentos intracelulares, incluindo a mitocôndria. A indolamina interage com a bicamada lipídica e estabiliza a membrana interna mitocondrial, isso pode melhorar a atividade da cadeia de transporte de elétrons (CARPENTIERI *et al.*, 2012). Já que a maioria das ROS produzidas pelo espermatozóide são produtos do metabolismo mitocondrial, um antioxidante que possa agir nesse nível tende a ser uma boa opção para reduzir os efeitos do estresse oxidativo (GIBB; LAMBOURNE; AITKEN, 2014). Os antioxidantes bloqueiam os radicais evitando a peroxidação lipídica dos espermatozoides que causa danos irreversíveis as células (BAUMBER *et al.*, 2000).

O controle da concentração das EROS ocorre pela inclusão de antioxidantes aos meios de refrigeração ou pelo uso de condições que reduzem a oxidação durante o congelamento (AGARWAL *et al.*, 2004).

Diferentemente da maioria dos antioxidantes, a melatonina está desprovida de atividade peroxidativa, e todos os intermediários gerados pela interação com as espécies reativas, como 3-hidroximelatonina cíclica (3-OHM cíclica), N1-acetil-N2- formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) e N1-acetil-5-metoxiquinuramina (AFM), também possuem efeito antioxidante (RAO; GANGADHARAN, 2008).

Além disso, ela regula a expressão de genes responsáveis pelas enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutathione peroxidase (GPx), influenciando nos níveis destas proteínas com atividade enzimática celular sob condições fisiológicas ou oxidantes (RODRIGUEZ *et*

al., 2004). O efeito antioxidante da melatonina em baixas concentrações parece ser indireto, através de *upregulation* da expressão do gene da GPx, enquanto que em altas concentrações seu efeito é direto, agindo com a eliminação de radicais livres do meio. Tem sido proposto que sua capacidade de *upregulation* com o sistema enzimático antioxidante envolve tanto a membrana quanto receptores nucleares (FISCHER *et al.*, 2008).

Casao *et al.* (2012) partindo de a possibilidade da ação da melatonina ser por meio de receptores, pesquisaram e constataram a presença dos receptores MT1 e MT2 em espermatozóides de carneiros, entretanto, o mecanismo bioquímico não foi completamente elucidado, sugerindo que esta ação pode ser mais complexa do que se pensava.

3 METODOLOGIA

3.1 Local do experimento

3.1.1 Coletas e Análises Pré Criopreservação do Sêmen

Os animais são de propriedade da Cabanha Feltrin, do proprietário Sr. Oberdan Antônio Feltrin, localizada no município de Guaíba/RS, com localização geográfica a Latitude: 30° 06' 50" S Longitude: 51° 19' 30" W. Os animais utilizados são frequentemente coletados, passando por exame andrológico periódicos, destes quatro foram selecionados apresentando características espermáticas acima dos padrões mínimos, conforme estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

Os animais foram submetidos a um manejo de semi-confinamento, permanecendo em um potreiro com água a maior parte do dia, retornando ao aprisco para pernoitar onde recebem água, sal mineral e feno de alfafa *ad libitum* e alimentação à base de campo nativo e ração formulada com em milho, farelo de soja, farelo de trigo, alfafa, óleo de soja, núcleo e melaço duas vezes ao dia, a quantidade utilizada de cada alimento não foi fornecida pelo proprietário dos animais.

Os animais foram coletados no período de 28 de abril a 1 de maio, onde após coleta do sêmen este foi analisado quanto a motilidade, vigor e concentração, e posteriormente criopreservados no laboratório existente na própria Cabanha.

3.1.2 Análises Pós-criopreservação do Sêmen

As análises pós criopreservação foram feitas no Laboratório de Reprodução Animal (REPROLAB) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, em Porto Alegre/RS, no período de 17 a 22 de junho de 2017.

3.2 Coleta do sêmen

Foram utilizados quatro machos da raça Texel, com idade entre 11 meses a 2 anos. O sêmen foi obtido através de vagina artificial adaptada a espécie ovina, sendo realizada uma coleta de cada animal. Estes posteriormente dividido em partes iguais para a diluição, análise e criopreservação.

3.2.1 Avaliação inicial do sêmen

Após a coleta, o sêmen obtido foi mantido na propriedade em banho-maria numa temperatura de 37°C durante o tempo necessário para as avaliações macroscópica (cor, aspecto e volume) e microscópica (turbilhonamento, motilidade, vigor e concentração espermática).

A avaliação foi realizada observando-se a extremidade de uma gota de sêmen puro colocada sobre uma lâmina, em objetiva de 20X, sendo a motilidade e o vigor espermático avaliados também de forma subjetiva. Conforme a movimentação, o turbilhão foi classificado em cruces:

- +++: movimentação ativa
- ++: movimentação média
- +: movimentação lenta
- -: Ausente

3.2.2 Diluição do sêmen

Primeiramente o sêmen foi diluído em 3 diferentes soluções:

- Solução A Controle – TRIS Gema de Ovo;
- Solução B TRIS Gema de Ovo + Mel M 2mMol;
- Solução C TRIS Gema de Ovo + Mel M 4mMol.

Dos diluidores utilizados o TRIS, contendo substâncias tampões, fontes energéticas e antibióticos na proporção 1:1, em tubos de centrífuga de 15 ml, onde permaneceram por um período de 1h em banho maria de 37°C. Durante este período o sêmen foi submetido a avaliação microscópica (vigor, turbilhonamento e motilidade).

É importante ressaltar que o diluente TRIS empregado no presente estudo é o destinado a criopreservação de sêmen, é o diluente citado por Aisen (2008) para a diluição de sêmen ovino.

3.2.3 Congelação do sêmen

Após a diluição final, para que a concentração da dose fosse 100×10^6 espermatozoides/ml, foi realizada nova avaliação microscópica e o sêmen envasado em palhetas de 0,25 ml, previamente identificadas (grupo e animal), e então submetidas ao processo de congelação propriamente dito.

Inicialmente as doses permaneceram por 10 minutos a 0,5°C/min, dispostas horizontalmente em uma grade de alumínio. Transcorrido o tempo de equilíbrio, as doses foram transferidas para outra grade de alumínio em uma caixa isotérmica contendo nitrogênio líquido a uma distância de 5 cm acima do nível de nitrogênio, onde permaneceram por 10 minutos, sendo posteriormente mergulhadas em nitrogênio líquido (-196°C), e armazenadas em botijão criogênico.

3.2.4 Descongelamento do sêmen

Após o congelamento, foi descongelado uma amostra de cada solução, em banho-maria a 37°C durante 30 segundos e avaliado subjetivamente o vigor e a motilidade espermática, ainda no Laboratório de Reprodução Biotech, para que estas características estejam dentro dos padrões exigidos pelo CBRA para a espécie ovina. As amostras analisadas no laboratório Reprolab, realizando os mesmos procedimentos de descongelamento e o sêmen testado para, teste hiposmótico e analisado no Programa de *Software CASA*®.

Após o descongelamento das palhetas (controle, tratamento 1 e tratamento 2) por 30 segundos em banho maria a 37°C, o sêmen foi retirado da paleta e acondicionado em um *eppendorf*®, deixado sobre a placa aquecida a 37°C e posteriormente divididos em 2 alíquotas de 10µl de sêmen, uma alíquota usada para fazer o Teste hiposmótico (host) a esta foi adicionada 1 ml de solução hiposmótica de 150mOsmol/l feita no laboratório (0,735g de citrato de sódio, 1,351g de frutose em 100ml de água, e colocada na estufa por 30 minutos e posteriormente analisada em microscópio ótico. E a outra alíquota usada para análise no software *CASA*®, foi usada 10µl de sêmen e acrescida de 90µl de leite desnatado UHT (1:9) e analisado imediatamente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A refrigeração é uma etapa que quando efetuada de modo inadequado, causa choque térmico que induz a ocorrência de danos parcialmente irreversíveis ao espermatozoide, caracterizados por padrões anormais de movimento (circular ou retrógrado), perda rápida da motilidade, lesões no acrossoma, danos à membrana plasmática, redução da atividade metabólica e perda dos componentes intracelulares (GRAHAM, 1996). Muitos desses defeitos são decorrentes de alterações da membrana plasmática à medida que os espermatozoides evoluem nas transições de fase, do estado líquido cristalino para o estado de gel e durante a refrigeração.

Tabela 5 –Avaliação macroscópica dos carneiros utilizados.

Carneiros	Aspecto	Cor	Volume
378	Leitoso	Marfim	1,5 ml
353	Leitoso	Marfim	1 ml
363	Leitoso	Marfim	1 ml
364	Leitoso	Marfim	1 ml

Fonte: Autora, 2017

Tabela 6 - Avaliação microscópica dos carneiros utilizados.

Carneiros	Motilidade	Vigor	Turbilhão
378	70%	2	+++
353	65%	2	++
363	75%	3	+++
364	70%	3	+++

Fonte: Autora, 2017

As quatro amostras controle (somente com TRIS) analisadas no CASA® tiveram uma grande variância de valores.

Tabela 7 - Controle

Amostras	Concentração Média (Sptz/ml)	Imóveis [%]	Motilidade Total [%]	Motilidade Rápida	Motilidade Lenta	Motilidade Local
1	1330x 10 ⁶	91.22	8.78	2.39	3.72	2.66
2	743x 10 ⁶	26.94	73.06	7.75	58.67	6.64
3	737x10 ⁶	89.93	10.07	0.37	2.99	6.72
4	591x10 ⁶	60.94	39.16	17.47	6.63	10.24

Fonte: Autora, 2017.

A queda de temperatura de 20°C até 5°C é o momento onde ocorre o maior impacto e ocorre um estresse inicial (SQUIRES *et al.*, 1999), devido à mudança de fase da membrana plasmática, e essa alteração de fase dificulta a permeabilidade dos crioprotetores no meio (GRAHAM, 1996; MEDEIROS, 2002). Fator que pode ter contribuído para esta grande variabilidade de valores nas amostras.

Segundo os padrões do CBRA (1998) o sêmen ovino descongelado é considerado apto se a amostra contiver no mínimo 40% de motilidade espermática, por este motivo observa-se que a motilidade do sêmen criopreservado em TRIS, não apresentou viabilidade em duas das quatro amostras. Resultados superiores em relação ao TRIS foram encontrados por Carvalho *et al.* (2008) quando compararam a diluição e a criopreservação do sêmen ovino com TRIS-Gema (TG), Leite-Gema (LG) e TRIS-Gema- Leite (TGL), e observaram que o diluente TG mostrou motilidade progressiva (46,5%) superior aos diluentes LG (26,1%) e TGL (32,1%) após a descongelação.

Segundo Oliveira *et al.* (2009) o meio à base de TRIS promove maior proteção quanto às crioinjúrias em espermatozóides, devido a maior quantidade de Gema de Ovo. Este fato foi confirmado por Cavalcante (2008), quando comparando o sêmen ovino criopreservado em TRIS e em água de coco em pó (ACP-102), observou que após a descongelação o percentual de espermatozóides móveis foi de 62,8% e 40,3%, respectivamente.

Segundo Valente *et al.* (2007) o sêmen ovino diluído com 4,4% TRIS + 7% GL + 16,2% Gema de Ovo (EZN) e com 2,7% TRIS + 3% GL + 5% Gema de Ovo + 3,8% Trealose (Aisen), apresentou motilidade individual após a descongelação de 46,5% e 38,8%, afirmando que a maior percentagem de TRIS presente no diluente EZN permite uma melhor capacidade fertilizante dos espermatozóides após a descongelação.

As amostras com os tratamentos 1 com 2mMol e tratamento 2 de 4mMol de melatonina manipulada, analisadas no CASA®, obtiveram grande variabilidade entre as amostras.

Tabela 8 – Análise do CASA® tratamento 1 2µmOL

Amostras	Concentração Média (SPTZ/ml)	Imóveis [%]	Motilidade Total [%]	Motilidade Rápida	Motilidade Lenta	Motilidade Local
1	1160x10 ⁶	51.08	48.92	1.49	14.08	33.34
2	1960x10 ⁶	86.62	13.38	5.42	1.27	6.33
3	1294x10 ⁶	90.45	9.55	1.43	2.63	4.77

Fonte: Autora, 2017.

Tabela 9 - Análise do CASA® tratamento 2 4µmOL

Amostras	Concentração Média (SPTZ/ml)	Imóveis [%]	Motilidade Total [%]	Motilidade Rápida	Motilidade Lenta	Motilidade Local
1	6633x10 ⁶	62.80	37.20	5.59	17.02	14.45
2	6593x10 ⁶	77.69	22.31	0.75	8.26	13.30

Fonte: Autora, 2017.

Diversas literaturas descrevem que o processo de congelação e descongelação do sêmen provoca alterações estruturais, bioquímicas e funcionais (Watson, 1995; Holt, 2000; Salomon e Maxwell, 2000), resultando numa redução da motilidade, vitalidade e viabilidade, independentemente dos diluidores utilizados (BARBAS *et al.*, 2000; AISEN, 2001; VALLERIOTE *et al.*, 2005).

Mesmo sendo uma avaliação objetiva, o sistema CASA® apresenta variação nos resultados entre 11 e 23%, o que pode ser atribuída a fatores como preparação da amostra incluindo técnica de fixação e técnica de coloração, bem como fatores como correta iluminação, foco, aumento, sistema de classificação, interpretação e experiência do profissional (HIRAI *et al.*, 2001; VERSTEGEN *et al.*, 2002).

Nos resultados do teste Hiposmótico, houve grande variabilidade entre valores e amostras observadas no presente experimento.

Tabela 10 - Resultado do hiposmótico

TESTE HIPOSMÓTICO	%	
	ENROLADOS	RETOS
CONTROLE		
AMOSTRA 1	30	70
AMOSTRA 2	8	92
AMOSTRA 3	8	92
AMOSTRA 4	34	66
TRATAMENTO 1 (2 μ Mol)		
AMOSTRA 1	19	81
AMOSTRA 2	16	84
AMOSTRA 3	10	90
TRATAMENTO 2 (4 μ Mol)		
AMOSTRA 1	24	76
AMOSTRA 2	8	92

Fonte: Autora, 2017

Segundo Cavalcante (2014) o qual avaliou o diluente ACP102c (água de coco em pó) na criopreservação do sêmen ovino em comparação com o diluidor TRIS GLICOSE GEMA, os resultados obtidos foram, que a criopreservação também reduziu o percentual de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (HOST) nos diluidores seminais utilizados quando comparados ao sêmen fresco. O diluidor ACP102c conferiu menor proteção aos espermatozoides ovinos contra danos do congelamento quando comparado ao TRIS, mas o aprimoramento de sua formulação e protocolos mais adequados de congelação poderão torná-lo uma alternativa na congelação do sêmen ovino.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É possível observar que as células espermáticas ovinas submetidas a procedimentos de criopreservação, considerando-se sua maior sensibilidade ao processamento, apresentam alterações funcionais.

Igualmente, observa-se que a adição de antioxidantes que sejam capazes de minimizar os danos às células espermáticas durante a refrigeração e congelação é um procedimento complexo, devido à variação nas características antioxidantes do ejaculado, entre reprodutores ou mesmo entre diferentes ejaculados de um mesmo carneiro, no qual a adição da melatonina manipulada ao meio diluente veio a mostrar significância, pois não há relato de publicações referente ao mesmo, tendo somente como referência a melatonina da Sigma®.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, R. J; BAKER, M. A. Oxidative stress and male reproductive biology. **Reproduction, fertility and development**, v. 16, p.581-588, 2004.
- AISEN E.G., ALVAREZ H.L., VENTURINO A., GARDE J.J. (2000). Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. **Theriogenology**, 53: 1053-1061.
- AISEN E.G. (2001). **Criopreservación de semen ovino. Efecto de diluyentes hipertónicos sobre la integridad espermática**. Tese de Doutorado, Faculdade de Veterinária, Universidade de Buenos Aires.
- AISEN, E.G.; MEDINA, V.H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen indifferent trehalose concentration. **Theriogenology**, v. 57, p. 1801- 1808, 2002.
- AISEN, E.G. **Inseminação Artificial de ovelhas e cabras. Reprodução ovina e caprina**. São Paulo: Med. Vet, 1ª ed., p.101-114, 2008.
- AGARWAL, A.; NALLELLA, K. P.; ALLAMANENI, S. S.; SAID, T. M. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. **Reproductive Biomedicine online**, v.8, n.6, p.616-627, 2004.
- ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.105-113, 2005.
- AMANN RP, HAMMERSTEDT RH. Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. **Biol Reprod**, v.23, p.6478-645, 1980.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal Equine Veterinary Science**, v.7, p.145 173, 1987.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal funcion. In: MCKINNON, A. O.: VOSS, J. L.: **Equine Reproduction, Filadelfia: Lea & Febiger**, p. 715-745. 1992.
- _____. Spermatozoal funcion. In: McKinnon AO Voss JL (Ed.). **Equine reproduction. Philadelphia: Lea & Febiger**, 1993. p.715-745.
- AMANN R, KATZ DF. Reflections on CASA after 25 years. **J Androl**, v.25, p.317-325, 2004.
- ANDREEV, A. A.; SADIKOVA, D. G.; GAKHOVA, E. N.; PASHOVKIN, T. N.; TIKHOMIROV, A. M. Congelation of cryoprotective solutions and cryopreservation of fish sperm. **Biophysics**, v. 54, n. 5, p. 612-616, 2009.

AIDAR, Nayara Braga. **Criopreservação de sêmen equino**. Brasília-DF, Universidade de Brasília. 51p.: il. Monografia – Universidade de Brasília – UnB/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

BAILEY, J. L.; BILODEAU, J. F.; CORMIER, N. Semen preservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v.21, n. 1, p.1-7, 2000.

BALL, B. A.; VO, A. T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, n. 4, p.508- 515, 2001.

BALL, B. A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v.107, n. 3, p.257-267, 2008.

BARBAS, J.P., ALVES, H., BEATO, A., RICARDO, R., MASCARENHAS, R. (2007). Evaluation of freezing ability of ejaculates from rams of national breeds. In: Proceedings of Jornadas de Reprodução Animal, **VI Simpósio da Sociedade Portuguesa de Reprodução Animal e IV Jornadas da Associação de Estudantes de Medicina Veterinária de Évora**, Universidade de Évora, Portugal, pp.59.

BARBAS, J.P., FERREIRA, G.M.B.C., SOUSA, J.P.F., BAPTISTA, M.C., HORTA, A.E.M. (2000). **Efeito da congelação de sêmen de carneiros Merino Regional e Serra da Estrela, sobre as características seminais à descongelação**. In: Proceedings of X congresso de Zootecnia, Estação Zootécnica Nacional, Portugal, pp 86.

BARBAS, J.P., HORTA, A.E.M., BAPTISTA, C.C., MARQUES, C.C., SERRA, C.C. (2003). **Inseminação artificial de ovelhas saloias com sêmen refrigerado e congelado**. In: Proceedings da XXIV Reunião da Primavera da SPPF, XLII Reunião da SPOC, Portugal, pp 34-5.

BAUMBER, J.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; MEDINA, V.; DAVIEL-MORE, M. C. G. The effect of reative oxygen species on equine sperm motility, viability, acrossomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v.21, p.895-902, 2000.

BAUMBER, J.; VO, A.; SABEUR, K.; BALL, B. A. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 57, n.3, p.1025-1033, 2002.

BAUMBER, J.; SABEUR, K.; VO, A.; BALL, B. A. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.60, n.7, p.1239-1247, 2003.

BAUMBER, J.; BALL, B. A.; LINFOR, J. J. Assessment of cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. **American Journal of Veterinary Research**, v.57, n. 5, p. 772-779, 2005.

BILODEAU, J. F.; SUVRO-CHATTERJEE., SIRARD, M. A. Levels of antioxidante defenses are decrease in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 3, p. 282-288, 2000.

Bucak M.N., Atessahin A., Varisli O., Yuce A., Tekin N., Akçay A. (2007). The influence of trealose, taurine cysteamine and hyaluronidase on ram semen parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**, 67: 1060-1067.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte, 1998. 49p.

CARNEIRO, P. C. F. **Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes**. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 31, n. 3, p. 361-366, 2007.

CASTRO, S. V.; CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. **Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos**. Acta Scientiae Veterinariae, v. 39, n. 2, p. 1-17, 2011.

COX J.F., ÁVILA J., SARAIVA F., Santa Maria A. (1994). Assessment of fertilizing ability of goat spermatozoa by in vitro fertilization of cattle and sheep intact oocytes. **Theriogenology**, 41: 1621-1629.

DAVIS RO, KATZ DF. Operational standards for CASA instruments. **J Androl**, v.14, p.385-395, 1993.

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

DU PLESSIS, S. S., HAGENAAR, K., & LAMPIAO, F. (2010). The in vitro effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS. **Andrologia**, 42(2), 112-116.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. **Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema-caroteno/ácido linoleico e métodos de sequestro de radicais DPPH**. Ciência e tecnologia de alimentos, v.26, n.2, p.446-452, 2006.

DREVIUS, L.O.; ERIKSSON, M. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. **Exp. Cell. Res.**, V.42, p. 136-156.1996.

DREVIUS, L.O. The permeability of bull spermatozoa to water, polyhydric alcohols and univalente anions and the effects of the anion upon the kinetic activity os spermatozoa and sperm models. *Jour. **Reprod. Fert***, V. 28, p. 41-54, 1972.

ERIKSSON BM, RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Effect of frezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen. **Anim Reprod Sci**, v.63, p.205-220, 2000.

EVANS G. E MAXWELL W.M.C. **Inseminación Artificial de Ovejas y Cabras**. Zaragoza: Editorial ACRIBIA. pp: 1-6, 19-32. (1990).

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. **Sydney: Butterworths**, 1987. 194p.

FARREL PB, FOOTE RN, MCARDLE MM, TROUERN-TREND VL, TARDIF AL. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). **J Androl**, v.17, p.293-300, 1996.

FELICE. A. C, FARIAS. J. L, BITTENCOURT. R. F, DALTRO. D. S, OCAÑA. G, Pinho. A.P. S, 2010. **Perfil dos Ovinocultores de Corte da Cidade de Sant'Ana do Livramento RS- Brasil**. SIEPPE/ UNIPAMPA 2010.

GADEA, J.; GARCÍA-VAZQUEZ, F.; MATÁS, C.; GARDÓN, J.C.; CÁNOVAS, S.; GUMBAO, D. Cooling and freezing of boar spermatozoa: Supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. **Journal of Andrology**, v.26, p.396-404, 2005.

GONÇALVES, M. S. **Crescimento e desenvolvimento de cordeiros machos e fêmeas cruzas Lacaune x Texel**. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) –Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. - Pelotas, 2009.

GONZALEZ, R. A. F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozoide bovino** / Rodrigo Alonso Forero Gonzalez – Pirassununga: R. A. F. Gonzalez, 2004. 92 f.: il. Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2004.

GRANADOS, L. B. C; DIAS, A. J. B; SALES, M. P. **Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos** - 1ª Ed. Campos dos Goytacazes - Projeto PROEX/UENF, 2006.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. Avaliação do sêmen, 7ª ed. Editora: Manole, p. 373, 2004.

HAFEZ, S.E. **Reprodução animal**. 7a. ed. São Paulo: Manole, p. 335-42; 431-47, cap. 15 e 20, 2000.

HIRAI M, BOERSMA A, HOEFLICH A, WOLF E, FOLL J, AUMULLER R, BRAUM J. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. **Journar Androl**, v.22, p.104-110, 2001. HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3-22, 2000a.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v.53, p.47-58, 2000b.

INEU, R. P. **Atividade antioxidante do e-1,1-metiltioselenofenil- 2- pirrolidinona-hepteno: um composto orgânico de selênio com baixa toxicidade.** Santa Maria, 2007.97p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) - Universidade Federal de Santa Maria. INTERVET. Compedium of animal reproduction. 8ª ed.[S.I.], 2003.

JUNQUEIRA L.C. E CARNEIRO J. (2004) **Aparelho Reprodutor Masculino em Histologia Básica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 10ª edição.

KRAEMER M, FILLION C, MARTIN-PONT B, AUGER J. Factors influencing human sperm kinematic measuring by the celltrak computer-assisted sperm analysis system. **Hum Reprod**, v.13, p.611-619, 1998.

KRZYZOSIAK, J.; EVENSON, D.; PITT, C.; JOST, L.; MOLAN, P.; VISHWANATH, R. Changes in susceptibility of bovine sperm to in situ DNA denaturation, during prolonged incubation at ambient temperature under conditions of exposure to reactive oxygen species and nuclease inhibitor. **Reproduction Fertility Development**, v.12, p.251-261, 2000.

KRZYZOSIAK, J.; MOLAN, P.; MCGOWAN, L.; VISHWANATH, R. Effect of sperm number and oxygenation state of the storage media on in vitro fertility of bovine sperm stored at ambient temperature. **Theriogenology**, v.55, p.1401-1415, 2001.

MACK SO, WOLF DF, TASH JS. Quantitation of specific parameters of motility in large numbers of human sperm by digital image processing. **Biol Reprod**, v.38, p.270-281, 1988.

MAIA M.S. **Manual de inseminação artificial em caprinos e ovinos.** Natal: SEBRAE/RN, EMPARN, 1997. 52p.

_____. **Tecnologia do sêmen e inseminação artificial em caprinos e ovinos.** Marciane da Silva Maia; revisado por Maria de Fátima Pinto Barreto. Natal: EMPARN, 2010.

MARQUES C.C., BAPTISTA M.C., BARBAS J.P., PEREIRA R.M., VASQUES M.I., HORTA A.E.M. (2005). Efeito do fotoperíodo na maturação e fertilização in vitro de oócitos ovinos utilizando sêmen criopreservado. In: **Proceedings of the Veterinary Sciences Congress**, 3º congress of SPCV, pp 204.

MARQUES C.C., BARBAS J.P., BAPTISTA M.C., SERRA C.C., VASQUES M.I., PEREIRA R.M., CAVACO-GONÇALVES S., HORTA A.E.M. (2006). Reproduction in the ovine Saloia breed: seasonal and individual factors affecting fresh and frozen semen performance, in vivo and in vitro fertility. In **Animal Products from the Mediterranean Area. EAAP publications** N°. 119, 1º edition, pp: 331-336.

MAXWELL, W. M. C.; WELCH, G. R.; JOHNSON, L. A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction Fertility and Development**, v.8, p. 1165-1178, 1997.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, p. 327-344, 2002.

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

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

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. Porto Alegre: Sulina, 5ª ed., v.2, 1982. 783p.

_____. **Inseminação artificial**. 6a. ed., Porto Alegre: Sulina, p. 334,1987.

_____. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 3ª ed. Porto Alegre: Sulina, p. 337-344, 1975.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins: extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v57, p. 1695-1706, 2002.

MULLER, K.; POMORSKI, T.; MULLER, P.; ZACHOWSKI, A.; HERRMANN, A. Protein-dependent translocation of amino phospholipids and asymmetry transbilayer distribution of phospholipids in the plasma membrane of ram sperm cells. **Biochemistry**, v. 33 p. 9968-9974, 1994.

NEVES NETO, J. R.; MERCANTE, C. F. J.; ARRUDA R. P. de; VISINTIN, J. A. **Fertilidade do sêmen congelado equino em etilenoglicol e glicerol**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11, Belo Horizonte, 1995. Anais Belo Horizonte, 1995, p. 292.

OLIVEIRA, R.A. **Criopreservação de sêmen equino, um desafio a ser vencido**. PUBVET, Londrina, V. 7, N. 26, Ed. 249, Art. 1647, Suplemento 2, 2013.

PAPADOPOULOS S., HANRAHAN J.P., DONOVAN A., DUFFY P., BOLAND M.P., LONERGAN P. (2005). In vitro fertilization as a predictor of fertility from cervical insemination in sheep. **Theriogenology**, V: 63: 150-159.

PESCH S. E BERGMAN M. (2006). Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**, 37: 597-612.

SALAMON, S; MAXWELL, W. M. C. Frozen estorage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v. 38, p. 1-36, 1995.

SALAMON S. E MAXWELL W.M.C. (2000). Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, 62: 77-111.

SIMPLICIO, A.A., RIERA, G.S., NUNES, J.F. et al. Frequency and duration of estrous cycle and period in genetically non-descript (SRD) type of goats in the tropical northeast of Brazil. **Pesq. Agropec. Bras.** 21(5): 535-540, 1986.

SMITH, J. F.; MURRAY, G. R. Evaluation of different techniques for determination of membrane status in spermatozoa. Staining techniques in spermatozoa. **Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.**, v.57, p.246-250, 1997.

TAN, D. X., REITER, R. J., MANCHESTER, L. C., YAN, M. T., EL-SAWI, M., SAINZ, R. M., ET AL. (2002). Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad-spectrum antioxidant and free radical scavenger. **Curr Top Med Chem**, 2(2), 181-197.

VALLERIOTE P.S., DIAS A.J.B., CARVALHO P., SOBRINHO P.C. (2005). **Criopreservação de sêmen ovino em solução de trealose**. Acta Scientiae Veterinariae, 33: 310.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-1, p. 481-492, 2000.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the preservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility and Development**, v. 7, p. 871-91, 1995.

WATSON, P.F.; MARTIN, I.C.A. A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, n. 28, p.99-101, 1972.