

JACIARA CAMPOS DA SILVA

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO COM DIFERENTES  
CONCENTRAÇÕES ESPERMÁTICAS ASSOCIADO OU NÃO COM  
ÁCIDO ASCÓRBICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586c  
2013

Silva, Jaciara Campos da, 1972-  
Criopreservação de sêmen ovino com diferentes  
concentrações espermáticas associado ou não com ácido  
ascórbio. / Jaciara Campos da Silva. – Viçosa, MG,  
2013.  
xii, 52f. ; 29cm.

Orientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 41-52

1. Ovino - Reprodução. 2. Sêmen - Criopreservação.  
3. Ovino - Fecundidade. 4. Ovino - Gestação.  
5. Laparoscopia. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação  
em Zootecnia. II. Título.

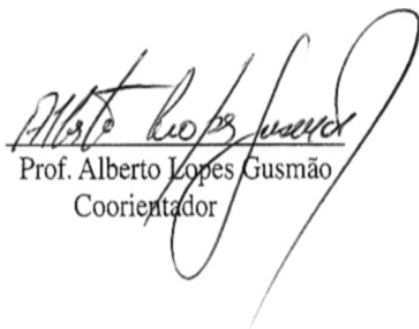
CDD 22. ed. 636.3082

JACIARA CAMPOS DA SILVA

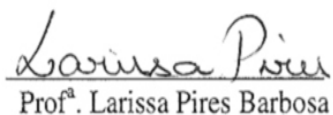
**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO COM DIFERENTES  
CONCENTRAÇÕES ESPERMÁTICAS ASSOCIADO OU NÃO COM ÁCIDO  
ASCÓRBICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Zootecnia para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

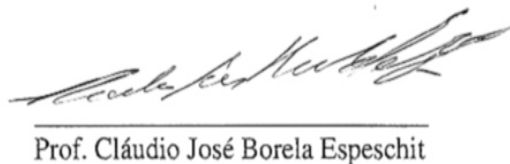
APROVADA: 27 de fevereiro de 2013.



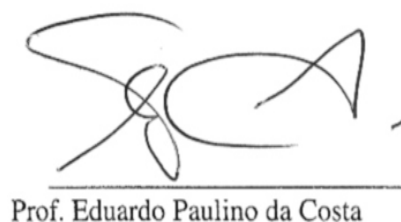
Prof. Alberto Lopes Gusmão  
Coorientador




Prof.<sup>a</sup> Larissa Pires Barbosa



Prof. Cláudio José Borela Espescht



Prof. Eduardo Paulino da Costa



Prof. Giovanni Ribeiro de Carvalho  
Orientador

*Ao meu querido filho Maurício,  
a luz da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Aos Professores, da Tia Yone aos Professores do Doutorado, que influenciaram toda a minha vida pessoal e profissional.

À minha família, por todo o crédito depositado em mim.

À minha mãe querida.

Ao meu Marido, que me apoiou em todos os momentos, principalmente nos trabalhos nas Fazendas.

Ao meu Filho Maurício, que na sua inocência nem sabia que me ajudava com seu lindo sorriso.

A Tânia, que cuidou da minha casa e do meu filho em todos os períodos de ausência.

À minha Filha e *personal* colega Cláudia Kazumi, e sua companheira Amarelinha.

Ao meu amigo Max Vitória Resende, grande profissional.

Aos meus amigos, que mesmo na ausência ou distância sempre estavam presentes!!!! (Parece impossível, mas quem tem amigos sabe do que estou falando).

Aos meus amigos que me ajudaram ativamente neste projeto: Vivi, Genésio, Hildonice, Rafael, Carmo, Thales e Jadson.

Aos proprietários Eduardo Teixeira e José Ranulfo, por abrirem as cancelas das suas Fazendas sem restrições para a elaboração dos trabalhos.

Aos ex-alunos e colegas de profissão Álvaro e Didiel, peças fundamentais para a condução deste trabalho nas Fazendas.

Aos funcionários das Fazendas, pela colaboração.

Ao Amigo e Secretário da Agricultura do Município de Andorinha Paulo Roberto, pelo apoio.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao IF Baiano e aos colegas de trabalho, pela oportunidade.

A Daniele Silva Matos, coordenadora do projeto DINTER e amiga, pelo empenho e pela grande paciência.

À UFV, por acreditar neste projeto.

Aos professores que participaram diretamente do programa DINTER, pelo sacrifício da longa viagem.

Aos colegas da turma, que precisam ser citados: Daniele, Pedro, Ellio, Harley, Osvaldo, João, Abdon, Cleidida, Evanete, Genilda, Alcione, Willams, Correia, Ancelmo, pelos grandes momentos juntos... Ah, temos o Binho também!!!!

Ao meu orientador Professor Giovanni Ribeiro de Carvalho.

Ao Professor Eduardo Paulino, pelas análises estatísticas.

Ao meu eterno Professor e Orientador Alberto Lopes Gusmão.

Aos Professores que participaram das correções para engrandecer essa obra.

A DEUS, por ter colocado todas essas pessoas e oportunidades na minha vida.

A todos que contribuíram,

**MUITO OBRIGADA!!!!!!!!!!!!!!!**

*Quando dois homens imaginam  
a mesma coisa, ainda assim  
cada um tem sua própria idEia.*

*Frege*

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS.....	xi
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1 Criopreservação do sêmen: limites e possibilidades.....	4
2.2 Concentração espermática e fertilidade .....	10
2.3 Criopreservação e estresse oxidativo .....	12
2.4 Avaliação da viabilidade do sêmen .....	20
2.5 Sincronização do ciclo estral e inseminação artificial em tempo fixo ...	21
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	27
3.1 Animais experimentais .....	27
3.2 Local e período experimental.....	28
3.3 Coletas e avaliações do sêmen pré-criopreservação .....	28
3.4 Diluição e criopreservação do sêmen.....	30
3.5 Descongelamento e avaliação do sêmen criopreservado .....	31
3.6 Sincronização do ciclo estral e inseminação artificial .....	31
3.7 Análise estatística .....	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5 CONCLUSÕES .....	40
REFERÊNCIAS .....	41

## RESUMO

SILVA, Jaciara Campos da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2013. **Criopreservação de sêmen ovino com diferentes concentrações espermáticas associado ou não com ácido ascórbico.** Orientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho. Coorientador: Alberto Lopes Gusmão.

Com o objetivo de maximizar a criopreservação de sêmen ovino mantendo sua capacidade fertilizante, três carneiros da raça Dorper, em idade reprodutiva e com excelentes características espermáticas, foram submetidos a coletas seminais periódicas e tiveram seu sêmen criopreservado, avaliando a concentração espermática e efeito de antioxidante. O diluidor utilizado foi o Tris-gema associado ou não a 0,5 mg/mL de ácido ascórbico como antioxidante. Após cada coleta, o sêmen foi distribuído em seis grupos experimentais: G1 (grupo controle) -  $80 \times 10^6$  espermatozoides sem antioxidante; G2 -  $40 \times 10^6$  sem antioxidante; G3 -  $20 \times 10^6$  sem antioxidante; G4 -  $80 \times 10^6$  espermatozoides com antioxidante; G5 -  $40 \times 10^6$  com antioxidante; e G6 -  $20 \times 10^6$  com antioxidante. Após as diluições, o sêmen foi resfriado a 5 °C e submetido a um tempo de equilíbrio de duas horas, sendo envasado em palhetas de 0,25 mL previamente identificadas e lacradas. As palhetas foram congeladas em vapor de nitrogênio líquido durante 15 minutos e depois submersas no nitrogênio, sendo em seguida armazenadas em botijão criogênico. O sêmen foi descongelado a 37 °C por 30 segundos e submetido aos testes *in vitro*: motilidade, vigor, morfologia espermática, integridade de membrana através da coloração eosina/nigrosina, teste hiposmótico e teste de termorresistência (TTR) a 37 °C, por três horas. Cento e oitenta ovelhas

mestiças tiveram estros induzidos e sincronizados com esponjas intravaginais impregnadas com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona por sete dias e com aplicação de 300 UI de eCG e 0,125 mg de cloprostenol 24 horas antes da retirada das esponjas. No oitavo dia de tratamento, as ovelhas receberam 300 UI de hCG. As inseminações ocorreram 55 horas após a retirada da progesterona, intra-uterinamente via laparoscopia. O diagnóstico de gestação, por ultrassonografia, foi realizado 40 dias após as inseminações. Na motilidade progressiva pós-descongelamento foi encontrada diferença ( $P < 0,05$ ) entre os grupos 4, com  $67,8 \pm 3,9$ , e o grupo 6, com  $62,9 \pm 3,6$ . As motilidades, na primeira hora do teste de termorresistência, diferenciaram ( $P < 0,05$ ) entre os grupos 1 e 4, apresentando médias e desvio-padrão de  $61,7 \pm 6,2$  e  $66,5 \pm 3,7$ , respectivamente, e entre os grupos 4 e 6, com valores na ordem de  $66,5 \pm 3,7$  e  $61,0 \pm 2,9$ , respectivamente. O vigor do sêmen no pós-descongelamento e no TTR não sofreu alteração ( $P > 0,05$ ) entre os grupos, assim como os testes de integridade de membrana. A redução da concentração espermática de 80 para 40 e 20 milhões de espermatozoides por dose inseminante não alterou ( $P > 0,05$ ) a fertilidade *in vivo*. Não foram observadas alterações significativas nos grupos suplementados com vitamina C ( $p > 0,05$ ). Conclui-se que a inclusão de 0,5 mg/mL de ácido ascórbico ao meio diluente não melhorou as características seminais nem a fertilidade do sêmen criopreservado, e a dose de 20 milhões de espermatozoides totais foi efetiva para uso em IATF por laparoscopia em ovelhas.

## ABSTRACT

SILVA, Jaciara Campos da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2013. **Cryopreservation of ram semen with different sperm concentrations with or without ascorbic acid.** Adviser: Giovanni Ribeiro de Carvalho. Co-Adviser: Alberto Lopes Gusmão.

Semen was collected at regular intervals from three Dorper rams in reproductive age and with excellent sperm characteristics in order to maximize ram semen cryopreservation while keeping their fertilizing ability. Their semen was cryopreserved in medium based on Tris-yolk with different sperm concentrations, supplemented or not with 2.5 mM vitamin C. Sperm concentration and antioxidant effect were evaluated. After each collection, the semen was diluted and analyzed with that medium, and then distributed along six experimental groups: G1 (control group) -  $80 \times 10^6$  spermatozoa without vitamin C; G2 -  $40 \times 10^6$  without vitamin C; G3 -  $20 \times 10^6$  without Vitamin C; G4 -  $80 \times 10^6$  spermatozoa with vitamin C; G5 -  $40 \times 10^6$  with vitamin C; G6 -  $20 \times 10^6$  with vitamin C. After dilutions, the semen was cooled to 5 °C, kept in a two-hour period of equilibrium, and then stored in previously identified and sealed 0.25 mL pellets. The pellets were frozen in liquid nitrogen vapor for 15 minutes, submerged in nitrogen, and then stored in cryogenic cylinder. The doses of semen in the groups were thawed at 37 °C for 30 seconds and subjected to *in vitro* tests: motility, vigor, morphology, membrane integrity by staining eosin/nigrosin, hypoosmotic test and thermoresistance test (TRT) at 37 °C for three hours. 180 crossbred ewes had their estrus induced and

synchronized pharmacologically, using intravaginal sponges impregnated with 60 mg of medroxyprogesterone acetate (Progespon<sup>®</sup>, Coopers, Brazil) for seven days and applying 300 UI eCG (Sincroecg<sup>®</sup>, Ourofino, Brazil) and 0.125 mg of cloprostenol (Ciosin<sup>®</sup>, Coopers, Brazil) 24 hours before sponge removal. On the eighth day of treatment, the sheep received 300 UI hCG (Vetecor<sup>®</sup>, Hertape Calier, Brazil). The intrauterine inseminations occurred by means of laparoscopy 55 hours after sponge removal. 40 days after the inseminations, ultrasound examinations were performed to attest to pregnancy. In post-thaw motility, there was a significant difference ( $p < 0.05$ ) between group 4 ( $67.8 \pm 3.9$ ) and group 6 ( $62.9 \pm 3.6$ ). Motilities in the first hour of the thermoresistance test differed statistically ( $p < 0.05$ ) between groups 1 and 4, with mean and standard deviation of  $61.7 \pm 6.2$  and  $66.5 \pm 3.7$ , respectively, and between groups 4 and 6 with values of the order of  $66.5 \pm 3.7$  and  $61.0 \pm 2.9$ , respectively. Semen vigor in post-thaw and TTR did not change significantly ( $p > 0.05$ ) among groups, and nor did the membrane integrity tests. The reduction in sperm concentration from 80 to 40 and 20 million spermatozoa per insemination dose did not significantly change ( $p > 0.05$ ) *in vivo* fertility. No significant changes were observed in the groups supplemented with vitamin C ( $p > .05$ ). It is concluded that the inclusion of 0.5 mg/ml ascorbic acid to the diluent medium did not improve either the characteristics or the fertility of the cryopreserved semen, and the dose of 20 million total spermatozoa was effective for use in laparoscopic FTAI in sheep.

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Grau centígrado
AGPI	Ácidos graxos poli-insaturados
BME	Solução de aminoácidos
BSA	Albumina sérica bovina
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	Fórmula molecular da vitamina C
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAT	Catalase
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CIDR	Controlled Internal Drug Release
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DINTER	Doutorado interinstitucional
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
FSH	Hormônio folículo estimulante
g	Gramas
Gpx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
hCG	Gonadotrofina coriônica humana

HOST	Teste hiposmótico
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFBaiano	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano
L	Litro
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormônio luteinizante
MAP	Acetato de medroxiprogesterona
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mOsm	Miliosmol
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NO <sub>2</sub>	Óxido nítrico
O <sub>2</sub>	Oxigênio
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
OH <sup>-</sup>	Hidroxila
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandina F 2 alfa
pH	Potencial hidrogeniônico
ROO <sup>-</sup>	Peroxil
ROS	Espécie reativa ao oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
Spz	Espermatozoide
TEMPO	Análogo sintético da enzima SOD
TES	Tris hidroxí-aminoetano
TRIS	Tris hidroximetil-aminometano
TTR	Teste de termorresistência
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UI	Unidade internacional
μL	Microlitro
μM	Micromolar

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil conta com um efetivo de aproximadamente 17,6 milhões de cabeças ovinas, distribuídas por todo o território nacional (IBGE, 2010). O aumento da demanda pelo consumo da carne ovina no Brasil, aliado à baixa oferta nacional, vem estimulando o desenvolvimento e fortalecimento da ovinocultura brasileira e incentivando um grande número de pesquisadores a desenvolver e adaptar às nossas condições de criação técnicas que possibilitem um incremento na produtividade (GARCIA et al., 2000; BARROS et al., 2003; BARROS et al., 2005; VIANA; SILVEIRA, 2009).

Ao longo das últimas décadas, a produção de ovinos apresentou grandes modificações nos diversos elos de sua cadeia produtiva, devido a uma expansão dos mercados interno e externo. Explorados tradicionalmente de forma extensiva, os ovinos têm aumentado substancialmente seu contingente populacional e sua qualidade genética, sendo submetidos a um racional manejo sanitário, nutricional e reprodutivo, visando ao aumento na produtividade do rebanho. Nesse contexto, as biotécnicas aplicadas à reprodução vêm sendo utilizadas com bastante êxito pelos criadores.

A criopreservação de sêmen dos animais domésticos contribuiu para a expansão das biotécnicas, como a inseminação artificial (IA) e a fertilização *in vitro*. É uma importante técnica reprodutiva, tendo em vista que promove a conservação do germoplasma masculino por tempo indeterminado. A inseminação artificial com sêmen criopreservado representa um mecanismo eficiente para promoção e difusão de material genético de excelente qualidade (HOLT, 2000a).

Apesar de a criopreservação de sêmen e a IA estarem consolidadas na espécie bovina, em ovinos, caprinos, suínos e equinos existem dificuldades técnicas, econômicas e socioculturais que dificultam a utilização dessas técnicas em larga escala. Além da boa qualidade do sêmen criopreservado, o sucesso da inseminação depende também dos fatores relacionados às fêmeas e à IA propriamente dita (COTTORIELLO; HENRY, 2002; VISHWANATH, 2003).

A inseminação artificial com sêmen criopreservado é fundamental em qualquer programa de melhoramento genético. Para isso, é essencial estar relacionada a altas taxas de gestação, que podem ser limitadas pela técnica ou pela capacidade reprodutiva dos animais. Nas ovelhas, as reduzidas taxas de gestação após a IA vaginal ou cervical com sêmen criopreservado são muito baixas para um programa de acasalamento, sendo então recomendada a inseminação laparoscópica, que permite a deposição do sêmen no interior do útero, alcançando taxas de prenhez de 60 a 80% (LUZ et al., 2000).

O Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) estabelece que uma dose inseminante mínima deve conter 40 milhões de espermatozoides viáveis (HENRY, NEVES, 1998). Contudo, por ser o sêmen depositado intrauterinamente, na técnica de inseminação laparoscópica em ovelhas, essa dose poderia ser menos concentrada, o que aumentaria a produtividade de doses congeladas por ejaculado processado (D'ALESSANDRO et al., 2001).

A concentração espermática da dose inseminante está relacionada como um dos fatores que interferem na fertilidade do sêmen congelado. Mann (1964 *apud* LEAHY et al., 2010) descreve o efeito diluição com a perda de motilidade e viabilidade quando os espermatozoides são altamente diluídos. Diluição excessiva tem sido reportada como causa de desestabilização de membrana devido à remoção de fatores protetores do plasma seminal, como agentes antioxidantes, interferindo na fertilidade pós inseminação.

Nos últimos anos, estudos realizados em diversas espécies de animais domésticos têm mostrado que espécies reativas ao oxigênio (ROS) são produzidas durante o processo de congelamento/descongelamento, o que submete as células espermáticas a danos oxidativos, afetando negativamente o metabolismo energético das células e a motilidade, viabilidade e integridade do DNA (SILVA MAIA et al., 2009). Os sistemas de defesa antioxidantes do espermatozoide e do plasma seminal desempenham papel importante na viabilidade espermática. Quando o sêmen é lavado ou simplesmente diluído para a criopreservação, ele reduz naturalmente suas defesas

antioxidativas (CÂMARA; GUERRA, 2011). Por outro lado, o metabolismo dos espermatozoides, em doses de sêmen com altas concentrações espermáticas, gera grande quantidade de ROS. Todos esses fatores levam a estresse oxidativo e injúrias das células espermáticas (SOARES; GUERRA, 2009; LEAHY et al., 2010). Assim, a adição de agentes antioxidantes, como o ácido ascórbico, em meios para criopreservação, pode melhorar a fertilidade do sêmen criopreservado.

Este estudo teve como objetivo avaliar a fertilidade *in vitro* e *in vivo* do sêmen ovino criopreservado com diferentes concentrações espermáticas e na presença do ácido ascórbico como agente antioxidante.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Criopreservação do sêmen: limites e possibilidades**

Pesquisas têm sido realizadas ao longo dos anos (MILLER; HUNTER; 1986; VALCÁRCEL et al., 1996; MARTINS et al., 2003) em busca de melhor qualidade do sêmen ovino criopreservado, objetivando aumento nas taxas de gestação e nascimento. Esses estudos vão desde o pleno conhecimento e entendimento da célula espermática e seu funcionamento, até técnicas para maximizar a eficiência nos protocolos de criopreservação mantendo a fertilidade dessa célula.

A inseminação artificial (IA) é uma das técnicas mais simples e de baixo custo empregadas na reprodução animal, a qual apresenta maior relevância no melhoramento genético. Este se dá no momento de seleção dos reprodutores de alto valor zootécnico para a criopreservação do material fecundante e na seleção do rebanho a ser inseminado. A IA dissemina o sêmen de reprodutores selecionados de maneira rápida e eficiente, incrementando o número de crias por macho/ano (VISHWANATH, 2003).

Na maioria das espécies de mamíferos, à exceção do touro, a fertilidade do sêmen em programas de IA é reduzida pelo processo de criopreservação. Essa redução de fertilidade do sêmen criopreservado é atribuída a alterações na estrutura da membrana e na função do espermatozoide, que ocorrem durante o resfriamento, congelamento e descongelamento. A criopreservação do sêmen é um processo complexo, em que é importante atentar para diversos fatores a fim de obter resultados satisfatórios. Entre esses fatores, destacam-se a qualidade inicial da amostra

seminal coletada, a diluição submetida, concentração e diluente, a técnica de criopreservação (resfriamento, tempo de equilíbrio, crioprotetor utilizado e momento de descongelamento da amostra de sêmen) (WATSON, 2000).

Os espermatozoides são células alongadas haploides, altamente especializadas, possuidoras de núcleo com cromatina bastante condensada, citoplasma escasso, uma cauda responsável pela motilidade celular e completamente envolta por uma membrana plasmática. A porção anterior do núcleo é coberta por uma dupla parede, denominada capa acrossomal, que contém enzimas hidrolíticas necessárias para viabilizar o processo de fertilização, com fusão das membranas plasmáticas e acrossomal externa, juntamente com fusão da porção anterior da região pós-acrossomal à membrana oocitária (GARNER; HAFEZ, 2004; BARBAS; MASCARENHAS, 2007; AISEN; VENTURINO, 2008; BARROS, 2010).

As propriedades da membrana espermática são determinadas pela sua composição celular, formada por uma dupla camada fosfolipídica, entremeada por proteínas ancoradas por ligações específicas. Esse componente espermático sofre constante remodelação devido a mudanças nas quantidades relativas de fosfolipídios, reposicionamento de proteínas durante a maturação epididimária e capacitação espermática, além da troca de proteínas com o plasma seminal. Por isso, a membrana plasmática é extremamente importante para a manutenção do balanço iônico celular. Lesões nessa estrutura podem resultar em morte do espermatozoide (HOLT, 2000b; GARNER; HAFEZ, 2004; BARBAS; MASCARENHAS, 2007; CASTELO et al., 2008).

As técnicas de preservação do sêmen podem promover graves alterações na membrana plasmática do espermatozoide. Condições adversas, como o resfriamento, alteram a orientação dos lipídios, afetando a estabilidade da membrana ou induzindo a um diferenciado rearranjo das moléculas, formando pontos de fragilidade, o que ocasionará uma permeabilidade excessiva ou mesmo a ruptura da membrana, comprometendo sua funcionalidade (ALVES, 2006). A mudança na temperatura durante a criopreservação promove diversas alterações na fisiologia espermática, principalmente a abertura dos canais de cálcio, formação de cristais de gelo, injúrias oxidativas, alterações na membrana do espermatozoide, lesões no DNA e estresse osmótico (SILVA MAIA et al., 2008).

Durante o período de resfriamento dos espermatozoides, da temperatura corporal até 4 °C ou 5 °C, podem ocorrer perdas irreversíveis na viabilidade espermática, com

rápida diminuição da motilidade ou surgimento de motilidade circular ou retrógrada, caracterizada pelo choque térmico (COTTORIELLO; HENRY, 2002; LEITE et al., 2011). Nessa fase, há também redução da taxa de glicólise, da respiração celular e da frutólise, aumento dos danos ao DNA e liberação de material intracelular. Essa fase de transição caracteriza-se pela passagem da membrana plasmática do estado líquido para o estado cristalino, ou gel, sendo o período crítico nos processos de criopreservação (WATSON, 2000; BORGES et al., 2011).

A sensibilidade ao choque térmico varia de acordo com a espécie e com a quantidade e composição do plasma seminal, podendo ser determinada pelo conteúdo de colesterol da membrana, grau de saturação dos ácidos graxos, tipo de fosfolípido e quantidade de proteína presente na membrana (BORGES et al., 2011).

Espermatozoides de espécies que possuem alta relação colesterol/fosfolípidios na membrana, a exemplo dos coelhos (0,88) e do homem (0,99), são mais resistentes ao choque térmico quando comparadas com o touro (0,45), o garanhão (0,36), o carneiro e o bode (0,3), sendo a espécie suína mais sensível ao choque térmico, com relação colesterol/fosfolípido de 0,26 (BICUDO et al., 2007; AISEN, 2008). Fisiologicamente, uma proporção de colesterol adequada fluidifica a membrana e não permite a separação lateral das cadeias de ácidos graxos saturados (AISEN, 2008).

Outro aspecto a ser considerado na congelabilidade das células espermáticas é a presença, quantidade e composição do plasma seminal nas diferentes espécies (HOLT, 2000b; LEBOEUF et al., 2000; OHATA et al., 2001; PURDY, 2006; CORDOVA-IZQUIERDO et al., 2007; BARRETO et al., 2008; CATELO et al., 2008; TILBURG et al., 2008; JOBIM et al., 2009; LEITE et al., 2011; GUAISTI et al., 2012; RONDON et al., 2012). O plasma seminal é um composto de açúcares, lipídios, minerais, proteínas, incluindo enzimas, hormônios, imunossupressores, substâncias ligadas a andrógenos, imunoglobulinas, onde a presença ou a ausência de muitos desses constituintes pode afetar a fertilidade (NUNES, 2002; CATUNDA, 2007). A constituição do plasma afeta a composição das membranas e varia entre espécies, entre indivíduos, intervalo entre as ejaculações e saúde do animal; exerce várias funções sobre o metabolismo espermático e o processo de fecundação, como ativação da motilidade espermática, ação antimicrobiana, neutralização dos metabólitos espermáticos, e contém fatores decapacitantes (MAXWELL; JOHNSON, 1999; GUAISTI et al., 2012).

A resposta à criopreservação de diferentes animais caracteriza reprodutores de boa e má congelabilidade espermática; isso se deve à grande variabilidade na composição da membrana plasmática e do plasma seminal de diferentes indivíduos (BARBAS; MASCARENHAS, 2008; GUASTI et al., 2012).

Uma das funções do plasma seminal é o seu poder decapitante e de estabilização do acrossoma, sendo necessária a sua perda no momento de ascensão do ejaculado através do trato reprodutivo feminino para, enfim, o espermatozoide ser capaz de fertilizar o oócito. Quando no processamento do sêmen, o ejaculado é diluído para posterior resfriamento e congelamento, ocorre desestabilização da membrana plasmática, o que abre os canais de cálcio e inicia o processo de capacitação, habilitando o sêmen à fertilização (MAXWELL; JOHNSON, 1999).

*In vitro*, a remoção do plasma seminal por centrifugação ou migração espontânea é uma condição para o processo de capacitação. Contudo, a capacitação pode ser impedida, ressuspendendo o espermatozoide no plasma seminal ou nos diluentes de sêmen. Dessa maneira, este se torna decapitado e requer tempo adicional para capacitação antes de reaver sua fertilidade (MAXWELL; JOHNSON, 1999).

Os meios diluentes são constituídos de substâncias que permitem a preservação da membrana plasmática, mediante a estabilização do pH do meio, neutralização de produtos tóxicos produzidos pelos espermatozoides e proteção contra o choque térmico. Além disso, possibilitam a manutenção do equilíbrio eletrolítico e osmótico, inibição do crescimento bacteriano e fornecimento de energia (FÜRST, 2006). Alguns autores indicam a suplementação dos meios com fatores antioxidantes como algumas enzimas, proteínas, minerais ou vitaminas (BICUDO et al., 2007; CÓRDOVA-IZQUIERDO et al., 2007; SILVA MAIA et al., 2009; FILHO, 2010; BORGES et al., 2011; LUZ et al., 2011; RONDON et al., 2012; TONIOLLI, 2012).

Com o intuito de reduzir os danos causados aos espermatozoides e preservar sua fertilidade durante o processo de criopreservação, diversas substâncias e suas concentrações foram estudadas e mostraram-se úteis como crioprotetores. Essas substâncias são capazes de promover a sobrevivência celular durante o resfriamento, congelamento e descongelamento, apesar de o seu mecanismo de ação na criopreservação ainda não estar completamente elucidado. Os crioprotetores podem ser classificados de acordo com sua permeabilidade à membrana celular em: não penetrantes – macromoléculas, como as proteínas presentes no leite e na gema do ovo, e sacarose, lactose, manose, rafinose, trealose, entre outros; e penetrantes – pequenas

moléculas que atravessam a membrana dos espermatozoides e atuam no meio intra e extracelular – glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), propanodiol, acetamidas e outras amidas (COTTARELLO; HENRY, 2002; FÜRST, 2006).

Macromoléculas como a caseína do leite, as proteínas da gema de ovo e o glicerol são, hoje, os crioprotetores mais utilizados nos diluentes de sêmen dos ovinos (CASTELO et al., 2008; VALENTE et al., 2010). A gema de ovo protege contra o choque térmico causado pelo frio, conferindo proteção à membrana celular, além de possibilitar uma motilidade pós-descongelamento significativamente alta (MOUSSA et al., 2002; ABOAGLA; TERADA, 2004) e diminuir as trocas metabólicas que interferem negativamente na motilidade (AHMAD et al., 2008).

O mecanismo de crioproteção das macromoléculas presentes na gema de ovo e no leite ainda não está bem elucidado, mas acredita-se que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) sejam responsáveis pela proteção do espermatozoide frente aos danos causados pela criopreservação (SINGH et al., 2007; CARVALHO et al., 2008). Em estudo desenvolvido por Moussa et al. (2002), foi sugerido que a LDL forma um filme protetor sobre a membrana do espermatozoide, protegendo-o dos cristais de gelo formados durante o processo de criopreservação.

Após a descoberta das propriedades protetoras do glicerol, várias substâncias foram estudadas, porém ele permaneceu sendo o crioprotetor de eleição para os espermatozoides na maioria das espécies (CURRY, 2000). Esse componente dos meios diluentes, durante a criopreservação, diminui a concentração de sais no interior do espermatozoide, auxiliando na estabilização da membrana plasmática, pois essa alta concentração é nociva à membrana (MORAES et al., 1998; HOLT, 2000a).

O glicerol não apresenta apenas efeito protetor sobre as células. Ele também é citotóxico para o espermatozoide, dependendo da sua concentração, podendo causar mudanças na estrutura e alterar a estabilidade e permeabilidade da membrana celular (HOLT, 2000a).

O TRIS (Tris-hidroximetil-aminometano) é o principal componente básico dos diluentes de sêmen dos pequenos ruminantes utilizados rotineiramente. Ele é uma substância solúvel em água e atua como tampão iônico em pH 7 e 9, mantendo o equilíbrio ácido-básico nos meios diluentes (CASTELO et al., 2008).

Os açúcares (glicose, frutose, lactose, sacarose, rafinose, trealose e dextrose) têm como papel principal propiciar nutrientes como fontes de energia para o metabolismo dos espermatozoides (HAFEZ, 2004). Normalmente há maior efeito crioprotetor quando

os monossacarídeos, como a glicose, frutose e manose, são combinados ao TRIS, em relação aos dissacarídeos (BARBAS; MASCARENHAS, 2007).

Os carboidratos também apresentam outra função quando adicionados ao diluente. A lactose, sacarose, rafinose, trealose e dextrose não são capazes de penetrar na membrana plasmática. Esses açúcares interagem com os fosfolípidos da membrana, aumentando a tolerância às crioinjúrias, e criam uma pressão osmótica que induz a desidratação da célula e uma baixa incidência da formação de cristais de gelo intracelular (AISEN et al., 2000).

Quanto ao momento da criopreservação propriamente dita, existe relação estreita entre a velocidade de congelamento e o aparecimento de lesões celulares. À medida que a velocidade de congelamento aumenta, o índice de sobrevivência celular também aumenta após o descongelamento, até um ponto ótimo, em que a sobrevivência espermática é máxima. A partir desse ponto, com o aumento da velocidade de congelamento, a perda celular torna-se grande devido à formação de cristais de gelo no interior das células, promovendo lesões mecânicas à microestrutura das membranas e organelas (OHASHI, 2002; LUZ et al., 2011).

Outro fator a ser observado é o chamado efeito solução; quando a velocidade de congelamento é lenta, abaixo do ponto ótimo, ocorre o congelamento da água extracelular, com a consequente concentração de soluto, colocando a célula momentaneamente em um meio hipertônico; isso faz com que a célula perca água rapidamente, o que leva à desidratação celular e ao aumento na concentração do soluto intracelular, levando ao choque osmótico (OHASHI, 2002; LUZ et al., 2011).

Segundo Salamon e Maxwell (1995), os danos à membrana do espermatozoide ocorrem principalmente durante o processo de congelamento e descongelamento, entre as temperaturas de  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e não durante o armazenamento em nitrogênio líquido. No caso do espermatozoide ovino, esses danos ocorrem sobretudo entre  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , especificamente em razão da formação dos cristais de gelo.

Observando esse efeito dos dois fatores, visando minimizar a formação de cristais de gelo e o estresse osmótico nas células, várias curvas de resfriamento e congelamento são propostas para melhor equilíbrio e viabilidade espermática após congelamento/descongelamento, de acordo com a espécie: bovina (LEITE et al., 2011), caprina (NUNES, 2002; BITTENCOURT et al., 2006), ovina (BAG et al., 2002), equina (FÜRST, 2006; AURICH, 2008), suína (OHATA et al., 2001; ANTUNES, 2007;

VALENÇA; GUERRA, 2007), canina (SILVA et al., 2002) e bubalina (DHAMI et al., 1996; OHASHI, 2002).

## **2.2 Concentração espermática e fertilidade**

Os processos de congelamento e descongelamento causam diminuição do número de espermatozoides viáveis por dose inseminante (BAILEY et al., 2000; BORGES et al., 2011). Segundo Watson (2000), 40 a 50% dos espermatozoides não sobrevivem aos protocolos de criopreservação, o que reduz a fertilidade nos programas de IA. Na espécie bovina, poucas células espermáticas, cerca de 20 milhões, são necessárias para alcançar níveis aceitáveis de fertilização pós-inseminação, mas em outras espécies dos animais domésticos essa concentração compromete a eficiência dos procedimentos (BAILEY et al., 2000; HOLT, 2000b; WATSON, 2000; LYLE; FERRER, 2005).

O número total de espermatozoides contidos em uma dose de sêmen para efetuar inseminações é um dos fatores que afetam a fertilidade em programas de sincronização e IA em pequenos ruminantes. A utilização da técnica de inseminação laparoscópica intrauterina com sêmen criopreservado permite a redução da dose espermática usual de 100 milhões para 5 a 20 milhões de espermatozoides móveis (LEBOUEF et al., 2000). Contudo, uma concentração espermática excessivamente baixa conduzirá a problemas nas taxas de prenhez pós-inseminação. Salomon e Maxwell (2000) recomendam concentração mínima de um milhão de células espermáticas com motilidade para manter níveis aceitáveis de prenhez com inseminação artificial intrauterina em ovelhas com estro sincronizado e utilizando sêmen criopreservado.

Altas taxas de diluição, como as que ocorrem durante o processamento do sêmen para a produção de doses sexadas, podem reduzir a motilidade e viabilidade seminal. A carência do plasma seminal nas amostras irá provocar a desestabilização das membranas, dando início à capacitação espermática, que irá promover a prematura morte celular, se o local de deposição do sêmen na IA for distante do sítio de fertilização. Esse efeito de diluição pode ser minimizado quando se utilizam meios diluentes isotônicos com adequadas concentrações de sais, energia e soluções-tampão (MAXWELL; JOHNSON, 1999).

Por outro lado, uma elevada concentração espermática determina intensa atividade metabólica, com rápido acúmulo de catabólitos extremamente prejudiciais à

célula espermática. A diminuição da concentração, até certos limites, resultaria numa maior proporção diluente/espermatozoide, o que significa maior proteção celular. Elevadas diluições, porém, não levam a uma congelabilidade adequada. Um parâmetro de eficiência a ser considerado na criopreservação do sêmen é o número mínimo de espermatozoides móveis que deverá conter a dose inseminante, tornando muito mais efetivo o aproveitamento do ejaculado (CASTELO et al., 2008).

O Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) estabelece que uma dose inseminante deve conter um mínimo de 40 milhões de espermatozoides viáveis (HENRY; NEVES, 1998). Entretanto, por ser o sêmen depositado intrauterinamente, na técnica de inseminação laparoscópica em ovelhas, essa dose pode ser reduzida, o que aumentaria o número de doses congeladas por ejaculado (D'ALESSANDRO et al., 2001).

D'Alessandro et al. (2001) criopreservaram sêmen ovino em diferentes concentrações espermáticas e avaliaram a fertilidade *in vivo* e após os nascimentos dos cordeiros derivados de um programa de IA laparoscópica. Doses com altíssimas concentrações de células espermáticas (200 milhões de espermatozoides/0,25 mL) afetaram negativamente a fertilidade *in vitro* do sêmen, e as concentrações de 20, 40 e 80 espermatozoides/dose não diferiram estatisticamente nas taxas de prenhez.

Byrne et al. (2000) inseminaram laparoscopicamente e transcervicalmente ovelhas superovuladas com sêmen criopreservado em doses de 200 milhões de espermatozoides. As taxas de coleta de embriões foram de 81 e de 39%, respectivamente, sendo alta a quantidade de estruturas não fertilizadas nas ovelhas inseminadas pela via cervical.

Fukui et al. (2007), utilizando sêmen criopreservado na concentração de 100 milhões de espermatozoides em 0,25 mL, inseminaram ovelhas com estro sincronizado com inseminações artificial em tempo fixo (IATF), obtiveram 66% de prenhez para aquelas inseminadas intrauterinamente, via laparoscopia, e fertilidade variando de 10 a 30% para as fêmeas inseminadas transcervicalmente.

Trabalhando com sêmen criopreservado na concentração de 50 milhões de espermatozoides por dose, Luz et al. (2000) inseminaram laparoscopicamente 297 ovelhas Corridale que tiveram seu estro sincronizado para realização de IATF, e alcançaram índices de 60 a 80% de prenhez com sêmen apresentando diferentes características espermáticas ao TTR, motilidade progressiva pós descongelamento e morfologia espermática.

Atualmente, existe grande interesse na redução da quantidade de espermatozoides por dose inseminante para utilização em programas de IA com manutenção de índices de prenhez aceitáveis, aumentando a quantidade de doses criopreservadas por ejaculado e para o uso de sêmen sexado (BALLESTER et al., 2007; BEILBY et al., 2009; LEAHY et al., 2010; BEILBY et AL., 2010).

De acordo com Ballester et al. (2007), a inseminação em vacas alcança índices acima de 50% quando se utiliza sêmen criopreservado em palhetas de 0,25 mL, com concentrações de 15 milhões de espermatozoides. Esses autores então fizeram ensaios de fertilidade para comparação entre o grupo controle, com concentração espermática de 15 milhões e o grupo-teste, com concentração de dois milhões de espermatozoides por palheta de 0,25 mL. Encontraram índices de fertilidade na ordem de 47 e 43%, respectivamente, não observando diferenças significativas entre os grupos.

Objetivando maximizar a técnica de sexagem de espermatozoides, Beilby et al. (2009) inseminaram laparoscopicamente 732 ovelhas Merino, que tiveram o estro sincronizado farmacologicamente. Utilizaram para isso sêmen sexado e não sexado nas concentrações de um milhão ou 15 milhões de espermatozoides móveis por dose inseminante e estabeleceram a dose mínima de um milhão de espermatozoides móveis e sexados para programas de IA laparoscópica.

### **2.3 Criopreservação e estresse oxidativo**

A utilização do metabolismo oxidativo como principal fonte de energia para os espermatozoides é capaz de gerar biometabólitos ativos do oxigênio, chamados de espécies reativas ao oxigênio (ROS). A respiração mitocondrial gera ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil e o óxido nítrico. Esses radicais e moléculas muito reativos podem alterar a estrutura do DNA, proteínas e lipídios da membrana (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; AGARWAL et al., 2005).

O ânion superóxido ( $O_2^-$ ) é um radical livre formado a partir da redução do  $O_2$ . Sua formação ocorre espontaneamente, sobretudo em ambiente aeróbio, rico em elétrons e próximo da membrana mitocondrial através da cadeia respiratória. É um radical pouco reativo e não tem a habilidade de penetrar em membranas lipídicas, agindo apenas no compartimento em que é produzido (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; CASTRO, 2010).

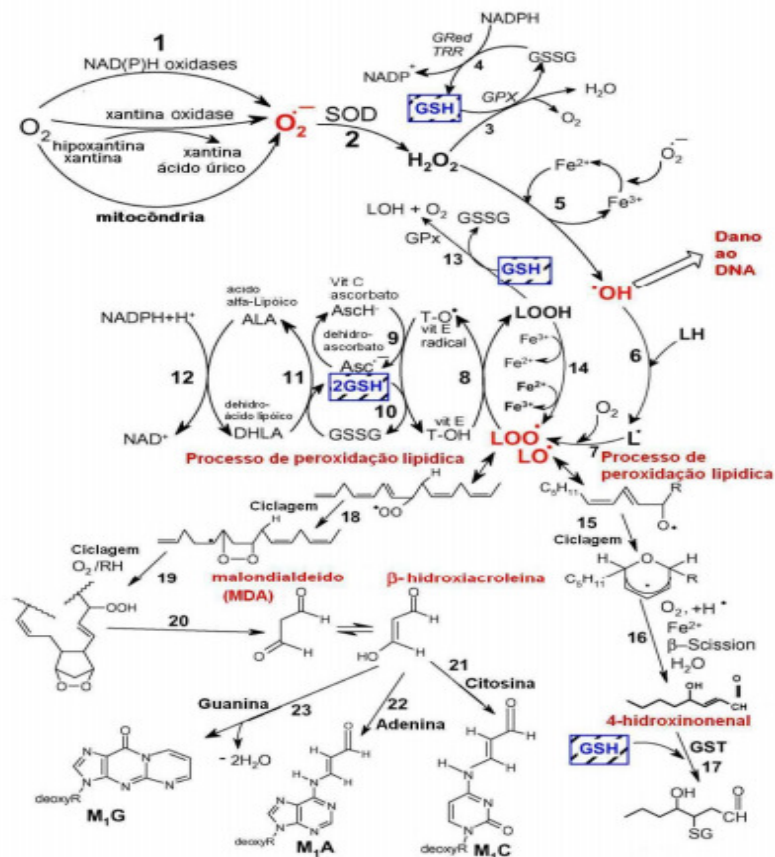
Apesar de não ser um radical livre, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) tem vida longa e é capaz de atravessar as camadas lipídicas das membranas, sendo extremamente danoso às células espermáticas. Age como intermediário na formação de ROS, produzindo o radical mais reativo dos sistemas biológicos, o radical hidroxila ( $OH\cdot$ ) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; CASTRO, 2010).

O radical hidroxila, considerado o mais reativo em sistemas biológicos, é formado a partir do peróxido de hidrogênio, em uma reação catalisada por íons metais ( $Fe^{+2}$  ou  $Cu^{+2}$ ) denominada de reação de Fenton. Essa reação produz  $OH\cdot$  e uma molécula de  $Fe^{+3}$  (CASTRO, 2010).

O óxido nítrico ( $NO_2$ ) é semelhante ao ânion superóxido, pois não reage diretamente com a maioria das moléculas biológicas, apesar de seu elétron desapareado. Contudo, reage facilmente com outros radicais livres, gerando radicais menos reativos. Se produzido em grande quantidade, juntamente com o ânion superóxido, reage produzindo peroxinitrito, que é um radical citotóxico (CASTRO, 2010).

Existem duas fontes de produção de ROS (Figura 1) no sêmen: a partir dos espermatozoides e dos leucócitos presentes no ejaculado. Este último se apresenta como fator potencial na produção de radicais livres, sendo até 100 vezes mais reativo que os espermatozoides, tornando o reprodutor com capacidade fecundante reduzida ou chegando à infertilidade (AGARWAL et al., 2005). Estudos também apontam espermatozoides morfológicamente anormais e imaturos, possuidores de gota protoplasmática proximal e distal, como maiores geradores de ROS que células íntegras (AGARWAL et al., 2005; ALVAREZ; MORAES, 2006; BARBOSA, 2009; CASTRO, 2010).

O processo de produção dessas espécies é iniciado quando os elétrons vazam da cadeia transportadora de elétrons e reduzem o oxigênio molecular, originando o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), que é prontamente dismutado pela enzima superóxido dismutase (SOD) a  $H_2O_2$ , o qual por sua vez é transformado em água pela enzima catalase (CAT) ou pela glutatona peroxidase (Gpx). No entanto, alguns metais, como ferro e cobre, também podem reagir com o  $H_2O_2$ , pela reação de Fenton, e formar um radical de maior poder oxidante – a hiroxila ( $OH\cdot$ ). Esse mesmo radical pode atacar um hidroperóxido de membrana, iniciando a cascata de peroxidação lipídica, propagada pelo radical peroxil ( $ROO\cdot$ ), que também pode atacar o DNA, causando mutações (VALKO et al., 2007; SORDILLO; AITKEN, 2009).



**Figura 1** - Vias de formação de ROS, vias enzimáticas de eliminação de ROS, processo de peroxidação lipídica papel da glutathione (GSH) e outros antioxidantes (vitamina E, vitamina C, ácido lipoico) no gerenciamento do estresse oxidativo (VALKO et al., 2007).

Todas as células possuem mecanismos enzimáticos e não enzimáticos com a finalidade de manter um nível celular adequadamente baixo de ROS, evitando assim injúrias, apesar de ser sugerido por alguns autores a necessidade de certa quantidade de  $O_2^{\cdot-}$  durante o processo de capacitação espermática, hiperativação e reação acrossômica dos espermatozoides (LAMIRANDE et al., 1997; AGARWAL et al., 2005; SOARES; GUERRA, 2009). O sêmen possui um sistema de defesa intracelular, tendo como principais enzimas protetoras: superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione redutase, e antioxidantes não enzimáticos, como a vitamina C e a vitamina E. Já no plasma seminal, extracelularmente, o espermatozoide é protegido pelo ácido ascórbico, ácido úrico, albumina e outras proteínas, catalase, glutathione e outros tiois, taurina, hipotaurina e vitamina E (ALVAREZ; MORAES, 2006; BICUDO et al., 2007; GUERRA et al. 2012).

Em situações em que há desequilíbrio na concentração de ROS, pelo aumento da produção desses reativos ou pela diminuição dos sistemas de ação das substâncias

antioxidantes, a célula entra em estresse oxidativo, resultando em problemas na sua funcionalidade. Quando essa condição ocorre na célula espermática, acentuada redução na fertilidade é observada (AGARWAL et al., 2005; CÂMARA; GUERRA, 2011).

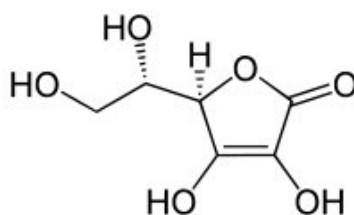
A membrana plasmática do espermatozoide do carneiro é rica em ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) e tem menor quantidade de ácidos graxos saturados e colesterol que outras espécies; esse alto conteúdo de AGPI dá a fluidez necessária para que o espermatozoide participe dos eventos de fusão de membranas na fertilização, mas também apresenta-se como alvo principal da lipoperoxidação induzida pelas ROS. A peroxidação desses lipídios vai acarretar alterações na estrutura e na permeabilidade da membrana, levando à perda da seletividade iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos, causando disfunção espermática, com redução/perda da motilidade, danos à morfologia espermática e morte celular (BICUDO et al., 2007; AISEN; VENTURINO, 2008; SOARES; GUERRA, 2009).

Durante o processo de criopreservação, a célula espermática sofre lesões de acrossoma, que diminuem a sua viabilidade, devido à manipulação e exposição ao oxigênio que podem aumentar a exposição às ROS; o processo de congelamento seminal pode elevar em até cinco vezes a produção de ROS. Os sistemas de defesa antioxidantes do espermatozoide e do plasma seminal desempenham papel importante na viabilidade espermática. Quando o sêmen é lavado ou simplesmente diluído para a criopreservação, sua defesa antioxidativa reduz naturalmente (CÂMARA; GUERRA, 2011). Outro fator agravante é o metabolismo dos espermatozoides, que, em doses de sêmen com altas concentrações espermáticas, gera uma grande quantidade de ROS. Todos esses fatores levam ao estresse oxidativo e injúrias das células espermáticas (SOARES; GUERRA, 2009; LEAHY et al., 2010).

Em virtude da conhecida ação das ROS sobre a célula espermática e da necessidade de se incrementar a viabilidade espermática *in vivo* e *in vitro* pós-congelamento/descongelamento do sêmen ovino, faz-se necessária a identificação de antioxidantes que possam ser utilizados na suplementação dos meios para a criopreservação espermática, entre eles: superóxido dismutase, catalase, glutathione, vitamina E, vitamina C, quercetina, resveratrol, coenzima Q, ácido lipoico, taurina, hipotaurina, cisteína (GARCEZ et al., 2010; GUERRA et al., 2012).

O ácido ascórbico ou vitamina C ( $C_6H_6O_6$ ) é comumente encontrado no organismo na sua forma reduzida de ascorbato. Além de outras importantes funções metabólicas, essa vitamina reduz peróxidos e superóxidos e age também prevenindo a

formação de peróxidos de lipídios nas lipoproteínas plasmáticas, protegendo a célula dos danos oxidativos. Por outro lado, o ascorbato, quando em doses elevadas ou na presença de metais como ferro ou cobre, pode atuar como pro-oxidante, em virtude do estímulo à produção de  $H_2O_2$  e  $OH^\cdot$ , levando à lipoperoxidação. *In vitro*, a mistura Cu-ascorbato ou Fe-ascorbato estimulam os danos oxidativos, levando à formação de radicais livres, os quais danificam o DNA, lipídios e proteínas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; ALVAREZ; MORAES, 2006; CASTILHO, 2008).



**Figura 2** - Fórmula estrutural da vitamina C.

A vitamina C interage com o tocoferol, regenerando esse elemento reduzido; dessa forma, a relação vitamina C: vitamina E pode ser biologicamente mais importante do que os níveis absolutos dessas vitaminas nos organismos (BARROS, 2010).

Devido à pequena quantidade de citoplasma da célula espermática e à redução do plasma seminal com o acréscimo do meio diluente, as defesas antioxidantes dos espermatozoides se tornam reduzidas. Bucak et al. (2009) compararam os efeitos da glutamina e da solução de aminoácidos (BME) na criopreservação de sêmen de carneiro com meio à base de Tris, visando melhorar os parâmetros espermáticos pós-congelamento/descongelamento, reduzir a peroxidação lipídica e incrementar a atividade antioxidante da superóxido dismutase e da catalase. Encontraram, com os ensaios realizados, melhora significativa na motilidade e integridade da membrana espermática nas amostras suplementadas com 5 mM de glutathione e também na atividade da enzima catalase.

Martínez-Páramo et al. (2012) criopreservaram sêmen de peixe incorporando ao meio 0,1 mM de ácido ascórbico e 0,1 mM de alfatocoferol e observaram que a suplementação produziu efeito sinérgico com o sistema antioxidante enzimático melhorando a motilidade espermática, e que os danos na membrana estavam provavelmente relacionados ao choque térmico e não ao estresse oxidativo.

Gundogan et al. (2010) investigaram o efeito da concentração espermática (25 e 100 milhões de espermatozoides/mL) do sêmen diluído em tris-gema e resfriado a 4 °C

por um período de cinco dias sobre a motilidade espermática, morfologia, integridade de membrana e DNA e parâmetros indicativos do estresse oxidativo. Esses pesquisadores constataram perda na qualidade dos parâmetros seminais e indicação de maior estresse oxidativo das amostras mais diluídas, provavelmente, devido à maior perda nos constituintes do plasma seminal, que protegem as células espermáticas dos metabólitos celulares no sêmen ovino.

Memon et al. (2012a) utilizaram diferentes concentrações de ácido ascórbico (2,5; 4,5; 6,5; e 8,5 mg/mL) para suplementação do meio de congelamento na criopreservação de sêmen de bodes Boer, sendo todas as concentrações efetivas no incremento das características seminais pós-congelamento/descongelamento, devido ao seu excelente poder de anular os efeitos nocivos das ROS. Entre as concentrações estudadas, os autores recomendam o nível de 8,5 mg/mL como a melhor concentração a ser suplementada. Esses mesmos pesquisadores compararam então a melhor concentração de ácido ascórbico (8,5 mg/mL), 2 mM de hidroxitolueno, 10 mM de taurina e 5 mM de cisteína na suplementação de meio de congelamento e observaram melhora efetiva nas características seminais, redução da peroxidação lipídica e incremento da fertilidade *in vivo* em todos os grupos testados (MEMON et al., 2012b).

Ainda buscando melhores protocolos de criopreservação para o sêmen caprino, Atessahin et al. (2008) analisaram os efeitos dos antioxidantes taurina (25, 50 e 75 mM), trealose (25, 50 e 75 mM) e cisteína (5, 10 e 15 mM) nos parâmetros oxidativos e espermáticos das amostras congeladas/descongeladas e apontaram níveis tóxicos para 75 mM de taurina.

Salmani et al. (2013) suplementaram o meio a base de lecitina de soja com 5 e 10 mM de glutathione para criopreservar sêmen caprino e não encontraram indícios de incremento nas características espermáticas analisadas.

Efeitos deletérios foram também encontrados para a suplementação do meio diluente com concentrações de glutathione acima de 2,5 mM na criopreservação de sêmen equino, haja vista a redução na motilidade e outras características indesejáveis ao sêmen, comprometendo sua fertilidade (OLIVEIRA et al., 2010).

Na ovinocultura, muitos trabalhos têm sido feitos com o objetivo de maximizar os índices de fertilidade com sêmen criopreservado após inseminação artificial. Uysal e Bucak (2007) congelaram sêmen de carneiros utilizando antioxidantes em diferentes concentrações no meio crioprotetor: glutathione (5, 10 e 20 mM), albumina sérica bovina - BSA (5, 10, 20mg/mL), cisteína (5, 10 e 20 mM) e licopeno (800, 1.600, 3.200 µg).

Esses autores encontraram melhores características espermáticas com 5 mM de glutathiona, 20 mg/mL de BSA, 10 mM de cisteína e 800 µg de licopeno.

A fim de minimizar os efeitos das ROS em sêmen criopreservado de carneiro, Bucak et al. (2008) estudaram os efeitos da glutathiona (5 mM), glutathiona oxidada (5 mM) e cisteína (5 mM) na suplementação do meio diluente, observando os parâmetros espermáticos, níveis de malonaldeído para avaliar a peroxidação lipídica e níveis de glutathiona, glutathiona peroxidases, catalase e vitamina E para avaliar a atividade antioxidante. Não se observou diferença estatística entre os parâmetros espermáticos avaliados, com exceção da motilidade, que, no grupo onde se utilizou a cisteína como antioxidante, foi maior. Também não houve diferença nos níveis de peroxidação lipídica entre os grupos estudados, mostrando que a diferença na motilidade não ocorreu em decorrência da redução na peroxidação lipídica das membranas. Trabalhando com equinos, Baumber et al. (2000) sugerem que a motilidade do espermatozoide equino pode ser afetada pela ação negativa das ROS, independentemente de observações de peroxidação lipídica e lesão mitocondrial nas células espermáticas.

Peris et al. (2007) observaram os impactos da criopreservação e da ação do peróxido de hidrogênio na integridade do DNA, peroxidação lipídica e características funcionais dos espermatozoides de carneiros. Com os ensaios, concluíram que os danos no DNA do sêmen criopreservado são estimulados pela lipoperoxidação lipídica, mas essa lipoperoxidação não é fator primário na indução desses danos à cromatina.

Santini et al. (2007) e Ruiz et al. (2007) adicionaram ao meio de criopreservação de sêmen ovino TEMPO (análogo sintético da enzima superóxido dismutase), na concentração de 1 e 0,5 mM, e observaram incremento nas taxas de não retorno ao cio das ovelhas inseminadas transcervicalmente, além de aumento na motilidade espermática.

Utilizando do sistema não enzimático de proteção celular, Peixoto et al. (2008) congelaram sêmen ovino e observaram características seminais e parâmetros oxidativos das amostras suplementadas com vitamina C, Trolox (análogo sintético da vitamina E) e a combinação desses dois antioxidantes. Esses autores recomendaram, após a análise dos resultados obtidos, 600 µM/L de vitamina C na suplementação de meio diluente tris-gema para minimizar os efeitos negativos das ROS na criopreservação de espermatozoides ovinos.

Objetivando minimizar a peroxidação lipídica da membrana plasmática de espermatozoides bovinos criopreservados, Borges (2008) utilizou 200  $\mu\text{M}$  de Trolox, acrescido ao meio diluente, observando, após análise dos resultados, melhora na viabilidade espermática e aumento nas taxas de prenhez, principalmente de reprodutores, com maior quantidade de espermatozoides anormais no ejaculado.

Na criopreservação de sêmen ovino, Silva Maia et al. (2009) suplementaram o meio diluente com 50  $\mu\text{M}$  de Trolox e não obtiveram, com a concentração utilizada, efeito significativo, recomendando inferência maior nos estudos para uma concentração adequada. Já o uso do antioxidante enzimático, catalase, na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  se mostrou efetivo no incremento da motilidade e viabilidade espermática, enquanto a mistura dos dois se mostrou deletéria às células.

Criopreservando sêmen ovino em meios com diferentes concentrações de glicerol acrescidos a vitamina C como agente antioxidante, Sönmez e Demirci (2004) não observaram melhora nas características seminais analisadas quando suplementaram o meio com 0,5, 1 e 2  $\text{mg/mL}$ , e as concentrações de 5 e 10  $\text{mg/mL}$  foram nocivas aos espermatozoides, reduzindo sua motilidade.

A utilização de vitamina C como antioxidante, na concentração de 2,5  $\text{mM}$ , se mostrou efetiva como agente antioxidante na criopreservação espermática de caprinos (CASTILHO, 2008) e de bubalinos (CASTRO, 2010).

Barros (2010) utilizou superóxido dismutase e catalase em diferentes concentrações para suplementação de meio diluente, na criopreservação de sêmen caprino, e observou efeitos benéficos desses antioxidantes enzimáticos associados à ultraestrutura espermática. Esse autor recomenda a análise *in vivo* para comprovação da capacidade fertilizante dos espermatozoides.

No entanto, não há consenso na literatura quanto ao efeito preventivo das substâncias antioxidantes adicionadas ao diluente, uma vez que alguns estudos relatam efeitos positivos e negativos da adição dessas substâncias, enquanto outros não observaram nenhum benefício. A divergência nos resultados observada dentro da mesma espécie certamente deve-se a variações na idade, raça dos animais estudados, tipo de alimentação e manejo a que foram submetidos os animais experimentados, na composição do diluente, no protocolo de conservação do sêmen, na qualidade do sêmen fresco, nas doses e combinações dos antioxidantes, entre outros (SILVA MAIA, 2006; SOARES; GUERRA, 2009).

## 2.4 Avaliação da viabilidade do sêmen

Os testes laboratoriais de análise de sêmen buscam a predição da viabilidade das células espermáticas para utilização na inseminação artificial. Entre esses exames encontram-se das técnicas mais simples às mais sofisticadas e precisas, como as sondas fluorescentes e a análise computadorizada; não existe um único teste *in vitro* que seja capaz de mensurar todas as funções espermáticas. Assim, deve-se considerar que, quanto maior a quantidade de exames e características avaliadas, mais precisa será a capacidade de se predizer a fertilidade *in vivo* do sêmen (BARROS, 2010). O ensaio ideal para avaliação da qualidade do sêmen deve ser objetivo, repetível, fidedigno e econômico (AISEN; VENTURINO, 2008).

A motilidade e o vigor espermático são características analisadas comumente através de microscopia, por avaliação visual e subjetiva da quantidade de espermatozoides em deslocamento progressivo e da intensidade desse movimento; contudo, esses dois parâmetros sozinhos não estão fortemente correlacionados à fertilidade *in vivo*. A morfologia e a concentração espermática, apesar de serem dados quantitativos e importantes na avaliação espermática, também necessitam do suporte de outras características para que, em conjunto, possam determinar a qualidade, viabilidade e fertilidade dos espermatozoides. Desse modo, testes complementares foram desenvolvidos, objetivando melhor avaliação da capacidade fecundante dessas células (FÜRST, 2006; SIQUEIRA et al., 2007).

A avaliação da membrana espermática é um indicador importante do sucesso da criopreservação, uma vez que ela é extremamente sensível às crioinjúrias (PENÃ et al., 2005). Para que seja considerado viável, o espermatozoide deve ser capaz de manter o seu equilíbrio osmótico. Com base nessa integridade osmótica, Jeyendran et al. (1984) propuseram o Teste Hiposmótico ou HOST (*Hypoosmotic Swelling Test*), como um teste complementar para avaliação da funcionalidade da membrana plasmática do espermatozoide.

Durante o HOST, o espermatozoide é exposto a uma solução de baixa osmolaridade, resultando no influxo de água, a fim de estabelecer o equilíbrio entre o meio intracelular e o extracelular. Esse influxo de água provoca o aumento do volume da célula, a expansão da membrana plasmática e o dobramento da cauda do espermatozoide (FONSECA et al., 2001), dando um indicativo da integridade funcional da membrana plasmática (DELL'AQUA JÚNIOR et al., 2002). A porcentagem de

endosse se correlaciona estreitamente com a fertilidade, sendo seu valor em ovino de 0,86 (AISEN; VENTURINO, 2008).

Outra maneira de avaliar a integridade da membrana – só que desta vez na região da cabeça – é empregado a técnica de coloração supravital, também conhecida como coloração de vivos e mortos, em que se utilizam corantes simples, como eosina-nigrosina, ou duplas e triplas colorações, como o azul de tripan/giemsas (SIQUEIRA et al., 2007; AISEN; VENTURINO, 2008).

Outro teste usado para avaliação de sêmen criopreservado é o de termorresistência (TTR). O TTR consiste na incubação da amostra de sêmen descongelado, mimetizando o trato genital da fêmea (NEVES et al., 2008), para avaliar a longevidade do espermatozoide e sua capacidade de fecundar o oócito (BUENO et al., 2001). A motilidade e o vigor espermáticos são parâmetros analisados em períodos que variam de 90, 180 e 240 minutos, sendo as observações feitas do descongelamento (tempo zero) a cada hora até o término do período. Segundo o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) (HENRY; NEVES, 1998), é desaconselhável a utilização de sêmen com motilidade e vigor inferiores a 30% e 3, respectivamente, após incubação da amostra descongelada a 38 °C por três horas.

## **2.5 Sincronização do ciclo estral e inseminação artificial em tempo fixo**

Distintas técnicas podem ser utilizadas para induzir e sincronizar o estro de pequenos ruminantes. A sincronização pode ser realizada de forma natural ou farmacológica. Os métodos naturais são: o efeito macho, o *flushing* alimentar e o controle do fotoperíodo (RUBIANES, 2000; GUERRA, 2000). Entretanto, o método mais eficiente para realizar uma sincronização é o farmacológico, em que se utiliza progesterona ou progestágenos, além de prostaglandinas (PGF<sub>2α</sub>) e seus análogos sintéticos, associados ou não a gonadotrofinas, como a Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG), a fim de estimular o crescimento folicular (GUERRA, 2000).

A progesterona e os progestágenos têm função de bloquear a liberação de Hormônio Luteinizante (LH) e impedir a ovulação, mesmo quando houver desenvolvimento folicular; esses hormônios bloqueiam a ação do estrógeno no útero e a síntese de receptores para ocitocina, reduzindo conseqüentemente a produção de PGF<sub>2α</sub>. Os progestágenos possuem atividade biológica superior à da progesterona. Esses

esteroides podem ser administrados via oral, intramuscular, implantes auriculares subcutâneos, esponjas ou dispositivos vaginais (GUERRA, 2000).

A finalidade da utilização dessa técnica é fazer com que um grupo de fêmeas apresente comportamento de estro em determinado momento, para realização de monta natural ou da Inseminação Artificial (IA) em um mesmo período. Com isso, são várias as vantagens da associação entre essas técnicas, como: programação de partos para épocas mais propícias à sobrevivência das crias e oferta de carne para os centros consumidores; uniformidade do rebanho e da produção de carne e leite; redução do intervalo de partos; viabilização de avaliações genéticas; controle de doenças venéreas dentro do rebanho; utilização de sêmen criopreservado; otimização da utilização de machos selecionados; e disseminação do seu material genético (JAINUDEEN et al., 2004).

Além de todas essas vantagens, os resultados em relação à fertilidade e prolificidade são semelhantes ou superiores aos obtidos com a monta durante o estro natural (DIAS et al., 2000). Quando a sincronização do ciclo estral é associada à Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), a utilização do sêmen criopreservado proveniente de animais de excelente mérito genético é potencializada.

Os protocolos de sincronização do ciclo estral podem ser classificados em longos, quando o tratamento com progestágeno dura de nove a onze dias (LUZ et al., 2000), ou curtos, quando a duração é de cinco a sete dias (COX et al., 2012; VILARINÕ et al., 2013).

Com o objetivo de avaliar diferentes protocolos longos para sincronização de estro, Zeleke et al. (2005) inseminaram 202 ovelhas da raça Dorper, 53 a 55 horas após a retirada da fonte de progesterona pela via transcervical. Em seu trabalho, eles obtiveram variadas taxas de prenhez administrando ou não eCG em diferentes momentos após a retirada da esponja vaginal (78% - eCG no D13; 75% - eCG no D14; 70% - eCG no D15; e 60% - controle). A diferença encontrada entre o grupo controle e os demais foi devido à ação da gonadotrofina utilizada.

Segundo Barrett et al. (2004), o sucesso da sincronização em ovelhas dentro ou fora da estação reprodutiva é menor sem o tratamento com a eCG. A eCG é um hormônio glicoproteico produzido pelo útero de éguas prenhes, sendo a gonadotrofina mais empregada em protocolos para sincronização de estro. Nos equinos, esse hormônio auxilia na manutenção do corpo lúteo primário e induz a formação de corpos lúteos acessórios para manutenção da gestação (SENGER, 2003).

Devido às suas características, a eCG pode gerar a formação de anticorpos anti-eCG após múltiplas utilizações, reduzindo a resposta ovariana. Uma das características dessa substância é a meia-vida longa em variadas espécies. Quando administrada em ovinos, a eCG apresentou atividade biológica superior a 21 horas; em bovinos, a sua presença foi notada até 45,6 horas após a sua aplicação. A base para essa circulação persistente por um longo período é o grande número de glicosilações e ácido siálico em sua molécula (MURPHY, 2012).

Para evitar os problemas associados à eCG, vários compostos comerciais de FSH (Hormônio Folículo Estimulante) têm sido utilizados (SIMONETTI et al., 2008). O FSH é uma glicoproteína com meia-vida muito curta, de  $110 \pm 8$  minutos (em ovário intacto) (FRY et al., 1988), substancialmente menor do que a eCG ( $21,2 \pm 1,1$  horas) (McINTOSH et al., 1975).

Boscos et al. (2002) avaliaram a administração de 10 UI de FSH e 400 UI de eCG no final do tratamento progesterônico em ovelhas no meio da estação reprodutiva. Eles observaram que o FSH resultou em maiores taxas de prenhez do que a eCG (93,8% x 57,1%,  $P < 0.05$ ), além de melhorar a prolificidade.

Outra gonadotrofina, a hCG (gonadotrofina coriônica humana), produzida pelas células trofoblásticas do embrião humano, tem sido amplamente usada em protocolos de sincronização de estro e indução da ovulação em programas de IATF e Transferência de Embriões (TE) (JAINUDEEN et al., 2004). A sua administração leva à indução da formação de corpos lúteos com melhor capacidade de produzir e secretar progesterona. Essa melhora na atividade esteroidogênica deve-se à sua ação sobre as células luteais, aumentando o número de células maiores e reduzindo o de células menores. Isso leva à formação de corpos lúteos com maior diâmetro e maior quantidade de tecido produtor de progesterona, aumentando as chances de sobrevivência embrionária até o momento do reconhecimento materno da prenhez (De RENSIS et al., 2008)

Bartolome et al. (2012) observaram que a hCG induz a formação de corpos lúteos acessórios e aumenta significativamente a concentração plasmática de progesterona, porém a sua administração sem o tratamento prévio com a eCG reduz a fertilidade em fêmeas bovinas.

Dias (2011) avaliou o efeito da administração de hCG para indução de ovulação e realizou um estudo da dinâmica folicular utilizando protocolo longo (nove dias) de sincronização de estro em ovelhas. Com a realização desse trabalho, foi possível observar que a utilização de 500 UI de hCG resultou na antecipação e maior

sincronização da ovulação, o que pode ser importante para aumentar a eficiência da IATF.

Em geral, o uso de gonadotrofinas para aumentar a prolificidade é dificultado pela grande variabilidade na resposta ovulatória (LOPEZ-SEBASTIAN, 1993). A eficiência dos protocolos de sincronização para IATF depende do estágio do ciclo estral no momento do tratamento hormonal (GÓMEZ-BRUNET et al., 2007). Além do fator hormonal e fisiológico, o sucesso em programas de IATF depende também da técnica utilizada para realização da inseminação.

A IA na ovelha pode ser realizada pela via vaginal, cervical ou intrauterina, a depender do local de deposição da dose inseminante. Esses métodos se diferenciam quanto à sua complexidade e expectativa de êxito. A inseminação vaginal é o método mais simples e mais rápido, em que se utiliza sêmen fresco altamente concentrado. Este método é utilizado quando existe impossibilidade de alcançar o canal cervical de forma mais profunda, como pode acontecer com fêmeas que nunca antes foram cobertas, e sua eficiência é limitada. Utilizando também sêmen fresco, obtêm-se bons resultados na inseminação cervical, que também é um método relativamente simples. Contudo, em programas de IATF com sêmen criopreservado, é recomendado que se faça uso da inseminação intrauterina com o auxílio de um laparoscópio, a fim de aumentar as expectativas de prenhez (EVANS; MAXWELL, 1990).

A grande dificuldade, hoje, é obter boas taxas de prenhez em ovelhas inseminadas com sêmen criopreservado. Aproximadamente 40 a 50% da população de espermatozoides não consegue sobreviver mesmo com o uso de protocolos de criopreservação melhorados (WATSON, 2000). Para obtenção de bons resultados com sêmen criopreservado, este precisa ser depositado no interior do útero (RABASSA et al., 2007).

Para alcançar o interior do útero, pode-se utilizar a técnica da IA transcervical ou laparoscópica. No entanto, a disposição dos anéis cervicais e o reduzido diâmetro do orifício dificultam a transposição do instrumento durante a IA transcervical, comprometendo a deposição do sêmen (ANEL et al., 2006). Além disso, faz-se necessária a utilização de substâncias como a ocitocina ou prostaglandina E para obter maior dilatação da cérvix e fixá-la e tracioná-la até a abertura vulvar, a fim de diminuir a sua sinuosidade (RABASSA et al., 2007), o que pode levar a lesões e complicações graves, como abscessos e piometra (CAMPBELL et al., 1996).

Além da dificuldade anatômica devido às características cervicais desta espécie, as ovelhas tratadas farmacologicamente com progestágenos e PGF<sub>2α</sub> inibem o estabelecimento das reservas espermáticas na cérvix nas primeiras duas horas após a inseminação, reduzem o número de espermatozoides nas tubas uterinas próximo à ovulação e, com isso, baixam as taxas de fertilização (HAWK et al., 1987). Esses autores sincronizaram e superovularam ovelhas que foram necropsiadas três dias após a cobertura natural. Observaram que o número de espermatozoides foi reduzido na cérvix, útero e tuba uterina e que houve aumento na quantidade de células espermáticas que estavam imóveis ou que tinham ruptura na estrutura da membrana, encontradas na cérvix e no útero.

Entende-se que a IA é uma técnica que apresenta grande impacto em um programa de melhoramento genético, desde que bem conduzida. No entanto, no Brasil e no mundo, a IA ainda não é usada na ovelha no nível em que é na vaca. Alguns fatores têm contribuído para isso, destacando-se a anatomia da cérvix uterina e a ausência de uma técnica de inseminação eficaz, simples e de baixo custo (LEBOEUF et al., 2000).

Killen e Caffery (1982), ao usarem a laparoscopia para fazer a IA na fêmea ovina, deram uma grande contribuição para expandir o uso dessa técnica em nível de unidade produtiva. A técnica, afora permitir a suplantação da barreira física imposta pela condição anatômica da cérvix, favorece a redução da dose inseminante, mesmo quando se usa espermatozoide sexado, e pode ser usada independentemente da época do ano; do regime de manejo; do tipo de estro: natural, sincronizado ou induzido; e da forma de apresentação e preparação do sêmen.

A IA laparoscópica permite a deposição do sêmen no interior do útero com a realização de duas pequenas incisões na região abdominal ventral na linha dos tetos, para o acesso do aplicador de sêmen (LUZ et al., 2000). Nessa técnica, a concentração da dose inseminante é bem menor do que a IA transcervical e o tempo de inseminação necessário para cada fêmea pode chegar a menos de dois minutos, podendo ser empregado em um grande número de animais. O que limita o seu uso é a necessidade de equipamentos onerosos e assistência de um médico-veterinário (RABASSA et al., 2007).

Luz et al. (2000) inseminaram 297 ovelhas por laparoscopia, utilizando sêmen criopreservado na concentração de 50 milhões de espermatozoides por dose, 58 a 66 horas após a retirada da fonte de progesterona. Previamente às inseminações, os animais foram tratados com 50 mg de MAP (acetato de medroxiprogesterona) durante

12 dias e, no momento da retirada da esponja, foram administrados 400 UI de eCG. Esses autores obtiveram taxas de prenhez entre 60 e 80%.

Em outro estudo, com o objetivo de avaliar resposta ovariana e taxa de prenhez reutilizando dispositivos de liberação controlada de progesterona (CIDR), Vilarinõ et al. (2013) inseminaram 319 ovelhas. Os dispositivos permaneceram durante seis dias e, no momento da sua retirada, as fêmeas foram tratadas com 10 mg de Dinoprost e 300 UI de eCG. A IA laparoscópica com sêmen criopreservado ( $100 \times 10^6$  espermatozoides) foi realizada 52 a 57 horas após a retirada do CIDR. Os animais que foram tratados com dispositivos reutilizados obtiveram taxas de prenhes de 71,4%. Os protocolos curtos, mesmo utilizando esses dispositivos, mostraram ser eficientes para sincronizar estro e ovulação.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais experimentais

Foram selecionados três machos adultos da raça Dorper, de dois a quatro anos de idade, férteis (conforme histórico reprodutivo), clinicamente sadios, avaliados e aprovados por meio de exame andrológico, de acordo com os padrões de qualidade de sêmen *in natura* estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (HENRY, NEVES, 1998), e com boa congelabilidade seminal, atestado em um experimento piloto.

Foram utilizadas 180 ovelhas mestiças de Dorper e Santa Inês, numa faixa etária de dois a quatro anos, pluríparas, em condição de escore corporal variando de dois a três (escala de zero a cinco), de acordo com Thompson e Meyer (2012), com adequadas condições sanitárias e integridade do sistema reprodutivo, não gestantes, conforme exames clínicos e ultrassonográficos (KX 2000G VET, Oxson Theriogenology, São Paulo, Brasil), com transdutor linear de 5 MHz, acoplado a um suporte rígido, por via transretal.

As técnicas descritas neste experimento foram conduzidas de acordo com os princípios éticos da experimentação animal dispostos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

### **3.2 Local e período experimental**

A coleta e o congelamento do sêmen foram realizados na Fazenda Jataí, localizada no município de Senhor do Bonfim, Bahia, situada na latitude de 10°27'48" sul e longitude de 40°11'27" oeste, área inserida no Polígono das secas, com um tipo climático semiárido, apresentando temperatura média anual de 23,3 °C e índice pluviométrico anual de 400 mm (C.E.I., 1994), durante os meses de junho e julho de 2012.

Os reprodutores foram mantidos em sistema de confinamento, sendo alimentados diariamente por uma dieta composta por feno de tifton oferecido à vontade e 800 g diários de ração comercial concentrada (Tech Ovin Unique, Socil, Brasil), além de sal mineral (Ovinofós com minerais orgânicos, Tortuga, Brasil) e água *ad libitum*.

As inseminações artificiais foram realizadas nas fêmeas pertencentes ao rebanho da Fazenda Cachoeira, localizada no município de Monte Santo, Bahia, situada na latitude de 10°26'16" sul e longitude de 39°19'58" oeste, área inserida na mesorregião do Nordeste Baiano, com um tipo climático semiárido, apresentando temperatura média anual de 25 °C e índice pluviométrico anual de 250 a 300 mm (C.E.I., 1994), durante os meses de setembro e outubro de 2012.

Durante o experimento, as fêmeas receberam alimentação composta por bagaço de cana misturada a palma-forrageira triturada, fornecida à vontade, e 250 g de concentrado à base de caroço de algodão, milho e soja, além de sal mineral (Ovinofós com minerais orgânicos, Tortuga, Brasil) e água *ad libitum*.

### **3.3 Coletas e avaliações do sêmen pré-criopreservação**

Foram feitas oito coletas de sêmen de cada reprodutor (duas coletas por semana, durante quatro semanas), utilizando-se uma vagina artificial com temperatura entre 40 e 45 °C e uma fêmea em estro como manequim. Antes das coletas, os prepúcios dos animais foram devidamente higienizados com solução de ringer-lactato.

Após cada coleta, foram realizados exames completos de acordo com o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal disposto pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Cada ejaculado foi avaliado subjetivamente quanto a turbilhão, motilidade progressiva e vigor, além de análise da concentração e morfologia espermática e avaliação de integridade de membrana dos espermatozoides.

O turbilhão foi avaliado, em uma escala de zero a cinco, observando o movimento em massa, sob a forma de ondas, de uma gota de sêmen colocada sobre uma lâmina pré-aquecida e levada a um microscópio de luz com contraste de fase, com objetiva de 10 a 20X.

A avaliação da motilidade progressiva e do vigor espermático foi feita em uma lâmina coberta por uma lamínula pré-aquecida, com objetiva de 200 a 400X. O resultado expresso para a motilidade foi em porcentagem; para o vigor, foi utilizada uma escala de zero a cinco.

Para avaliar a concentração espermática, 20 µL de sêmen foram diluídos em 10 mL de solução de formol salina tamponada. A contagem foi feita em microscópio de contraste de fase em aumento de 400X, utilizando a câmara de Neubauer.

Para observação da morfologia espermática foi realizado um esfregaço, que foi submetido à coloração Karras, de acordo com Papa et al. (1988). Foram contadas 200 células espermáticas no total, em microscopia com aumento de 1.250X, sendo registradas as patologias encontradas.

A avaliação de espermatozoides com membrana plasmática íntegra ou lesada foi realizada utilizando solução de eosina-nigrosina, segundo Barth e Oko (1989). Uma gota de sêmen foi misturada a uma gota da solução corante, homogeneizada, e realizou-se o esfregaço. As lâminas coradas foram observadas em microscópio, sob aumento total de 1.250X. Foram contados e classificados 200 espermatozoides por lâmina, de modo que os espermatozoides corados de vermelho ou seus subtons foram classificados como tendo membrana plasmática lesada, enquanto os espermatozoides não corados foram classificados como tendo membrana plasmática íntegra, que foram expressos em porcentagem de células vivas e registrados como viabilidade espermática.

A integridade da membrana plasmática dos espermatozoides também foi avaliada pelo teste hiposmótico. Foram coletados de cada ejaculado 20 µL e colocados em tubos *ependorfs* contendo 1,0 mL de solução hiposmótica de 100 mOsm/kg, composta por frutose (0,9 g), citrato de sódio (0,49 g) e água destilada (100 mL). As amostras foram mantidas a 37 °C por uma hora e, posteriormente, a leitura do percentual de reação dos espermatozoides ao HOST foi feita, utilizando microscopia de contraste de fase com aumento de 40X, colocando-se uma gota da fração sêmen/solução entre uma lâmina e uma lamínula. Foi utilizado o protocolo proposto por Revell e Mrode (1994), subtraindo a porcentagem de espermatozoides que apresentavam alterações na cauda após o HOST da porcentagem de espermatozoides com alterações na cauda antes do HOST encontrados na avaliação morfológica das amostras.

### 3.4 Diluição e criopreservação do sêmen

Cada ejaculado foi dividido em duas alíquotas e pré-diluído 1:1 em diluente composto por Tris, D-frutose, ácido cítrico, gema de ovo, glicerol e sulfato de gentamicina, de acordo com a formulação descrita a seguir, e o mesmo diluente foi acrescido de 0,5 mg/mL de ácido ascórbico (Tabela 1). As amostras foram mantidas em banho-maria a 32 °C até a completa diluição, para obtenção dos seis grupos:

G1 - 80 x10<sup>6</sup> spz em meio tris-gema (grupo controle)

G2 - 40 x10<sup>6</sup> spz em meio tris-gema

G3 - 20 x10<sup>6</sup> spz em meio tris-gema

G4 - 80 x10<sup>6</sup> spz em meio tris-gema + ácido ascórbico

G5 - 40 x10<sup>6</sup> spz em meio tris-gema + ácido ascórbico

G6 - 20 x10<sup>6</sup> spz em meio tris-gema + ácido ascórbico

Para diluição final e formação dos grupos, foi calculado, de acordo com a concentração espermática do ejaculado, o número de doses por grupo e, assim, o volume final do diluente a ser adicionado.

**Tabela 1** - Composição do diluente Tris-gema

Componente	Quantidade
Tris-mãe	
Tris	6,056 g
D-frutose	2,5 g
Ácido cítrico	3,48 g
Água tridestilada q.s.p.	200 mL
Diluente Tris-gema final	
Tris-mãe	70 mL
Gema de ovo	17 mL
Glicerol	5,0 mL
Sulfato de gentamicina	13,33 mg
Água tridestilada q.s.p.	100 mL

Fonte: arquivo pessoal Dr. Max Vitória Resende.

Após as diluições, o sêmen foi mantido em uma caixa térmica plástica de 34 litros de capacidade, com dimensões externa (comprimento x largura x altura) de 45 x 34 x 40 cm. Dentro da caixa foram colocadas barras de gelo recicláveis para manter um ambiente interno a uma temperatura aproximada de 5 °C, aferida com termômetro digital. O sêmen diluído e acondicionado em tubos plásticos de 10 mL eram

mantidos dentro de um recipiente plástico com capacidade para 250 mL com água a 32 °C e este conjunto dentro da caixa térmica a 5 °C durante duas horas. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL, seladas com massa de modelar atóxica. Previamente ao envasamento, as palhetas e raques foram identificadas e separadas de acordo com os grupos.

Para a criopreservação foi utilizada uma caixa isotérmica de 22 L de poliestireno expandido, com as dimensões internas (comprimento x largura x altura) de 39 x 31 x 19 cm, adaptada a um suporte metálico utilizado para acomodar as palhetas na posição horizontal, 5 cm acima do nitrogênio líquido. As palhetas ficaram em contato com o vapor de nitrogênio líquido durante 15 minutos; após esse período, foram mergulhadas no nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criogênico.

### **3.5 Descongelamento e avaliação do sêmen criopreservado**

As doses foram descongeladas em banho-maria a 37 °C durante 30 segundos; posteriormente, foram avaliados a motilidade progressiva, o vigor espermático, a morfologia espermática e a integridade de membrana plasmática, de acordo com os protocolos já descritos para a avaliação do sêmen fresco.

A longevidade dos espermatozoides de cada grupo foi avaliada pelo teste de termorresistência lento. Após descongelamento em água a 37 °C durante 30 segundos, o conteúdo das palhetas foi colocado em tubos *ependorfs* de 1,5 mL e incubado a 37 °C por três horas. A motilidade progressiva e o vigor espermático foram avaliados a cada hora (T0, T1, T2 e T3horas).

### **3.6 Sincronização do ciclo estral e inseminação artificial**

Para aferir a fertilidade *in vivo* do sêmen criopreservado, 180 ovelhas foram divididas em dois grupos. Foram sincronizadas 90 ovelhas por dia. No dia zero foram introduzidos pessários vaginais impregnados com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon, Coopers, Brasil), mantidos no fundo de saco vaginal por sete dias. No sexto dia foram aplicados intramuscularmente 300 UI de eCG (Sincroecg, Ourofino, Brasil) e 0,125 mg de cloprostenol (Ciosin, Coopers, Brasil). No oitavo dia foram aplicados 300 UI de hCG (Vetecor, Hertape Calier, Brasil), via intramuscular.

Cinquenta e cinco horas após a retirada da progesterona, foram feitas as inseminações por laparoscopia, sem observação do cio.

Vinte e quatro horas antes da IATF, as ovelhas foram mantidas em jejum alimentar e hídrico. Para a inseminação elas receberam anestesia dissociativa composta por 4% de cloridrato de xilazina (Rompum, Bayer, Brasil) e 20% de cloridrato de quetamina (Ketalar, Parker-Davis Co., Argentina), na dosagem de 1 mL/10 kg de peso vivo, via endovenosa. Foram acomodadas em macas apropriadas em decúbito dorsal, para realização de tricotomia e antisepsia local com álcool iodado. Foram feitas duas infiltrações com 5 mL de lidocaína a 2% (Anestésico Pearson, Pearson, Brasil) em dois pontos: 5 cm laterais à linha alba e 5 cm cranialmente ao úbere. Com uma pequena incisão em cada ponto, foi introduzido um trocater para passagem da ótica laparoscópica; no outro ponto foi acoplado um manipulador para o posicionamento do útero e, posteriormente, introdução de uma pipeta aspic (IMV – Ref.005546), que permite a inseminação na porção medial da curvatura maior de cada corno uterino. Após esse procedimento, os equipamentos foram retirados e os pontos suturados com fio de náilon, aspergindo-se no local oxitetraciclina spray (Terra-cortril, Pfizer, Brasil), além de ser administrado 1 mL/10 kg de peso vivo de oxitetraciclina LA (Terramicina LA, Pfizer, Brasil), via intramuscular.

O diagnóstico de gestação foi realizado ultrassonograficamente, 40 dias após as inseminações.

### **3.7 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com auxílio do pacote estatístico SAEG (1999). As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de normalidade (Lilliefors) e homocedasticidade (Cochran) e, posteriormente, à análise de variância a 5%. Caso apresentasse significância, foi realizado o teste de Tukey, evitando-se erros estatísticos tipo I e II. Quando não atendiam às premissas de normalidade e homocedasticidade, mesmo após as transformações apropriadas, os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com probabilidade de erro de 5%.

Os dados qualitativos de taxa de gestação foram agrupados em tabela de contingência e analisados pelo teste de qui-quadrado pelo programa SPSS (SPSS, Inc., 1992).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características do sêmen fresco dos carneiros estão sumariadas na Tabela 2.

**Tabela 2** - Características físicas e morfológicas do sêmen fresco dos carneiros da raça Dorper

Parâmetro	Valores Médios e Desvio-Padrão
Volume (mL)	1,2 ± 0,4
Turbilhonamento (0-5)	5 ± 0
Concentração (x 10 <sup>6</sup> spz/ mL)	3275 ± 677,9
Motilidade Progressiva (%)	91,7 ± 3,1
Vigor (0-5)	5 ± 0
Integridade de Membrana Plasmática/ Vivos e Mortos (%)	84,6 ± 5,2
Integridade de Membrana Plasmática/ HOST (%)	91,3 ± 3,6
Patologias Totais (%)	2,5 ± 1,1

Como uma grande parte, 40 a 50%, da população espermática, se torna infértil após o processamento e criopreservação (WATSON, 2000), é necessário trabalhar com ejaculado de excelente qualidade, visando obter uma concentração de células viáveis que mantenha os níveis de fertilização aceitáveis após programas de IA. Os valores descritos na Tabela 1 estão bem acima daqueles parâmetros mínimos recomendados pelo CBRA (1998) para sêmen ovino *in natura*.

Na motilidade progressiva pós-descongelamento, foi encontrada diferença ( $P < 0,05$ ) entre o tratamento 4 (80 milhões com antioxidante), com  $67,8\% \pm 3,9$ , e o tratamento 6 (20 milhões com antioxidante), com  $62,9\% \pm 3,6$ , porém esses tratamentos não apresentaram diferença ( $P > 0,05$ ) dos demais tratamentos testados, como se observa na Tabela 3.

Não foi encontrada diferença ( $P > 0,05$ ) para motilidade pós-descongelamento nos grupos com e sem antioxidante. Os tratamentos 4, 5 e 6, compostos por amostras criopreservadas com diluente acrescido de  $0,5 \text{ mg/mL}$  de ácido ascórbico, apresentaram após descongelamento motilidades de  $67,8\% \pm 3,9$ ;  $66,0\% \pm 3,9$  e  $62,9\% \pm 3,6$ , respectivamente. Esses achados são superiores aos descritos por Sönmez e Demirci (2004), que obtiveram motilidade de  $49,2\% \pm 0,75$  quando utilizaram a mesma concentração de ácido ascórbico ( $0,5 \text{ mg/mL}$ ) na criopreservação de sêmen ovino.

Em estudos recentes, Memon et al. (2012b), trabalhando com sêmen caprino e suplementação do meio com  $8,5 \text{ mg/mL}$  deste antioxidante (ácido ascórbico), obtiveram motilidade pós-descongelamento de  $68,60\% \pm 0,56$ , similar à encontrada neste ensaio.

Diluindo sêmen suíno fresco, Córdova-Izquierdo et al. (2007) encontraram amostras com motilidade zero quando suplementaram o meio diluente com  $5 \text{ mg/mL}$  de ácido ascórbico. Sönmez e Demirci (2004) constataram resultados semelhantes quando usaram  $5$  e  $10 \text{ mg/mL}$  desse mesmo antioxidante para criopreservação de sêmen ovino. Estes autores justificam o achado pela capacidade do ácido ascórbico de acidificar o sêmen, causando redução da motilidade das amostras.

Contrariando esses resultados, Memon et al. (2012a) utilizaram concentrações de  $2,5$ ,  $4,5$ ,  $6,5$  e  $8,5 \text{ mg/mL}$  de vitamina C para criopreservação de sêmen caprino e encontraram em todos os grupos incremento nas características seminais observadas, recomendando a concentração mais alta para suplementação dos meios diluentes.

O teste de termorresistência permitiu avaliar a motilidade e vigor das amostras criopreservadas durante três horas, em intervalos de uma hora, a uma temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , mimetizando a permanência do sêmen nos órgãos genitais femininos. Os valores encontrados para a motilidade estão dispostos na Tabela 3. As motilidades, na primeira hora, diferenciaram ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos 1 e 4, apresentando médias e desvio-padrão de  $61,7\% \pm 6,2$  e  $66,5\% \pm 3,7$ , respectivamente, e entre os tratamentos 4 e 6, com valores na ordem de  $66,5\% \pm 3,7$  e  $61,0\% \pm 2,9$ , respectivamente. Essa observação mantém o padrão da motilidade pós-descongelamento até a primeira hora de teste de termo-resistência, que aponta melhores valores para o tratamento 4 e menores para o tratamento 6.

**Tabela 3** - Médias e desvios-padrão das características espermáticas no pós-descongelamento, testes hiposmótico, viabilidade espermática, teste de termorresistência, do sêmen de carneiros Dorper criopreservado em diferentes concentrações espermáticas, acrescidos ou não de 0,5 mg/mL de ácido ascórbico ao meio diluente

Tratamento	Variáveis									
	Motilidade	Vigor	Patologia total	HOST	Viabilidade	Motilidade 60	Vigor 60	Motilidade 120	Vigor 120	Motilidade 180
1	64,4 ± 5,8 <sup>ab</sup>	3,9 ± 0,7	3,6 ± 1,7	83,8 ± 8,9	78,9 ± 8,8	61,7 ± 6,2 <sup>b</sup>	3,7 ± 0,8	57,5 ± 6,3	3,5 ± 0,9	52,0 ± 7,1
2	64,4 ± 5,8 <sup>ab</sup>	3,9 ± 0,7	4,1 ± 1,9	83,9 ± 5,1	79,4 ± 7,6	62,5 ± 5,9 <sup>ab</sup>	3,4 ± 0,6	57,9 ± 5,3	3,1 ± 0,3	53,5 ± 6,0
3	64,8 ± 4,3 <sup>ab</sup>	4,1 ± 0,7	4,5 ± 1,8	85,6 ± 8,5	81,8 ± 7,6	62,5 ± 5,1 <sup>ab</sup>	3,6 ± 0,8	58,5 ± 6,0	3,0 ± 0,3	52,5 ± 6,1
4	67,8 ± 3,9 <sup>a</sup>	3,9 ± 0,7	3,6 ± 1,8	86,9 ± 6,3	80,1 ± 8,0	66,5 ± 3,7 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,5	60,8 ± 3,8	3,0 ± 0,4	54,2 ± 5,0
5	66,0 ± 3,9 <sup>ab</sup>	4,2 ± 0,7	4,1 ± 2,0	84,7 ± 8,7	80,4 ± 9,3	64,2 ± 4,1 <sup>ab</sup>	3,6 ± 0,5	58,3 ± 4,3	3,1 ± 0,4	52,7 ± 5,3
6	62,9 ± 3,6 <sup>b</sup>	3,6 ± 0,6	3,7 ± 2,1	82,2 ± 9,1	77,8 ± 7,4	61,0 ± 2,9 <sup>b</sup>	3,2 ± 0,4	56,2 ± 4,9	2,9 ± 0,2	50,4 ± 6,8

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Tukey ou Kruskal-Wallis

Tratamento 1 – 80 milhões de spz sem antioxidante; Tratamento 2 – 40 milhões de spz sem antioxidante; Tratamento 3 – 20 milhões de spz sem antioxidante; Tratamento 4 – 80 milhões de spz com antioxidante; Tratamento 5 – 40 milhões de spz com antioxidante; Tratamento 6 – 20 milhões de spz com antioxidante.

Peixoto et al. (2008), em seus experimentos de criopreservação de sêmen ovino com meio diluente tris-gema acrescido ao ácido ascórbico e Trolox, encontraram motilidade progressiva após uma hora de incubação das amostras de sêmen a 37 °C de 20,0% ± 5,0 e 15,0% ± 5,0 para o grupo controle e o grupo suplementado com 600 µM/L de ácido ascórbico (0,11 mg/mL), respectivamente. Esses resultados apontam um protocolo de congelamento ineficiente; apesar de a motilidade não ter mostrado diferença significativa entre os grupos, esses autores apontam o grupo suplementado como opção para minimizar os efeitos negativos da criopreservação, haja vista a notória manutenção da integridade do DNA do sêmen criopreservado com ácido ascórbico em seus trabalhos.

Quanto às motilidades nos tempos de 120 e 180 minutos de TTR, elas não apresentaram diferenças ( $P > 0,05$ ). Esses achados estão próximos dos obtidos por D'Alessandro et al. (2001), que encontraram motilidade da ordem de 44,5%, 59,9% e 52,6% para o final da incubação em três horas em doses de sêmen ovino criopreservado, em meio tris-gema nas concentrações de 20, 40 e 80 milhões de espermatozoides, respectivamente.

Não houve diferença estatística ( $P > 0,05$ ) no vigor entre os tratamentos no descongelamento e durante o TTR (Tabela 3). As médias encontradas foram superiores às dos trabalhos realizados por Peixoto et al. (2008), suplementando o meio com ácido ascórbico e Trolox.

Os resultados de motilidade espermática progressiva encontrados neste ensaio para o TTR lento estão de acordo com as exigências do CBRA, que aponta motilidade de 30% no fim da avaliação para atestar como viáveis amostras seminais criopreservadas provenientes da espécie ovina, ao passo que o vigor se apresentou abaixo dessas recomendações, com valor mínimo encontrado de  $2,7 \pm 0,3$  para os tratamentos 5 e 6.

A integridade funcional da membrana foi avaliada pelo teste hiposmótico, enquanto a integridade física foi medida através da coloração supravital, que aponta os espermatozoides vivos e mortos, isto é, com membrana fisicamente íntegra ou não. O processo de criopreservação adotado não causou danos às membranas de uma grande proporção de espermatozoides nos diferentes grupos testados, e a presença do ácido ascórbico não apresentou ação protetora nos tratamentos realizados, como está demonstrado na Tabela 3.

Os resultados apresentados de espermatozoides vivos pela coloração supravital foram superiores aos 60% encontrados por Sönmez e Demirci (2004), utilizando a mesma concentração de ácido ascórbico, e similares aos de Memon et al. (2012b).

A mesma concentração de ácido ascórbico em meio à base de TES-TRIS foi utilizada por Castro (2010) para a criopreservação de sêmen bubalino; esse autor observou incremento na motilidade pós-descongelamento e após TTR, mas não notou diferença ( $P>0,05$ ) nos testes que avaliaram a integridade física e funcional da membrana.

Penitente Filho (2010), criopreservando sêmen caprino com a adição de vitamina E nas concentrações de 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$  ao meio diluente, também não observou ação protetora do antioxidante utilizado na membrana plasmática através de avaliação por intermédio do teste hiposmótico.

Encontrando diferenças ( $P<0,05$ ) com o grupo controle, Memon et al. (2012b) obtiveram valor de  $69,40\% \pm 1,23$  para integridade funcional de membrana. Essa reação ao teste hiposmótico foi inferior à verificada neste experimento,

Não houve diferença entre os tratamentos ( $P>0,05$ ) com e sem ácido ascórbico para os testes hiposmótico e de coloração supravital, mostrando que a inclusão desse antioxidante no meio diluente não teve o efeito esperado de proteção de membrana. Talvez a concentração do antioxidante em questão não tenha sido o suficiente para ter seus efeitos benéficos ou a produção de espécies reativas ao oxigênio não tenha sido alta o bastante para as células entrarem em estresse oxidativo, o que compromete as estruturas de membrana com o processo de lipoperoxidação oxidativa, necessitando de acréscimo de agentes antioxidantes.

Observando esses achados, outro fator que pode ter interferido na não observação das ações antioxidativas da inclusão do ácido ascórbico ao meio diluente é o fato de se ter trabalhado com sêmen de alta qualidade e poucas patologias espermáticas, provenientes de carneiros em adequadas condições de saúde, pois, de acordo com Agarwal et al. (2005), Alvarez e Moraes (2006), Barbosa (2009) e Castro (2010), a produção de ROS acontece de maneira mais evidenciada quando ocorre grande quantidade de espermatozoides com gota protoplasmática e/ou uma grande quantidade de leucócitos no ejaculado, pelos motivos já expostos.

Os neutrófilos produzem e liberam elevadas concentrações de ROS próximo às células e patógenos para formar reações citotóxicas, sendo essa síntese de ROS a primeira linha de defesa contra microrganismos invasores. Outra importante fonte de ROS no sêmen são os espermatozoides imaturos. Os resíduos citoplasmáticos dessas

células contêm elevados níveis da enzima glucose-6-fosfato desidrogenase, que forma o NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida). O NADPH posteriormente forma ROS via NADPH oxidase na membrana espermática (BAUMBER et al., 2000; BARBOSA, 2009).

Talvez a ação antioxidante do ácido ascórbico se apresente e melhore as qualidades seminais de carneiros com baixo padrão de qualidade do sêmen a ser criopreservado, conforme mostraram Garcez et al. (2010), congelando sêmen humano, em que foram observadas melhoras nas atividades antioxidativas das enzimas superóxido dismutase e catalase no material processado proveniente de homens inférteis quando utilizaram o agente antioxidante resveratrol para suplementar o meio diluente.

Essa observação foi feita também por Borges (2008), quando experimentou o antioxidante Trolox na suplementação do meio tris-gema para congelar sêmen bovino. Quando analisou o grande grupo com e sem antioxidante, esse autor não observou diferença ( $P>0,05$ ) nas características seminais e fertilidade pós-inseminação, mas, quando separou os touros pela qualidade espermática, percebeu melhora significativa na fertilidade *in vitro* e *in vivo* do sêmen criopreservado com o antioxidante.

A redução da concentração espermática de 80 para 40 e 20 milhões de espermatozoides totais por dose inseminante não alterou ( $P>0,05$ ) a fertilidade das ovelhas inseminadas laparoscopicamente em um programa de sincronização de estro e IATF, como está representado na Tabela 4. Esses resultados corroboram os achados de D'Alessandro et al. (2001), que não encontraram diferenças significativas nos testes de fertilidade *in vivo*, recomendando a possibilidade de se trabalhar com doses de 20 milhões de espermatozoides em programas de inseminação laparoscópica em ovelhas, aumentando a quantidade de doses produzidas na criopreservação. Esses pesquisadores destacam ainda a baixa fertilidade *in vitro* obtida das amostras congeladas em concentrações altas, com 800 milhões de espermatozoides/mL.

De acordo com Leahy et al. (2010), doses criopreservadas com altas concentrações espermáticas afetam negativamente a fertilidade pela elevada produção de metabólitos que irão promover o estresse oxidativo naquele meio, enquanto doses mais diluídas, de acordo com Gundogan et al. (2010), perdem sua proteção antioxidativa natural presente no plasma seminal, sendo eles expostos também à ação nociva das ROS. A presença do ácido ascórbico na concentração de 0,5 mg/mL melhoraria o desempenho da IA e as características seminais *in vitro* do sêmen criopreservado.

**Tabela 4** - Taxas de gestação\* de ovelhas inseminadas artificialmente em tempo fixo via laparoscopia com sêmen criopreservado de carneiros Dorper em diferentes concentrações espermáticas, acrescidos ou não de 0,5 mg/mL de ácido ascórbico ao meio diluente

Tratamento	Variáveis	
	IA (n)	Gestantes (n)
1	30	18
2	30	18
3	30	19
4	30	21
5	30	22
6	30	19

\* (P>0,05) teste do qui-quadrado

Tratamento 1 – 80 milhões de spz sem antioxidante; Tratamento 2 – 40 milhões de spz sem antioxidante; Tratamento 3 – 20 milhões de spz sem antioxidante; Tratamento 4 – 80 milhões de spz com antioxidante; Tratamento 5 – 40 milhões de spz com antioxidante; Tratamento 6 – 20 milhões de spz com antioxidante.

Nos trabalhos realizados não foram observadas reduções de fertilidade nas fêmeas inseminadas com as doses mais concentradas, representadas pelos tratamentos 1 e 4, nem nas fêmeas inseminadas com as doses provenientes dos tratamentos 3 e 6, mais diluídas, nem a ação do ácido ascórbico foi percebida nas diferentes concentrações espermáticas utilizadas.

Os tratamentos de menor concentração espermática, 3 e 6, mantiveram a fertilidade semelhante à do grupo controle, mostrando ser possível trabalhar com doses de 20 milhões de espermatozoides. Como Salamon et al. (1985) pontuaram em seus trabalhos, essa concentração é considerada o platô para a dose inseminante se manter com fertilidade adequada para a IA intrauterina em ovelhas.

## **5 CONCLUSÕES**

A inclusão de 0,5 mg/mL de ácido ascórbico ao meio diluente à base de Tri-gema não melhorou nem as características seminais nem a fertilidade do sêmen criopreservado.

A dose inseminante de 20 milhões de espermatozoides totais foi efetiva para uso em IATF por laparoscopia em ovelhas.

## REFERÊNCIAS

- ABOAGLA, E. M. E.; TERADA, T. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, p. 1160-1172, 2004.
- AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S. A.; SAID, T. M. Prevention of cognitive stress injury to sperm. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 6, p. 654- 660, 2005.
- AHMAD, M. Z. A. A.; CHATAGNON, G.; AMIRAT-BRIAND, L.; MOUSSA, M.; TAINURIER, D.; ANTON, M.; FIENI, F. Use of glutamine and low density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 429-436, 2008.
- AISEN, E. G. Processamento e conservação do material seminal. In: AISEN, E. G. **Reprodução ovina e caprina**, 1.ed. São Paulo: MedVet, 2008. 203 p.
- AISEN, E. G.; VENTURINO, A. Coleta e avaliação do sêmen. In: AISEN, E.G. **Reprodução ovina e caprina**, 1.ed. São Paulo: MedVet, 2008. p. 57-73.
- AISEN, E. G.; ALVAREZ, H. L.; VENTURINO, A.; GARDE, J. J. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. **Theriogenology**, v. 53, p. 1053-1061, 2000.
- ALVAREZ, C. A.; MORAES, G. V. Efeitos da selenometionina e vitamina C sobre o sêmen. **Rev. Saúde e Biol.**, v. 1, n. 1, p. 42-51, 2006.
- ALVES, S. G. G. **Avaliação do sêmen de caprinos da raça boer por meio do teste hiposmótico**. 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, 2006.
- ANEL, L.; ALVAREZ, M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ANEL, E.; PAZ, P. Improvement strategies in ovine artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 41, p. 30-42, 2006.

- ANTUNES, R. C. Avanço tecnológico e aplicabilidade da técnica de congelamento de sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 60-63, 2007.
- ATESSAHIN, A.; BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; KIZIL, M. Effects of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat sêmen following the freeze-thawing process. **Small Ruminant Research**, v. 77, p. 38-44, 2008.
- AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 268-275, 2008.
- BAG, S.; JOSHI, A.; NAQVI, S. M. K.; RAWAT, P. S.; MITTAL, J. P. Effect of freezing temperature, at which strws were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 72, p. 175-183, 2002.
- BAILEY, J. L.; BILODEAU, J. F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 1, p. 1-7, 2000.
- BALLESTER, J.; JOHANNISSON, A.; SARAIVA, F., HAARD, M.; GUSTAFSSON, H.; BAJRAMOVIC, D.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Post-thaw viability of bull AI-doses with low-sperm numbers. **Theriogenology**, v. 68, p. 934-943, 2007.
- BARBAS, J. P.; MASCARENHAS, R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell and Tissue Banking**, 2007 DOI 101007/s10561-008-9081-4
- BARBOSA, F. F. S. **Influência dos antioxidantes na qualidade do sêmen de homens em tratamento de fertilidade**. 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.
- BARRETT, D. M. W.; BARTLEWSKI, P. M.; BATISTA-ARTEAGA, M.; SYMINGTON, A.; RAWLINGS, N. C. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500UI of eCG following a 12 day treatment with progestogen-releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes. **Theriogenology**, v. 61, p. 311-327, 2004.
- BARRETO, M. A. P.; SILVA, J. F. S.; FAGUNDES, B.; CAIADO, R. C.; SOUZA, G. V.; SHIMOYA, A. Efeito de proteínas do plasma seminal equino com massa superior a 10kDa concentradas 10 vezes sobre a congelabilidade do sêmen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 12, p. 2115-2119, 2008.
- BARROS, M. S. R. M. **Avaliação *in vitro* do sêmen caprino criopreservado em diluente acrescido de superóxido dismutase e catalase em diferentes concentrações**. 2010. 69 f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.
- BARROS, N. N.; VASCNCELOS, V. R.; WANDER, A. E.; ARAÚJO, M. R. A. Eficiência bioeconômica de cordeiros F<sub>1</sub> Dorper x Santa Inês para produção de carne. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 8, p. 825-831, 2005.
- BARROS, N. N.; VASCONCELOS, V. R.; ARAÚJO, M. R. A.; MARTINS, E. C. Influência do grupo genético e da alimentação sobre o desempenho de cordeiros em confinamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 9, p. 1111-1116, 2003.

BARTH, A.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames, IA: Iowa State University Press, 1989. 285 p.

BARTOLOME, J. A.; PEREZ WALLACE, S.; DE LA SOTA, R. L.; THATCHER, W. W. The effect of administering equine chorionic gonadotropin (eCG) and human chorionic gonadotropin (hCG) post artificial insemination on fertility of lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 78, p. 1110-1116, 2012.

BAUMBER, J.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M. C. G. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 6, p. 895-902, 2000.

BEILBY, K. H.; GRUPEN, C. G.; THOMPSON, P. C.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. The effect of insemination time and sperm dose on pregnancy rate using sex-sorted ram sperm. **Theriogenology**, v. 71, p. 829-835, 2009.

BEILBY, K. H.; de GRAAF, S. P.; GRUPEN, C. G. The effect of sperm and cryopreservation concentration on the freezing success of sex sorted ram sperm for *in vitro* fertilization. **Theriogenology**, v. 64, p. 786-794, 2010.

BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C.; MAIA, M. S.; GREEN, R. E.; RODELLO, L.; MEIRA, C. Avanços na criopreservação do sêmen ovino visando sua aplicação em programas de inseminação artificial e em biotecnologia com embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 3, p. 787-798, 2007.

BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO FILHO, A. L.; ALVES, S. G. G.; BISCARDE, C. E.; VASCONCELOS, M. F.; OBA, E. O efeito do tempo de equilíbrio sobre a qualidade do sêmen caprino criopreservado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 7, n. 1, p. 27-37, 2006.

BORGES, J. C.; SILVA, M. R.; GUIMARÃES, J. D.; ESPER, C. R.; FRANCESCHINI, P. H. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 3, p. 303-314, 2011.

BORGES, J. C. **Efeito da utilização de antioxidantes no diluente para a criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares, inseminação artificial e fecundação *in vitro***. 2008. 70 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP, 2008.

BOSCOS, C. M.; SAMARTZI, F. C.; DELLIS, S.; ROGGE, A.; STEFANAKIS, A. KRAMBOVITIS, E. Use of progestagen-gonadotrophin treatments in estrus synchronization of sheep. **Theriogenology**, v. 58, p. 1261-1272, 2002.

BUCAK, M. N.; ATESSAHIN, A.; YÜCE, A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram sêmen after the freeze-thawing process. **Small Ruminant Research**, v. 75, p. 128-134, 2008.

BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; SARIÖZKAN, S.; ULUTAS, P. A. Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. **Small Ruminant Research**, v. 81, p. 13-17, 2009.

BUENO, R.; COSTA, E. P.; GUIMARÃES, J. D.; VALENTIM, F. M. Qualidade espermática do sêmen criopreservado de cães II – Efeito do protocolo de resfriamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 3, 2001.

BYRNE, G. P.; LONERGAN, P.; WADE, M.; DUFFY, M.; DONOVAN, 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.

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

CAMPBELL, J. W.; HARVEY, T. G.; McDONALD, M. F.; SPARKSMAN, R. I. Transcervical insemination in sheep: an anatomical and histological evaluation. **Theriogenology**, v. 45, p. 1535-1544, 1996.

CARVALHO, F. P.; SILVA, J. F. S.; SOUZA, G. V.; QUIRINO, C. R.; CARVALHO, C. S. P. Diferentes diluentes sobre a motilidade e integridade de membrana plasmática após o congelamento e descongelamento de sêmen ovino. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 3, p. 612-620, 2008.

CASTELO, T. S.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen caprino. **Acta Veterinaria Brasília**, v. 2, n. 3, p. 67-75, 2008.

CASTILHO, E. F. **Uso da própolis e do ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino**. 2008. 49 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

CASTRO, S. R. S. **Uso de antioxidantes para elevação da qualidade do sêmen criopreservado de búfalos (*Bubalus bubalis*)**. 2010. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Pará, Belém, PA, 2010.

CATUNDA, A. G. V. **Composição bioquímica do plasma seminal de caprinos sem padrão racial definido (SPRD) em clima tropical úmido**. 2007. 45 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2007.

CEI – CENTRO DE ESTATÍSTICA E INFORMAÇÕES (BA). **Informações básicas dos municípios baianos: Região Nordeste**. Salvador, 1994.

CORDOVA-IZQUIERDO, A.; LOZANO ALVARADO, J. D.; RAMOS JIMÉNEZ, J. C.; CORTÉS SUAREZ, S. Addition of antioxidants in the diluter for the conservation in fresh of boar sêmen. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 6, n. 5, p. 621-626, 2007.

COTORRELLO, A. C. P.; HENRY, M. Princípios da criopreservação, congelamento e avaliação do sêmen equino (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 1, p. 15-25, 2002.

COX, J. F.; ALLENDE, R.; LARA, E.; LEIVA, A.; DÍAZ, T.; DORADO, J.; SARAVIA, F. Follicular dynamics interval to ovulation and fertility after AI in short-term progesterone and PGF2 $\alpha$  oestrous synchronisation protocol in sheep. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 946-951, 2012.

CURRY, M. R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 5, p. 46-52, 2000.

D'ALESSANDRO, A. G.; MARTEMUCCI, G.; COLONNA, M. A.; BELLITTI, A. Post-thaw survival of ram spermatozoa and fertility after insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender composition. **Theriogenology**, v. 55, p. 1159-1170, 2001.

De RENSIS, F.; VALENTINI, R.; GORRIERI, F.; BOTTARELLI, E.; LOPEZ-GATIUS, F. Inducing ovulation with hCG improves the fertility of dairy cows during the warm season. **Theriogenology**, v. 69, p. 1077-1082, 2008.

DELL'AQUA JÚNIOR, J. A.; PAPA, F. O.; ZAHN, F. S.; ALVARENGA, M. A.; LEONARDO, H. Novo teste osmótico de avaliação da integridade da membrana plasmática de sêmen congelado equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 3, p. 189 - 191, 2002.

DHAMI, A. J.; SAHNI, K. L.; MOHAN, G.; JANI, V. R. Effects of different variables on the freezability, post-thaw longevity and fertility of buffalo spermatozoa in the tropics. **Theriogenology**, v. 46, p. 109-120, 1996.

DIAS, F. E. F.; VILLARROEL, A. B. S.; FREITAS, V. J. F. Sincronização do estro e da ovulação em ovelhas: uma revisão. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 2, n. 1, p. 119-129, 2000.

DIAS, L. M. K. **Efeito da administração de hCG para indução de ovulação e estudo da dinâmica folicular no protocolo de nove dias de sincronização de estros em ovelhas santa inês**. 2011. 97 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2011.

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Insemination. In: EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Inseminación artificial de Ovejas y Cabras**. 4.ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1990. p. 143-165.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Ver. Ass. Med. Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; SANTOS, A. D. F.; ROVAY, H.; BORGES, A. M.; BARBOSA, L. P.; MAFFILI, V. V.; FRAGA, D. B. M. Hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, p. 436-438, 2001.

FUKUI, Y.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; HIWASA, M. Fertility of ewes inseminated intrauterinally with frozen semen using extender containing bovine serum albumin. **Journal Reproduction and Development**, v. 53, n. 4, p. 959-962, 2007.

FÜRST, R. **Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen equino**. 2006. 96 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG: 2006.

FRY, R. C.; CLARKE, I. J.; CUMMINS, J. T.; BINDON, B. M.; PIPES, L. R.; CAHILL, L. P. Induction of ovulation in chronically hypophysectomized Booroola ewes. **Journal of Reproduction & Fertility**, v 82, p. 711-715, 1988.

GARCEZ, M. E.; BRANCO, C. S.; LARA, L. V.; PASQUALOTTO, F. F.; SALVADOR, M. Effects of resveratrol in supplementation on cryopreservation medium of human semen. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 6, p. 2118-2121, 2010.

GARCIA, I. F. F.; PEREZ, J. R. O.; TEIXEIRA, J. C.; BARBOSA, C. M. P. Desempenho de cordeiros Texel x Bergamácia, Texel x Santa Inês e Santa Inês puros, terminados em confinamento, alimentados com casca de café como parte da dieta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 2, p. 564-572, 2000.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**, 7.ed., São Paulo: Manole, 2004. 513 p.

GÓMEZ-BRUNET, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; MONTORO, V.; GARDE, J.; PONS, P.; GONZÁLEZ-BULNES, A.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A. Reproductive performance and progesterone secretion in estrus-induced Manchega ewes treated with hCG at the time of AI. **Small Ruminant Research**, v. 71, p. 117-122, 2007.

GUASTI, P. N.; MONTEIRO, G. A.; PAPA, F. O. Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade de espermatozoides equinos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 2, p. 169-180, 2012.

GUERRA, M. M. P. Sincronização do estro na espécie caprina. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 3, n. 1, p. 48-53, 2000.

GUERRA, M. M. P.; CÂMARA, D. R.; SILVA, E. C. B.; SILVA, S. V. Uso de antioxidantes no sêmen ovino. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 354-364, 2012.

GUNDOGAN, M.; YENI, D.; AVDATEK, F.; FIDAN, A. F. Influence os sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, 2010. doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.08.012

HAFEZ, E. S. E. Preservação e criopreservação de gametas e embriões. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7.ed. Barueri: Manole, 2004. p. 435-469.

HAWK, H. W.; COPER, B. S.; CONLEY, H. H. Inibition of sperm transport and fertilization in superovulating ewes. **Theriogenology**, v. 28, n. 2, p. 139-153, 1987.

HENRY, M.; NEVES, J. P. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 51 p.

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, n. 1, p. 47-58, 2000b.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da pecuária municipal em 2010**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 07/1/2013.

JAINUDEEN, M. R.; WAHID, H.; HAFEZ, E. S. E. Indução da ovulação, produção e transferência de embriões. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7.ed. Barueri: Manole, 2004. p. 409-434.

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

JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Proteínas do plasma seminal relacionadas a congelabilidade do sêmen bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, supl., n. 6, p. 25-31, 2009.

KILLEN, I. D.; CAFFERY, G. J. Uterine insemination in ewes with the aid of laparoscope. **Australian Veterinary Journal**, p. 59-95, 1982.

LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48-54, 1997.

LEAHY, T.; MARTI, J. I.; MENDOZA, N.; PÉREZ-PÉ, R.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. High pré-freezing dilution improves post-thaw function of RAM spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 119, p. 137-146, 2010.

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

LEITE, P. A.; SCHREDER, G. G.; ALMEIDA, C. L. R.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; COSTA E SILVA, E. V. Criopreservação do sêmen bovino. **UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde**, v. 13, n. 4, p. 279-286, 2011.

LOPEZ-SEBASTIAN, A.; GOMEZ-BRUNET, A.; LISHMAN, A. W.; JOHNSON, S. K.; INSKEEP, E. K. Modification by propylene glycol of ovulation rate in ewes in response to a single injection of FSH. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 437-442, 1993.

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

LUZ, H. K. M.; WANDERLEY, L. S.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativa e embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, 2011.

- LYLE, S. K.; FERRER, M. S. Low-dose insemination – why, when and how. **Theriogenology**, v. 64, p. 572-579, 2005.
- MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; DIOGO, P.; DINIS, M. T.; HERRAÉZ, M. P.; SARASQUETE, C.; CABRITA, E. Incorporation of ascorbic acid and alfa tocopherol to the estender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. **Theriogenology**, v. 77, p. 1129-1136, 2012.
- MARTINS, R. D.; McMANUS, C.; CARVALHÊDO, A. S. et al. Avaliação da sazonalidade reprodutiva de carneiros Santa Inês criados no Distrito Federal. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 32, p. 1594-1603, 2003.
- MAXWELL, W. M. C.; JOHNSON, L. A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. **Theriogenology**, v. 52, p. 1353-1362, 1999.
- McINTOSH, J. E.; MOOR, R. M.; ALEN, W. R. Pregnant mare serum gonadotrophin: rate of clearance from the circulation of sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 44, p. 95-100, 1975.
- MEMON, A. A.; WAHID, H.; ROSINA, Y.; GOH, Y. M.; EBRAHIMI, M.; NADIA, F. M. Effect of ascorbic acid concentrations, methods of cooling and freezing on Boer goat sêmen cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, 2012a, doi:10.1111/j.1439-0531.2012.02155.x
- MEMON, A. A.; WAHID, H.; ROSINA, Y.; GOH, Y. M.; EBRAHIMI, M.; NADIA, F. M. Effect of antioxidants on post thaw microscopic, oxidative stress parameter and fertility of Boer goat spermatozoa in tris egg yolk glycerol estender. **Animal Reproduction Science**, v. 136, p. 55-60, 2012b.
- MILLER, D. J.; HUNTER, G. Effect of osmolarity and glicosaminoglycans on motility, capacitation, acrossome reaction, and *in vitro* fertilizability of bovine ejaculated sperm. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p. 2915-2924, 1986.
- MORAES, C. N.; NEVES, J. P.; GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, J. F. C.; SCHWEITZER, C. M. Criopreservação do sêmen ovino em *pellets* com etileno glicol. **Ciência Rural**, v. 28, n. 2, p. 287-292, 1998.
- 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**, v. 57, p. 1695-1706, 2002.
- MURPHY, B. D. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 223-230, 2012.
- NEVES, J. P.; NUNES, J. F.; MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H.; SALGUEIRO, C. C. M.; ALMEIDA, J. L. Inseminação Artificial em Pequenos Ruminantes. In: GONÇALVES, P. B. D.; FOGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 83-103.
- NUNES, J. F. Inseminação artificial em caprinos. In: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2002. 340 p.

- OHASHI, O. M. Inseminação artificial em bubalinos. In: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2002. 340 p.
- OHATA, P. M.; WENTZ, I.; BERNARDI, M. L.; CASTAGNA, C.; BORTOLOZZO, F. P. Viabilidade do sêmen suíno congelado submetido a um período de equilíbrio com ou sem a presença do plasma seminal. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 29, n. 2, p. 123-129, 2001.
- OLIVEIRA, R. A.; MAMEDE, A. G.; LIMA, S. F.; OLIVEIRA FILHO, B. D.; GAMBARINI, M. L. Antioxidante para criopreservação do sêmen equino em diferentes protocolos de congelamento. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 47., 2000, Salvador, Bahia. **Anais...** Salvador, BA, 2010.
- PAPA, F. O.; BICUDO, S. D.; ALVARENGA, M. A.; RAMIRES, P. R. N.; CARVALHO, I. M.; LOPES, M. D. Coloração espermática segundo Karras modificada pelo emprego do barbatimão (*Stryphmodendrum barbatiman*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 40, n. 2, p. 115-123, 1988.
- PEIXOTO, A. L. V. A.; MONTEIRO JR, P. L. J.; CÂMARA, D. R.; VALENÇA, R. M. B.; SILVA, K. M. G.; GUERRA, M. M. P. Efeito do tempo de incubação pós-descongelamento sobre a viabilidade de espermatozoides ovinos criopreservados com tris-gema suplementado com vitamina C e trolox. **Ciência Veterinária Tropical**, v. 11, n. 1, p. 16-24, 2008.
- PENÃ, F.J.; SARAVIA, F.; JOHANNISSON, A.; WALGREN, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 28, p. 107-114, 2005.
- PENITENTE FILHO, J. M. **Adição da vitamina E na criopreservação do sêmen caprino**. 2010. 65 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG: 2010.
- PERIS, S. I.; BILODEAU, J. F.; DUFOUR, M.; BAILEY, J. L. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p. 878-892, 2007.
- PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Rumin Res.**, v. 63, p. 215-225, 2006.
- RABASSA, V. R.; TABELÃO, V. C.; PFEIFER, L. F. M.; SCHNEIDER, A.; ZIGUER, E. A.; SCHOSSLER, E.; SEVERO, N. C.; DEL PINO, F. A. B.; CORRÊA, M. N. Efeito das técnicas transcervical e laparoscópica sobre a taxa de prenhez de ovelhas inseminadas em tempo fixo. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 1, p. 127-133, 2007.
- REVELL, S. G.; MRODE, R. A. An osmotic resistance test for bovine sêmen. **Animal Reproduction Science**, v. 36, p. 77-86, 1994.

RONDON, R. M. M.; ARAÚJO, A. A.; TONIOLLI, R.; RONDON, F. C. M. Perspectivas sobre o uso de antioxidantes na conservação do sêmen de suínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 3, p. 141-147, 2012.

RUBIANES, E. Nociones basicas de fisiologia reproductiva em cabras y ovejas. In: BARUSELLI, P.; MADUREIRA, E. H. **Controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes**. 1.ed. São Paulo: Fundação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, 2000. 332 p.

RUIZ, L. G.; SANTIANI, A. A.; SANDOVAL, R. M.; HUANCA, W. L.; DELGADO, A. C.; CORONADO, L. S.; ALZAMORA, C. P. Efecto de dos antioxidantes (TEMPO y TEMPOL) en la criopreservación de semen ovino empleando un dilutor en base a tris. **Ver. Inv. Vet. Perú**, v. 18, n. 2, p. 99-106, 2007.

SAEG, **Sistema de análise estatística e genética**. Viçosa-MG: Central de Processamento de Dados, 1999.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen: I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 37, p. 185-249, 1995.

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

SALMANI, H.; NABI, M. M.; VASEGHI-DODARAN, H.; RAHMAN, M. B.; MOHAMMADI-SANGCHESHMEH, A.; SHAKERI, M.; TOWHIDI, A.; SHAHNEH, A. Z.; ZHANDI, M. Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. **Small Ruminant Research**, 2013. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.samlrumres>>. Acesso em: 28.12.2012.

SANTINI, A.; RUIZ, F.; SANDOVAL, R.; EVANGELISTA, S.; URVIOLA, M.; CATAFORA, N.; CORONADO, L.; DELGADO, A. Incremento de la tasa de no retorno de celo em ovejas utilizando un antioxidante análogo de superóxido dismutasa (TEMPO) durante la criopreservación de semen. **Sitio Argentino de Producción Animal**, APPA-ALPA, 2007.

SENGER, P. L. Placentation the endocrinology of gestation and parturition. In: SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2.ed. Current Conceptions. 2003. p. 314-315.

SILVA MAIA, M. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluente aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), trolox-c e catalase**. 2006. 147 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2006.

SILVA MAIA, M.; BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C.; SOUSA, D. B.; RODELLO, L.; MEIRA, C. Efeito da adição de lauril sulfato de sódio (OEP) ao diluente na viabilidade do sêmen congelado de ovinos Santa Inês. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 3, p. 521-530, 2008.

SILVA MAIA, M.; BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C.; SICHERLE, C. C.; SOUSA, D. B.; RODELLO, L. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. **Small Ruminant Research**, v. 85, p. 85-90, 2009.

SILVA, L. D. M.; SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S. Inseminação artificial em cães. In: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2002. 340 p.

SIMONETTI, L.; FORCADA, F.; RIVERA, O.E.; CAROU, N.; ALBERIO, R.H.; ABECIA, J. A.; PALACIN, I. Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 227-237, 2008.

SINGH, L. P.; HARSHAN, H. M.; ANSARI, M. R. Effect of egg yolk and seminal plasma heparin binding protein interaction on the freezability of buffalo cauda epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 395-400, 2007.

SIQUEIRA, J. B.; GUIMARÃES, J. D.; COSTA, E. P.; HENRY, M.; TORRES, C. A. A.; SILVA, M. V. G. B.; SILVEIRA, T. S. 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 & Ciência Agropecuária**, v. 3, n. 2, p. 53-63, 2009.

SÖNMEZ, M.; DEMIRCI, E. The effect of ascorbic acid on the freezability of ram semen diluted with extenders containing different proportions of glycerol. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.**, v. 28, p. 893-899, 2004.

SORDILLO, L. M.; AITKEN, S. L. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, p. 104-109, 2009.

SPSS, Inc. **SPSS for windows base system user's guide release 5.0**. Chicago, 1992, 672 p.

THOMPSON, J.; MEYER, H. Body condition of sheep. Disponível em <<http://ir.library.oregonstate.edu>>. Acesso em: 7/8/2012.

TILBURG, M. F.; SLIVA, J. F. S.; DIAS, A. J. B.; QUIRINO, C. R.; FAGUNDES, B. Influência da insulina na congelabilidade do sêmen de ovino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 731-739, 2008.

TONIOLLI, R. Utilização de antioxidantes na preservação seminal em suínos. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 365-375, 2012.

UYSAL, O.; BUCAK, M. N. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram sêmen. **Acta Vet. Brno**, 2007. doi: 10.2754/avb200776030383

- VALENÇA, R. M. B.; GUERRA, M. M. P. Espécies reativas ao oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 47-53, 2007.
- VALENTE, S. S.; PEREIRA, R. M.; BAPTISTA, M. C.; MARQUES, C. C.; VASQUES, M. I.; SILVA PEREIRA, M. V. C.; HORTA, A. E. M.; BARBAS, J. P. *In vitro* and *in vivo* fertility of ram sêmen cryopreserved in different extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 117, p. 74-77, 2010.
- VALCÁRCEL, A.; HERAS, M. A.; MOSES, D. F.; BALDASSARRE, H. Comparison between Sephadex G-10 and percoll for preparation of normospermic, asthenospermic and frozen/thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 41, p. 215-224, 1996.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.
- VIANA, J. G. A.; SILVEIRA, V. C. P. Análise econômica da ovinocultura: estudo de caso na Metade Sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1187-1192, 2009.
- VILARIÑO, M.; RUBIANES, E.; MENCHACA, A. Ovarian responses and pregnancy rate with previously used intravaginal progesterone releasing devices for fixed-time artificial insemination in sheep. **Theriogenology**, v. 47, p. 206-210, 2013.
- VISHWANATH, R. Artificial insemination: the state of the art. **Theriogenology**, v. 59, p. 571-584, 2003.
- ZELEKE, M.; GREYLING, J. P. C.; SCHWALBACH, L. M. J.; MULLER, T.; ERASMUS, J. A. Effect of progestagen and PMSG on oestrous synchronization and fertility in Dorper ewes during the transition period. **Small Ruminant Research**, v. 56, p. 47-53, 2005.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60/61, p. 481-492, 2000.