



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

**QUALIDADE DO SÊMEN DE CARNEIROS SANTA INÊS
BASEADA EM ÍNDICES BIOCLIMÁTICOS E AVALIAÇÃO
DE PROTOCOLOS DE CONGELAÇÃO**

JULIO CONSTANTINO JERÍ MOLINA

2021



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

JULIO CONSTANTINO JERÍ MOLINA

**QUALIDADE DO SÊMEN DE CARNEIROS SANTA INÊS BASEADA EM ÍNDICES
BIOCLIMÁTICOS E AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE CONGELAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Doutor em Ciências”.

Orientador
Prof. Dr. Hymerson Costa Azevedo

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2021

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

M722q Molina, Júlio Constantino Jerí.
Qualidade do sêmen de carneiros Santa Inês baseada em índices bioclimáticos e avaliação de protocolos de congelação/ Júlio Constantino Jerí Molina ; orientador Hymerson Costa Azevedo. – São Cristóvão, SE, 2021.
74 f. : il.

Tese (doutorado em Agricultura e Biodiversidade) – Universidade Federal de Sergipe, 2021.

1. Carneiros. 2. Sêmen. 3. Espermatogênese em animais. I. Azevedo, Hymerson Costa, orient. II. Título.

CDU 636.32/.38

JULIO CONSTANTINO JERÍ MOLINA

**QUALIDADE DO SÊMEN DE CARNEIROS SANTA INÊS BASEADA EM ÍNDICES
BIOCLIMÁTICOS E AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE CONGELAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Doutor em Ciências”.

APROVADA em 30 de novembro de 2021.

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo
UNESP

Prof. Dr. Rui Machado
EMBRAPA

Prof. Dr. Anselmo Domingos Ferreira Costa
UFS

Profa. Dra. Larissa Pires Barbosa
UFRB



Prof. Dr. Hymerson Costa Azevedo
EMBRAPA/UFS
(Orientador)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

*A Deus, ao meu pai Julio Constantino Jerí
Elquera, a minha mãe Gerardina Molina
Torres, aos meus irmãos: Hector Emiliano,
Rolando Félix, Dante Daniel, e as minhas,
irmãs: Carolina Victoria, Maria Consuelo,
Violeta, Flor Miriam, Irma, Carmen e Pilar
Jerí Molina.*
Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, ao meu pai Julio Constantino Jerí Elguera, que sempre acreditou em mim e que me ensinou que através do estudo e da educação é que as pessoas chegam longe até onde elas quiserem. A minha mãe Gerardina Molina Torres, por ser o suporte da estrutura e o amor da minha família, que me diz que os sacrifícios ao final são recompensados.

As minhas irmãs Carolina Victoria, Consuelo, Violeta, Flor Mirian, Irma, Carmen e Pilar Jerí Molina, e aos meus irmãos Hector Emiliano, Rolando Felix e Dante Daniel Jerí Molina pelo amor e o apoio incondicional que sempre me brindaram através dos anos, ‘Obrigado’.

Ao meu orientador Dr. Hymerson Costa Azevedo, pelo apoio na parte acadêmica e pessoal, pela confiança e ensinamentos ao longo da pós-graduação.

Ao meu amigo Jonatan Mikhail del Solar Velarde, pela sua amizade, e por ser peça na minha adaptação na vida da pós-graduação. Aos meus amigos Alisson da Silva Santana, Ane Caroline Celestino, Ana Paula Santana, Emile Dayara, Valdir Pimenta, e em especial a Nance Watanabe e Ana Beatriz Watanabe pela amizade e pelos bons momentos da minha vida em Aracaju-Brasil.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Tabuleiros Costeiros – Aracaju, pelo fornecimento estrutural, tecnológico e apoio na pesquisa.

Aos meus amigos Davi Oliveira, Islam Dantas, Paulo Henrique e Matheus Batista que me acompanharam ao longo da pesquisa e pelo apoio e a convivência no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (Labra-EMBRAPA) e na vida diária.

Aos técnicos do LABRA e do Campo Experimental Pedro Arle (Núcleo de conservação de ovinos Santa Inês) pela colaboração na pesquisa.

À Universidade Federal de Sergipe e ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade (PPGAGRI) pela oportunidade de aprimoramento técnico-científico e experiência acadêmica.

À Organização de Estados Americanos (OEA), ao Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB) pela oportunidade de continuar meus estudos de pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq), à Fundação de Apoio à Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC/SE) – Brasil e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – Brasil (CAPES), pelo apoio tecnológico e econômico durante a pós-graduação.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	iii
LISTA DE SÍMBOLOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Resposta fisiológica dos animais ao efeito do estresse térmico de origem ambiental	3
2.2 Efeito do estresse térmico sobre o testículo e células germinativas	3
2.3 Índices bioclimáticos e sua relação com a fisiologia do animal	4
2.4 Efeitos da criopreservação sobre os espermatozoides de carneiros	5
2.5 Estratégias para melhorar o processo de criopreservação do sêmen	6
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	8
4. ARTIGO 1: ÍNDICES DE ESTRESSE TÉRMICO BIOCLIMÁTICO AO LONGO DO ANO E SUAS RELAÇÕES COM CARACTERÍSTICAS ANDROLÓGICAS CONSIDERANDO-SE O PERÍODO DA ESPERMATOGÊNESE E TRÂNSITO ESPERMÁTICO EM CARNEIROS.....	18
Resumo	18
Abstract.....	19
4.1. Introdução	19
4.2. Material e Métodos	20
4.2.1. Período e local experimental	21
4.2.2. Animais e manejo experimental	21
4.2.3. Avaliações reprodutivas	21
4.2.3.1 Avaliações clínico-andrológicas	21
4.2.3.2 Avaliações do sêmen	22
a. Volume seminal e concentração espermática	22
b. Morfologia espermática	22
c. Cinética espermática	22
4.2.4. Avaliações ambientais e cálculo dos índices bioclimáticos	22
4.2.5. Análises estatísticas	24
4.3. Resultados	24
4.4. Discussão	30
4.5. Conclusões	36
4.6. Agradecimentos.....	36
4.7. Referências.....	37
5. ARTIGO 2: INTERAÇÕES ENTRE DIFERENTES EXTENSORES À BASE DE LECITINA DE SOJA E TAXAS DE CONGELAÇÃO NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CARNEIRO.....	45
Resumo	45
Abstract.....	46
5.1. Introdução	46
5.2. Material e Métodos	47
5.2.1. Preparação dos extensores	48

5.2.2. Animais e colheita de sêmen	48
5.2.3. Triagem, congelamento e descongelamento do sêmen	48
5.2.4. Avaliações dos espermatozoides após a descongelamento	50
a. Motilidade massal e vigor espermáticos	50
b. Cinética espermática computadorizada	50
c. Integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides	51
d. Viabilidade espermática	51
e. Capacitação e reação acrossomal espermáticas	51
5.2.5. Delineamento experimental e análises estatísticas	51
5.3. Resultados	52
a. Motilidade massal e vigor espermáticos	52
b. Cinética espermática computadorizada	52
c. Integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides	54
d. Viabilidade espermática	56
e. Capacitação e reação acrossomal espermáticas	58
5.4. Discussão	59
5.5. Conclusões	63
5.6. Agradecimentos	64
5.7. Referências	64
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
7. ANEXOS	71
7.1 Preparo dos extensores à base de gema de ovo e lecitina de soja	71
7.2 Preparo de soluções para as análises espermáticas pós-descongelamento	73
7.3 Setup análise de sêmen- Sperm Class Analyzer	74

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Fig.		Página
1	Comportamento e frequências em que os Índices Bioclimáticos de Temperatura e Umidade (ITU), Temperatura Equivalente (ITE), Temperatura de Globo Negro e Umidade (ITGU) e Conforto Térmico (ICT) atingiram escalas de estresse térmico após sua mensuração nos períodos que compreenderam a espermatogênese (P45) e o trânsito dos espermatozoides no epidídimo (P15) que ocorreram antes das avaliações reprodutivas (ARe) de carneiros Santa Inês realizadas ao longo do primeiro (Q1), segundo (Q2) e terceiro (Q3) quadrimestre do ano.	25

ARTIGO 2

Fig.		Página
1	Características das curvas que compreenderam as taxas de congelção de 10, 20 e 60 °C/min obtidas a partir da exposição das palhetas contendo o sêmen às respectivas alturas de 7,5 (a), 4,5 (b) e 1,5 (c) cm acima do nível de nitrogênio líquido	50
2	Efeitos das interações entre diferentes extensores à base de gema de ovo (GO) e lecitina de soja (LS) e taxas de congelção sobre a motilidade massal (a) e vigor (b) dos espermatozoides no sêmen descongelado de carneiro	57
3	Efeitos das interações dos diferentes extensores à base de gema de ovo (GO) e lecitina de soja (LS) e taxas de congelção sobre os parâmetros da cinética espermática computadorizada: velocidades do percurso médio (VAP) e em linha reta (VSL), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN)	57
4	Efeitos das interações entre os diferentes extensores à base de gema de ovo (GO) e lecitina de soja (LS) e taxas de congelção sobre a percentagem de espermatozoides não-apoptóticos com membrana plasmática íntegra (A ⁺ /PI ⁻)	58
5	Efeitos das interações entre diferentes extensores à base de gema de ovo (GO) e lecitina de soja (LS) e taxas de congelção sobre as percentagens de espermatozoides não-capacitados (F) e com reação acrossomal (AR)	59

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela	Página
1 Variáveis ambientais básicas coletadas ao longo de 12 meses do experimento nos diferentes quadrimestres do ano.....	25
2 Correlações entre as variáveis ambientais básicas ao longo de 12 meses do experimento.....	25
3 Índices bioclimáticos ao longo dos quadrimestres do ano mensurados nos períodos que compreenderam a espermatogênese (P45) e o trânsito dos espermatozoides no epidídimo (P15) que ocorreram antes das avaliações reprodutivas de carneiros Santa Inês	26
4 Parâmetros das avaliações reprodutivas realizadas ao longo dos quadrimestres do ano do experimento em carneiros Santa Inês.....	28
5 Correlação entre os índices bioclimáticos mensurados nos períodos que compreenderam a espermatogênese (P45) e o trânsito dos espermatozoides no epidídimo (P15) que ocorreram antes das avaliações e os parâmetros reprodutivos de carneiros Santa Inês	29
6 Análise de regressão linear dos parâmetros reprodutivos em função dos índices bioclimáticos mensurados nos períodos que compreenderam a espermatogênese (P45) e o trânsito dos espermatozoides no epidídimo (P15) que ocorreram antes das avaliações reprodutivas de carneiros Santa Inês ...	30

ARTIGO 2

Tabela	Página
1 Análises estatísticas dos efeitos de extensores (Ex), taxas de congelação (TC) e da interação entre eles (Ex*TC) sobre os parâmetros espermáticos no sêmen descongelado de carneiros.....	54
2 Médias $\pm$ erros padrões dos parâmetros espermáticos no sêmen de carneiros submetidos à congelação após diluição em diferentes extensores à base de gema de ovo (GO) e lecitina de soja (LS).....	55
3 Médias $\pm$ erros padrões dos parâmetros espermáticos no sêmen de carneiros submetidos a diferentes taxas de congelação	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A ⁻ /PI ⁻	Espermatozoides não-apoptóticos com membrana plasmática íntegra
A ⁺ /PI ⁻	Espermatozoides em início de apoptose
A ⁺ /PI ⁺	Espermatozoides em apoptose tardia
A ⁻ /PI ⁺	Espermatozoides necróticos
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico <i>Adenosine monophosphate cyclic</i> (inglês)
ALH	Deslocamento lateral da cabeça (μm)
ARe	Avaliações Reprodutivas
AR	Padrão de reação acrossomal espermática - teste da CTC (%)
ASZ1	Proteína de repetição de Anquirina, SAM contendo domínio zipper de leucina básica 1 <i>Ankyrin repeat, SAM and basic leucine Zipper domain-containing protein 1</i> (inglês)
AT	Altura Testicular (cm)
ATP	Adenosina Trifosfato <i>Adenosine Triphosphate</i> (inglês)
B	Padrão de capacitação espermática - teste da CTC (%)
BCF	Frequência de batimento flagelar (%)
C	Concentrado de farelo de soja e milho
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – Brasil
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CEPA	Campo Experimental Pedro Arle
CE	Circunferência Escrotal (cm)
CEsp	Concentração Espermática (x10 ⁹ espermatozoides/mL)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetro
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil
CoQ10	Coenzima Q10
CTC	Clortetraciclina
Dma	Defeitos Espermáticos Maiores (%)
Dme	Defeitos Espermáticos Menores (%)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
EST	Espermatozoides Estáticos (%)
Ex	Extensor
F	Padrão de não-capacitação espermática - teste da CTC (%)
<i>F</i>	Teste <i>F</i>
FAPITEC	Fundação de Apoio à Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe
FSH	Hormônio Folículo estimulante
FV	Fonte de Variação
g	Grama
GC	Glicocorticoides
GL	Glincina-Leite
GnRH	Hormônio liberador de gonadotropinas
GO	Gema de ovo
HOST	Teste Hiposmótico
HSP	Proteína de choque térmico <i>Heat Shock Proteic</i> (HSP)
HYP	Hiperatividade (%)

IA	Inseminação Artificial
ICT	Índice de Conforto Térmico
IL-2	Interleucina-2
IL-6	Interleucina-6
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
ITE	Índice de Temperatura Equivalente
ITGU	Índice de Temperatura de Globo Negro e Umidade
ITU	Índice de Temperatura e Umidade
Kg	Kilograma
LDL	Lipoproteínas de Baixa Densidade <i>Low Density Lipoprotein</i> (Inglês)
LEN	Espermatozoides Lentos (%)
LH	Hormônio Luteinizante
LIN	Linearidade (%)
LPHSI	Índices de Estresse Térmico na Agricultura Pecuária e Aves <i>Livestock and Poultry Heat Stress Indices Agriculture</i> (Inglês)
LS	Lecitina de Soja
LT	Largura Testicular (cm)
m	Massa
Máx	Máximo
MED	Espermatozoides com velocidade média (%)
min	Minuto
Mín	Mínimo
mm	Milímetro
mM	Mili Molar
mOsm	Miliosmol
Mot	Motilidade massal (%)
MP	Motilidade Progressiva (%)
MT	Motilidade Total (%)
N ₂ L	Nitrogênio Líquido
PAC ₁	Receptor de polipeptídeo ativador de adenilato ciclase hipofisário tipo 1
PBS	Solução Tamponada Salina de Dulbecco <i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)
pH	Concentrações de íons de hidrogênio
PI	Iodeto de Propídio <i>Propidium Iodide</i> (inglês)
PMT	Proteína Mitocondrial Trifuncional
Ppv	Pressão parcial de vapor de água (kPa)
PR	Parâmetros Reprodutivos
Q1	Primeiro Quadrimestre
Q2	Segundo Quadrimestre
Q3	Terceiro Quadrimestre
RAP	Espermatozoides Rápidos (%)
RT	Radiação Térmica (w/m ² , kJ/m ²)
SCA	<i>Sperm Class Analyzer</i>
STR	Retilinearidade (%)
Ta	Temperatura do ar (°C, °F)
TC	Taxa de congelação (°C/min)
Tgn	Temperatura do globo negro (°C)
Tpo	Temperatura do ponto de orvalho (°C)
µg	Micrograma
µL	Microlitro

μm	Micrômetro
μm^2	Micrômetro quadrado
UR	Umidade Relativa (/100, %)
v	Volume
V	Velocidade do vento (m/s)
VAP	Velocidade do percurso médio ($\mu\text{m/s}$)
VCL	Velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$)
VE	Volume do Sêmen Ejaculado (mL)
Viab	Espermatozoides viáveis (%)
Vig	Vigor (0-5)
Vo	Volumoso de silagem de milho
VSL	Velocidade em linha reta ($\mu\text{m/s}$)
VT	Volume Testicular (cm^3)
WOB	Índice de oscilação ou wobble (Hz)
11 β -HSD	11 β -hidroxiesteroide desidrogenase

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	graus centígrados
$\pm$	mais ou menos
>	maior
<	menor
$\leq$	menor ou igual
$\geq$	maior ou igual
=	igual
+	mais / positivo
$^{\circ}$	grau
-	menos / negativo
®	marca registrada
X	vezes

RESUMO

MOLINA, Julio Constantino Jerí. **Qualidade do sêmen de carneiros Santa Inês baseada em índices bioclimáticos e avaliação de protocolos de congelação.** São Cristóvão: UFS, 2021. 74p. (Tese-Doutorado em Agricultura e Biodiversidade).*

A qualidade do sêmen de carneiros em países tropicais é ameaçada pelo estresse ambiental e pelos danos espermáticos na congelação, ensejando o maior conhecimento da influência do ambiente sobre aspectos reprodutivos e o aperfeiçoamento dos protocolos de criopreservação. Neste sentido, o estudo teve como objetivos: i) identificar a melhor época do ano para a colheita de sêmen *in natura* e, ii) determinar o efeito da interação entre extensores e taxas de congelação sobre a qualidade do sêmen congelado-descongelado de carneiros. Foram estudadas as relações entre os índices bioclimáticos que medem o estresse térmico e os parâmetros reprodutivos (PR) de carneiros (n=25) Santa Inês criados no Nordeste brasileiro. Os índices de Temperatura e Umidade (ITU), Temperatura Equivalente (ITE), Temperatura de Globo Negro e Umidade (ITGU), e Conforto Térmico (ICT) foram calculados considerando o período prévio da espermatogênese (P45) e trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo (P15), no primeiro (Q1), segundo (Q2) e terceiro (Q3) quadrimestre do ano. As análises dos PR foram feitas usando o modelo misto, e sua variação entre quadrimestres foi determinada pelo Teste de Tukey/Dunn. Os piores PR de cinética espermática foram encontrados no Q1 em relação ao Q2 e Q3 ($p < 0.05$). Todos os índices avaliados apresentaram relação antagônica com a maioria dos PR. O ITGU e ICT apresentaram relação negativa com as velocidades curvilínea, linear e do percurso médio (VCL, VSL e VAP), e positiva com espermatozoides lentos no P45 e P15. O ITGU e ICT classificaram o ambiente de maneira mais coerente com o comportamento da cinética espermática, que foi afetada quando no P45 e P15 estes índices ficaram acima de 83 e 41, respectivamente, considerados níveis perigosos e de desconforto nos ovinos. Também foram estudados os efeitos da interação entre quatro extensores (Fator 1) à base de lecitina de soja (0,5, 1,0 e 2,0%) e de gema de ovo a 20% (controle), e três taxas de congelação (Fator 2) de 10, 20 e 60 °C/min sobre os parâmetros espermáticos (PE) no sêmen descongelado de carneiros Santa Inês (36 pools de ejaculados de 12 carneiros). Os efeitos dos fatores e sua interação foram analisados pela ANOVA seguindo o delineamento fatorial 4x3, e pelo Teste *F*. As diferenças entre os grupos experimentais foi determinada pelo Teste Tukey. As análises de cinética espermática computadorizada, citometria de fluxo e técnicas de fluorescência permitiram identificar que as amostras provenientes da interação gema de ovo a 20% e a taxa de congelação de 60 °C/min apresentaram maiores percentagens de espermatozoides com melhores parâmetros cinéticos, não-apoptóticos com membrana íntegra, não-capacitados, e menores com acrossomo reagido, demonstrando que esta interação protege melhor os espermatozoides no sêmen congelado de carneiros. Com base nos resultados do estudo, podem ser usadas estratégias de melhoria da qualidade do sêmen *in natura* colhendo-o entre o segundo e terceiro quadrimestre do ano. Adicionalmente, recomenda-se o uso do extensor à base de gema de ovo a 20% associado à taxa de congelação de 60 °C/min para a congelação do sêmen de carneiros.

Palavras-chave: espermatogênese, estresse térmico, gema de ovo, viabilidade espermática, taxa de congelação, lecitina de soja.

* Comitê Orientador: Hymerson Costa Azevedo – UFS (Orientador).

ABSTRACT

MOLINA, Julio Constantino Jerí. **Quality of Santa Ines ram semen based on bioclimatic indices and evaluation of freezing protocols.** São Cristóvão: UFS, 2021. 74p. (Thesis/Doctor of Science in Agriculture and Biodiversity).*

The quality of ram semen in tropical countries is threatened by environmental stress and sperm damage from freezing, leading to the need for greater knowledge of the effect of the environment on reproductive aspects and improvement of cryopreservation protocols. In this sense, the aim of this study was i) to identify the best time of year to collect fresh semen and ii) to determine the effect of the interaction between extenders and freezing rates on the quality of frozen-thawed ram semen. The relationships between bioclimatic indices that measure heat stress and the reproductive parameters (RP) of Santa Inês rams ($n = 25$) raised in the Northeast region of Brazil were studied. The indices of Temperature and Humidity (THI), Equivalent Temperature (ETI), Black Globe Temperature and Humidity (BGTHI), and Thermal Comfort (TCI) were calculated considering the previous period of spermatogenesis (P45) and period of sperm transit through the epididymis (P15) in the first (Q1), second (Q2), and third (Q3) four-month period of the year. RP analyses were performed using the mixed model, and their variation between four-month periods was determined by the Tukey/Dunn test. The sperm kinetic RP in Q1 were worse than in Q2 and Q3 ($p < 0.05$). All indices evaluated showed an antagonistic relationship with most RP. The BGTHI and TCI showed a negative relationship with the curvilinear, straight line, and average path velocities (VCL, VSL, and VAP) and a positive relationship with slow spermatozoa in P45 and P15. The BGTHI and TCI classified the environment more consistently with the response of sperm kinetics, which were affected when the index was above 83 in P45 and above 41 in P15; these levels are considered dangerous and uncomfortable for sheep. We also evaluated the effects of the interaction between four extenders (Factor 1), with a base of soybean lecithin (0.5, 1.0, and 2.0 %) and 20% egg yolk (control), and three freezing rates (Factor 2), of 10, 20, and 60 °C/min, on the sperm parameters (SP) in the thawed semen of Santa Inês rams (36 pools of ejaculates from 12 rams). The effects of the factors and their interactions were analyzed by ANOVA following a 4×3 factorial design, and by the F Test. The differences between the experimental groups were determined by the Tukey Test. The analyses of computerized sperm kinetics, flow cytometry, and fluorescence techniques allowed semen samples from the 20% egg yolk and the 60 °C/min interaction to be identified as having higher percentages of sperm with better kinetic parameters that were non-apoptotic with intact membrane, were non-capacitated, and were smaller with acrosome reaction, showing that this interaction better protects sperm in the frozen ram semen. Based on the results of the study, strategies can be used to improve the quality of fresh semen, collecting it between the second and third four-month period of the year. Additionally, use of a 20%-egg-yolk-based extender associated with a freezing rate of 60 °C/min is recommended for freezing ram semen.

Keywords: spermatogenesis, heat stress, egg yolk, sperm viability, freezing rate, soybean lecithin

* Supervising Committee: Hymerson Costa Azevedo – UFS (Advisor).

1. INTRODUÇÃO GERAL

As mudanças climáticas no mundo foram sempre frequentes ao longo do tempo, mas nas últimas décadas foram se acentuando aceleradamente principalmente pelos impactos das atividades humanas sobre os sistemas biofísicos (BURTON; EBI; MCGREGOR, 2009). O efeito direto das mudanças climáticas sobre a saúde do animal é devido principalmente ao aumento da temperatura, frequência e intensidade de ondas de calor (GAUGHAN et al., 2009), assim como pela interação de outras variáveis ambientais como a radiação térmica e umidade relativa.

Estas mudanças expõem os animais a condições de estresse térmico ambiental que, dependendo da sua duração e intensidade, podem afetar negativamente a reprodução (VAN WETTERE et al., 2021) e, consequentemente, os desempenhos produtivos do indivíduo (LACETERA, 2019) e do sistema de produção (VICENTE PÉREZ et al., 2020). Os animais sofrem consequências das alterações metabólicas (HABEEB; GAD; ATTA, 2018), estresse oxidativo, supressão imunológica (SEVI; CAROPRESE, 2012), chegando em situações críticas até a sua morte (PHILLIPS, 2016) em decorrência do estresse térmico ambiental.

O crescimento e persistência ao longo do tempo de uma determinada população (WALSH et al., 2019), assim como o sucesso e a sustentabilidade do sistema de produção pecuário, estão intimamente relacionados com a eficiência reprodutiva (GOOTWINE, 2016), que é ameaçada pelo estresse térmico ambiental sofrido pelo animal, que foi identificado como uma das chaves na vulnerabilidade da indústria ovina de carne e de lã (CRIMP et al., 2010; ELDRIDGE; BEECHAM, 2018).

Carneiros submetidos à estresse térmico apresentam prejuízos aos espermatozoides com a diminuição do potencial de membrana nas mitocôndrias (HAMILTON et al., 2016a) e na motilidade total (AMIRI et al., 2020; HOWARTH, 1969), assim como incremento da apoptose e da fragmentação de DNA (HAMILTON et al., 2018), relacionados principalmente aos danos ocasionados pelo aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) na membrana plasmática, mitocondrial e nuclear (LEN; KOH; TAN, 2019). Diante destes impactos é necessário desenvolver estratégias para mensurar e prever o efeito do estresse térmico de origem ambiental sobre a reprodução com aplicação e uso de modelos de predição, a exemplo dos índices bioclimáticos que são formados pela combinação e relativização das variáveis ambientais, sendo assim usados para avaliar ambientes estressores aos animais (SILVA; MAIA, 2013) em longos e curtos períodos de tempo (RAHIMI et al., 2021).

O conhecimento do ambiente no sistema produtivo pecuário pela aplicação dos índices bioclimáticos é estratégico para a tomada de decisões (BISWAL; VIJAYALAKSHMY; RAHMAN, 2021) e para estabelecer e implementar práticas de manejo dos animais com base no conforto térmico (HAHN et al., 2009). Também é importante para caracterizar ambientes confortáveis ao longo do ano a fim de explorar o máximo potencial produtivo (RAMÓN et al., 2016) e, particularmente, reprodutivo dos animais (ROMO-BARRON et al., 2019), a exemplo da melhor qualidade do sêmen.

As biotecnologias reprodutivas como a criopreservação de sêmen (NTEMKA et al., 2018), sincronização de estro (SILVA et al., 2020), inseminação artificial (MAXWELL, 1986), superovulação, colheita e produção *in vivo* e transferência de embriões e produção *in vitro* de embriões (GIBBONS et al., 2019), são algumas das ferramentas para tentar incrementar a eficiência reprodutiva dos animais mesmo em condições de estresse térmico ambiental (HUFANA-DURAN; DURAN, 2020) ou mesmo amenizar e compensar seus efeitos em benefício da produção e conservação da biodiversidade animal.

A criopreservação de sêmen deve considerar que espermatozoides submetidos ao estresse térmico durante a espermatogênese são mais suscetíveis a sofrerem os efeitos negativos da congelação e descongelação (GARCIA-OLIVEROS et al., 2020). Este problema é ainda mais agravado em ovinos pelo fato dos espermatozoides desta espécie, quando submetidos ao processo de criopreservação, sofrerem mais alterações estruturais e funcionais

apresentando menor qualidade pós-descongelamento quando comparados com espermatozoides de touros (KHALIL et al., 2018), coelhos (YOUNAN et al., 2021), galos (REZAIE et al., 2021), devido principalmente a diferenças na composição e proporção de lipídeos, colesterol e proteínas nas suas membranas plasmáticas (HINKOVSKA-GALCHEVA; PETKOVA; KOUMANOV, 1989; PARKS; LYNCH, 1992).

Assim, além da necessidade da monitoração bioclimática e aplicação de práticas de manejo reprodutivo e biotecnológicas que minimizem os efeitos do estresse térmico, devem ser também consideradas estratégias específicas para melhoria do desempenho do sêmen congelado de ovinos. Estas estratégias para a melhoria do processo de criopreservação de sêmen de carneiros têm sido baseadas em conhecimentos nas diferentes áreas como a biologia, física e química e aplicação de tecnologias biofísicas e bioquímicas com a finalidade de obter espermatozoides de boa qualidade com capacidade fertilizante após a descongelamento (NTEMKA et al., 2018). Dentre as estratégias bioquímicas estudadas tem-se a modificação de meios diluidores, também denominados diluentes ou extensores para sêmen congelado cujo conteúdo é composto de agentes tampões, crioprotetores, açúcares, fosfolipídios, sais e antioxidantes, os quais ajudam os espermatozoides a suportarem o estresse térmico ocasionado pelas baixas temperaturas empregadas no processo de criopreservação (SALAMON; MAXWELL, 1995; SHAHRAM et al., 2012).

Extensores à base de gema de ovo (GO) são comumente usados na diluição do sêmen por possuírem lipoproteínas de baixa densidade (LDL) que cumprem a função de proteção e restauração da membrana plasmática dos espermatozoides durante a criopreservação (MOUSSA et al., 2002), com a vantagem de baixo custo e desvantagem de ser de origem animal com risco de constituir-se em fonte de transmissão de doenças e de bactérias que podem gerar substâncias, a exemplo das endotoxinas que provocam alterações funcionais com efeitos negativos nos espermatozoides (BOUSSEAU et al., 1998). Alternativas de adição de substâncias exógenas de origem vegetal em substituição à GO, a exemplo da lecitina de soja, têm sido estudadas na criopreservação de sêmen de touros (EL-SISY et al., 2016), bodes (VIDAL et al., 2013) e coelhos (YOUNAN et al., 2021), com resultados semelhantes na manutenção das características dos espermatozoides em relação a outros extensores.

Dentre as estratégias biofísicas para melhoria do processo de criopreservação do sêmen, os ajustes nas taxas de congelamento podem garantir uma melhor manutenção e maior recuperação da estrutura e função dos espermatozoides após a descongelamento. Combinada ao extensor, a taxa de congelamento ideal deve manter a membrana plasmática íntegra, permitindo uma desidratação suficiente dos espermatozoides para prevenir a formação prematura de gelo intracelular (BAKHACH, 2009). Um protocolo efetivo para criopreservação de sêmen na espécie ovina ainda não foi padronizado, e os que têm sido utilizados ainda demandam muitos ajustes, pois a maioria apresenta proporções altas de espermatozoides danificados e mortos após a descongelamento. Isso ocorre devido, principalmente, a diversos fatores internos como a composição estrutural da sua membrana plasmática, os quais interagem de maneira diferente quando desafiados a fatores externos, a exemplo do extensor, taxa de congelamento e suas interações.

De maneira geral, a melhoria da qualidade do sêmen fresco e congelado de carneiros depende do uso de diversas estratégias, primeiramente com a monitoração das condições climáticas e escolha dos melhores momentos para a produção de espermatozoides e colheita de sêmen *in natura* de boa qualidade e, posteriormente, utilizando protocolos de criopreservação bem ajustados com a finalidade de obter espermatozoides de melhor qualidade após a descongelamento. Assim, estas estratégias em conjunto poderão garantir a fertilização e desenvolvimento do embrião no manejo e na aplicação das biotecnologias reprodutivas. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivos identificar a melhor época do ano para a reprodução e colheita de sêmen *in natura* de qualidade, e promover melhorias no protocolo de criopreservação pela determinação do efeito do uso de diferentes extensores e taxas de congelamento sobre a qualidade do sêmen descongelado de carneiros Santa Inês.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Resposta fisiológica dos animais ao efeito do estresse térmico de origem ambiental

A resposta dos animais às altas temperaturas, umidades e intensidades de radiação térmica levam à ativação do sistema nervoso autônomo (SNA) mediada pela resposta adrenérgica das catecolaminas adrenalina ou epinefrina e noradrenalina ou norepinefrina produzidas na medula das glândulas supra-renais, e que conjuntamente com o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), produzido na adeno-hipófise, são encarregadas do incremento da taxa respiratória, cardíaca, temperatura corporal, e do fluxo sanguíneo das vísceras até a pele com a finalidade de manter a termorregulação (GONZALEZ-RIVAS et al., 2020).

Além disso, as catecolaminas promovem a utilização da energia das reservas corporais (SEJIAN et al., 2018) pelo seu efeito de ligação sobre os receptores- β_2 , os quais iniciam a reação de cascata mediada pelo adenosina monofosfato cíclico (AMPC), inibindo a enzima glicogênio sintetase e ativando a enzima glicogênio fosforilase que traz como resultando a inibição da glicogênese e ativação da glicogenólise muscular nos animais promovendo quebra e oxidação de proteínas (BURT et al., 2007).

Adicionalmente, é desencadeada a liberação dos glicocorticoides (GC) do córtex da supra-renal na corrente sanguínea, como é o caso do hormônio cortisol (POOLE; ERICKSON, 2015) responsável pela sinalização na regulação positiva e negativa dos sistemas fisiológicos relevantes imune e metabólico, assim como no comportamento reprodutivo do animal (WINGFIELD; ROMERO, 2001). Níveis altos e por tempos prolongados de GC levam ao aumento na produção das citocinas inflamatórias, criando um desbalanço da homeostase com a redução da interleucina-2 (IL-2), fator importante na proliferação de linfócitos T, o que por sua vez reduz a produção da interleucina-6 (IL-6), importante no desenvolvimento e proliferação de células neuronais, hepáticas, megacariócitos, osteoclastos e das células B, o que justifica a depressão do sistema imunológico (VITLIC; LORD; PHILLIPS, 2014).

Os altos níveis de GC também inibem a secreção do hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH), do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH), com a cessação da função reprodutiva (OAKLEY et al., 2009; WHIRLEDGE; CIDLOWSKI, 2013). Níveis elevados de GC são também associados com a diminuição da biossíntese da testosterona pelas células de Leydig. O grau de inibição dos GC sobre as células de Leydig é determinado pela sua concentração intracelular e pela atividade oxidativa da 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase (11 β -HSD), enzima encarregada das reações de oxidação e redução dos GC (GE et al., 1997).

2.2 Efeito do estresse térmico sobre o testículo e células germinativas

O funcionamento normal da espermatogênese depende da termorregulação testicular, que mantém a temperatura do testículo de 2 a 6 °C abaixo da temperatura corporal (KASTELIC et al., 1996; KASTELIC; COOK; COULTER, 1996). Os testículos normalmente produzem altos níveis de espécies reativas do oxigênio (EROs), sendo mais vulneráveis aos danos oxidativos em comparação com outros tecidos, mas estes efeitos podem ser amenizados pela sua maior capacidade antioxidante que pode ser potencializada por uma dieta rica em antioxidantes (SIMMONS; LOVEGROVE; LYMBER, 2018).

O estresse térmico por longos períodos de tempo reduz a atividade do sistema antioxidante testicular em nível celular, incluindo a diminuição dos níveis da glutathione peroxidase (GSH-Px), superóxido dismutase (SOD), redução na expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), assim como o aumento da lipoperoxidação, degeneração mitocondrial, fragmentação do DNA pelo aumento da atividade enzimática da

desoxinucleotidil transferase (dUTP) e dilatação do retículo endoplasmático liso das células de Sertoli (SC) e espermátides (KANTER; AKTAS; ERBOGA, 2013).

O incremento dos níveis das EROs e a queda dos antioxidantes geram um desequilíbrio com o incremento na proporção de radicais livres (íon hidroxila, superóxido, óxido nítrico etc.) nos espermatozoides, os quais, por possuírem membranas plasmáticas ricas em ácidos graxos polinsaturados (PUFAs), são suscetíveis à lipoperoxidação (BANSAL; BILASPURI, 2011). Espermatozoides de carneiros Santa Inês submetidos à lipoperoxidação apresentaram baixo potencial mitocondrial, danos na membrana espermática e no acrossoma, e incremento da expressão da protamina 1 mRNA (HAMILTON et al., 2016b), encarregada da proteção fundamental dos espermatozoides (AKMAL et al., 2016). Em adição, demonstrou-se que as SC responsáveis pela proteção das células germinativas sofrem alterações metabólicas pela despolarização e oxidação na membrana mitocondrial (VALLÉS; AVELDAÑO; FURLAND, 2014). Assim, também existem danos no DNA dos espermátócitos e espermátides arredondadas pelo incremento dos EROs (HOUSTON et al., 2018), o que explicaria a diminuição da sobrevivência e suscetibilidade das células germinativas quando submetidas ao estresse térmico.

2.3 Índices bioclimáticos e sua relação com a fisiologia do animal

Os índices que descrevem riscos do estabelecimento de estresse térmico nos animais podem ser categorizados em três grupos: racionais, empíricos e diretos. Os dois primeiros grupos são índices sofisticados que combinam variáveis ambientais e fisiológicas, são difíceis de calcular e não são viáveis para seu uso diário, já o último grupo compreende índices simples baseados no uso de dados das variáveis básicas ambientais e assim podem ser relacionados e correlacionados com o comportamento fisiológico do animal (EPSTEIN; MORAN, 2006; SILVA; MAIA, 2013). O desenvolvimento dos índices de estresse térmico começou décadas atrás com os primeiros trabalhos de Hazel (1943) na seleção desta ferramenta para o melhoramento genético de animais, e com o comportamento e desempenho reprodutivo de gado de leite (RHOAD, 1944).

Dentre os mais usados, encontra-se o Índice de Temperatura e Umidade (ITU) proposto por Thom (1959), baseado nas mensurações da temperatura do ar e umidade relativa. O ITU foi inicialmente concebido como índice de conforto térmico para humanos e, posteriormente, realizaram-se modificações para seu uso como indicador de risco de estresse em animais (BIANCA, 1962; KELLY; BOND, 1971; YOUSEF, 1985; LPHSI, 1990; BERMAN et al., 2016), sendo aplicado na avaliação do ambiente nas distintas regiões do mundo por apresentar correlações negativas significativamente baixas com concentração e defeitos espermáticos em touros (FREITAS et al., 2020), e correlações positivas médias a altas com as frequências respiratória e cardíaca e temperatura retal dos animais. Apesar disso, existem controvérsias quanto à aplicação do ITU para identificação de risco de estresse térmico nos animais criados extensivamente no campo ao ar livre, já que este índice não considera variáveis ambientais importantes como a radiação térmica e a velocidade do vento que podem afetar os sistemas termoregulatórios e gerar consequências em relação ao conforto térmico dos animais (WALSBERG; WOLF, 1995).

O Índice de Temperatura Equivalente (ITE) proposto pelo Baêta et al. (1987) considera a velocidade do vento (V) em sua fórmula, característica com potencial de amenizar altas temperaturas (CENA; MONTEITH, 1975) e que está relacionada a um melhor ajuste na determinação do ambiente de desconforto dos animais (MADER; DAVIS; BROWN-BRANDL, 2006). O ITE é indicado como um dos melhores índices usados na avaliação de ambientes próximos à linha equatorial, já que apresenta correlações significativas baixas e médias com a temperatura do corpo e taxa respiratória no gado leiteiro criado no trópico (SILVA; MORAIS; GUILHERMINO, 2007), e principalmente no gado de corte que

apresentou correlação positiva significativa e alta com os defeitos morfológicos maiores dos espermatozoides de touros da raça Nelore e Bradford (MENEGASSI et al., 2016).

O Índice de Temperatura de Globo Negro e Umidade (ITGU), proposto por Buffington et al. (1981), é outra alternativa com alto potencial para ser usado em ovinos, já que apresentou altas correlações positivas com a temperatura da pele da região do flanco traseiro e na garupa, avaliados em cordeiros Santa Inês, Bergamácia, Ile de France, Santa Inês x Bergamácia, Bergamácia x Ile de France e Santa Inês x Ile de France (PAIM et al., 2012). Em adição, o ITGU é considerado um dos melhores índices na avaliação de sistemas de criação extensiva ou mesmo confinado em locais com carga térmica elevada, já que dependem da temperatura do globo negro (Tgn), medida capaz de inferir sobre a homeotermia dos animais (SANTOS; CABRAL, 2021).

O incremento do Tgn apresentou alta relação com o aumento da frequência cardíaca e respiratória, temperatura retal e da pele de carneiros da raça Santa Inês em ambiente controlado (EUSTÁQUIO FILHO et al., 2011), assim como o aumento da temperatura retal em ovinos Santa Inês e do cruzamento Dorper x Santa Inês criados extensivamente em regiões semiáridas (FURTADO et al., 2017). O ITGU classificou de maneira lógica ambientes de sistemas silvipastoris e de monocultivos, que por sua parte tiveram relação significativa com as mudanças dos valores fisiológicos de temperatura retal, frequências respiratória e cardíaca de cordeiros Santa Inês x Dorper (VIEIRA et al., 2021).

O Índice de Conforto Térmico (ICT) foi desenvolvido para ovinos por Silva e Barbosa (1993), e considera em sua fórmula a temperatura do ar, umidade relativa, radiação térmica e velocidade do vento, sendo o mais usado na região subtropical do sudeste do Brasil. Posteriormente, o ICT foi modificado e validado pela sua correlação positiva média e baixa, altamente significativa com a taxa respiratória e a temperatura retal nas raças ovinas Corriedale, Ideal e Suffolk (BARBOSA; SILVA, 1994).

Já na raça Santa Inês criada na região Nordeste do Brasil, o ICT apresentou correlações positivas significativas médias com a temperatura retal e frequência respiratória em carneiros de pelagem preta, castanha e branca (NEVES et al., 2009). Adicionalmente, o valor do ICT apresentou alta correlação positiva significativa com temperatura termográfica mensurada na pele da região do nariz, cabeça, pescoço, flanco traseiro e frontal em cordeiros Santa Inês, Bergamácia, Ile de France, Santa Inês x Bergamácia, Bergamácia x Ile de France e Santa Inês x Ile de France (PAIM et al., 2012).

O desenvolvimento dos sistemas produtivos nas distintas regiões do mundo é possível em especial devido à grande diversidade genética dos animais que são fenotípica e geneticamente diferentes e que interagem de uma maneira distinta aos diferentes ambientes e mudanças ambientais. Portanto, deve-se estudar a aplicação destes índices bioclimáticos em diferentes situações que considerem tanto a diversidade de ambientes como de raças, com a finalidade de determinar o melhor índice a ser usado para monitorar o estresse térmico que afeta os ovinos de um determinado sistema produtivo. Ovinos da raça Santa Inês mostraram alta adaptabilidade em situações de estresse, já que conseguiram manter os parâmetros fisiológicos e sanguíneos dentro dos valores de referência (SEIXAS et al., 2016), sendo importantes em programas de seleção e nos sistemas de produção com o acasalamento com outras raças nas regiões áridas e semiáridas no mundo (MCMANUS et al., 2020).

2.4 Efeitos da criopreservação sobre os espermatozoides de carneiros

A membrana plasmática dos espermatozoides é composta principalmente por uma bicamada lipídica onde estão inseridas proteínas, glicolipídios e glicoproteínas que interagem e são encarregadas de manter a estabilidade estrutural e o funcionamento normal destas células (JONES, 2002). A composição da bicamada lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides sofre variação fisiológica normal no percurso de seu desenvolvimento (túbulo seminífero, cabeça, corpo e cauda do epidídimo). No início, quando os

espermatozoides ovinos ficam livres no túbulo seminífero, a membrana plasmática está composta pelos fosfolipídios etanolamina e fosfoglicerídeos de colina em aproximadamente 70 a 80%, e de esteróis com a maior proporção do colesterol em relação ao desmosterol, logo no seu trânsito e maturação pelo epidídimo, estas proporções vão decrescendo pela diminuição dos teores da etanolamina e do colesterol, já o teor do demosterol chega a ser insignificante na cauda do epidídimo (PARKS; HAMMERSTEDT, 1985).

Espermatozoides de carneiros submetidos ao processo de congelamento sofrem variações anormais principalmente na composição dos fosfolipídios na membrana plasmática com a diminuição na quantidade do fosfatidilglicerol, fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina. Em adição, também é afetada a distribuição de compostos entre a monocamada interna e externa, com a externalização dos fosfoglicerídeos, como a fosfatidilserina e o fosfatidilglicerol (HINKOVSKA-GALCHEVA; PETKOVA; KOUMANOV, 1989). Complementarmente o estresse gerado pelas baixas temperaturas ao longo do processo da criopreservação contribui para o incremento da produção de EROs com efeitos negativos sobre a membrana plasmática (LEN; KOH; TAN, 2019), iniciando o processo de lipoperoxidação, oxidação de proteínas, induzindo danos aos ácidos nucleicos do DNA (BALDI et al., 2020).

Espermatozoides de carneiros apresentam maior vulnerabilidade ao sofrerem lipoperoxidação pelas EROs, por possuírem maior proporção de ácidos graxos polinsaturados:saturados, com consequente apoptose, senescência e morte celular (EVENSON; JOST, 2000). Em adição, o baixo teor do colesterol na membrana plasmática dificulta ainda mais a sobrevivência no processo de congelamento dos espermatozoides de carneiros, já que o colesterol está associado fortemente à estabilidade e fluidez da membrana plasmática destas células (BALDI et al., 2020; WHITE, 1993).

A criopreservação também afeta negativamente o processo de desenvolvimento dos espermatozoides ao incrementar a maturação das membranas como a capacitação e reação do acrossomo de forma prematura (BARBAS; MASCARENHAS, 2009), assim como a perda do estado estrutural do acrossomo (HERNÁNDEZ et al., 2012). A capacitação induzida pela criopreservação, também chamada criocapacitação, é um dos maiores fatores associados com a longevidade com redução do tempo de sobrevivência dos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea (BAILEY; BILODEAU; CORMIER, 2000), a qual traz redução na fertilidade (THOMAS; MEYERS; BALL, 2006), em especial em inseminações artificiais cuja sincronia entre os momentos de deposição do sêmen e da ovulação é muito relevante. Trabalhos retratam que a criocapacitação é iniciada com o efluxo do colesterol e pelas perdas rápidas de fosfolipídios ocasionados pela lipoperoxidação, os quais levam a mudanças na arquitetura da membrana plasmática, aumento da permeabilidade e fluidez da bicamada lipídica (LEN; KOH; TAN, 2019; BALDI et al., 2020; HINKOVSKA-GALCHEVA; PETKOVA; KOUMANOV, 1989).

Acredita-se que o incremento do fluxo do Ca^{+2} do espaço extracelular para o interior da célula desencadeie uma cascata de sinais como a ativação da adenilil ciclase para produzir AMPc, o qual ativa a proteína kinase (APK) para a fosforilação de proteínas modificando a membrana até culminar na reação acrossomal (BREITBART, 2002; KADIRVEL et al., 2009; SIMONS; FAUCI, 2018).

2.5 Estratégias para melhorar o processo de criopreservação do sêmen

Na busca de melhorar a qualidade do sêmen de carneiros após a descongelamento, são estudadas diferentes estratégias orientadas a minimizar os efeitos negativos da criopreservação sobre os espermatozoides. Neste sentido, tem sido proposta a melhoria do conteúdo dos meios diluidores ou extensores para congelamento, com a adição de elementos encarregados de oferecer proteção e energia aos espermatozoides, reduzindo o estresse físico e químico induzido pelas baixas temperaturas ao longo do processo (PURDY, 2006). No preparo dos extensores geralmente são usados crioprotetores penetrantes (glicerol, dimetil

sulfóxido, etileno e propileno glicol) e não-penetrantes (açúcares - tetralose, dissacarídeos, trissacarídeos), que reduzem a formação de cristais de gelo em nível intracelular e extracelular. Adicionalmente, podem ser inseridos antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase e glutatona redutase) e não-enzimáticos (vitaminas, minerais, aminoácidos).

Para a proteção e restauração de fosfolipídios, principal composto da membrana plasmática dos espermatozoides, são adicionadas diferentes percentagens de gema de ovo (GO) (BISPO et al., 2011), por ser um composto rico em lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Alternativas ao uso de GO são estudadas, dentre as quais se destacam os produtos de origem vegetal, a exemplo da lecitina de soja (LS), considerada fonte valiosa de fosfolipídios à base de plantas (ZHAO et al., 2021), testadas no sêmen de homens (REED et al., 2009), coelhos (YOUNAN et al., 2021), cães (NGUYEN et al., 2019), touros (EL-SISY et al., 2016), bodes (VIDAL et al., 2013), assim como em carneiros (EMAMVERDI et al., 2013; FOROUZANFAR et al., 2010; SHARAFI et al., 2009; TOKER et al., 2016). Entretanto seu uso ainda não está totalmente padronizado, já que seu desempenho depende de muitos fatores intra e extracelulares relacionados aos espermatozoides que interagem de maneira ainda não conhecida com os osmólitos, representados por pequenas moléculas orgânicas presentes nestes extensores, em especial quando estes são submetidos a diferentes temperaturas ao longo da criopreservação.

Adicionalmente, os estudos de fatores físicos determinantes, a exemplo da taxa de congelação, são necessários para a padronização de métodos de congelação do sêmen da espécie ovina. Dentre os métodos encontram-se aqueles que expõem a amostra a uma determinada altura em relação ao nível de N₂L, com resultados satisfatórios na congelação do sêmen de diferentes espécies. As curvas de congelação utilizadas são categorizadas em crescentes, ou seja, começam com taxas de congelação lentas e logo em tempos específicos incrementa-se, e as decrescentes que começam com taxa de congelação rápida e terminam com lenta até mergulhar-se o sêmen no nitrogênio líquido (N₂L) a -196 °C (ASHRAFI et al., 2011).

Para encontrar a taxa de congelação que apresente menores efeitos negativos aos espermatozoides, devem ser considerados os princípios e definições de que ela deve ser lenta o suficiente para permitir que a água saia das células para diminuir ou evitar a formação de cristal de gelo intracelular, e rápida o suficiente para evitar a desidratação celular extrema e o efeito solução (MAZUR, 1970). Temperaturas críticas de cristalização entre -20 a -40 °C (WATSON et al., 1991), -15 a -30 °C (POLGE, 1957), -15 a -60 °C (MAZUR, 1965), -20 a -30 °C (CURRY; MILLAR; WATSON, 1994), -10 a -25 °C (SALAMON; MAXWELL, 1995) e 5 a -50 °C (KUMAR; MILLAR; WATSON, 2003) foram reportadas, as quais devem ser consideradas no processo de congelação por serem responsáveis pelos maiores danos sobre as células espermáticas, apesar de alguns pesquisadores que trabalharam com estas faixas críticas terem reportado resultados contraditórios (DALAL et al., 2018).

Foi demonstrado que a partir do sêmen de carneiros congelado a 5 °C/min foi obtido um maior número de blastocistos após inseminação artificial em relação ao sêmen congelado a 1 °C/min, ambas taxas de congelação aplicadas na faixa de +5 a -25 °C (BYRNE et al., 2000). Adicionalmente, espermatozoides de carneiros submetidos ao vapor de N₂L à temperatura de -75 e -125 °C apresentaram menores danos à membrana plasmática em relação aos que foram submetidos a -55 °C (SALAMON; MAXWELL, 2000).

Protocolos de congelação com diferentes arranjos de taxas de congelação para sêmen de carneiros têm sido recomendados por diferentes autores, desde aqueles com apenas uma etapa com velocidades de 30 e 50 °C/min entre -5 °C a -50 °C, consideradas temperaturas críticas de formação de cristais de gelo e consequente desidratação (KUMAR; MILLAR; WATSON, 2003), passando por aqueles que utilizam taxas de congelação em duas etapas, primeiramente com velocidade de 50 °C/min de -10 °C a -60 °C e posteriormente de 20-30 °C/min de -60 °C a -196 °C (ANEL et al., 2003), de 5 °C/min de +5 °C a -25 °C, e 50 °C/min

de -25 °C a -140 °C (BYRNE et al., 2000); até aqueles que utilizam três etapas com velocidade de 11 °C/min de +5 °C a -80 °C, de 26,6 °C/min de -80 °C a -120 °C e de 13,3 °C/min de -120 °C a -140 °C (JHA et al., 2019).

Diante do exposto, pode-se concluir que a qualidade do sêmen descongelado de carneiros é determinada pela interação de fatores inerentes aos espermatozoides e também a fatores externos como a exposição dos animais aos efeitos negativos do estresse térmico ambiental no período de produção e trânsito espermático e efeitos químicos e físicos advindos do processo de criopreservação do sêmen. Neste sentido, a pesquisa, o desenvolvimento e a aplicação de estratégias multifatoriais são necessários para melhorar a eficiência e desempenho das biotecnologias reprodutivas em ovinos, em especial pela melhoria da qualidade do sêmen *in natura* e congelado de carneiros Santa Inês criados em condições tropicais.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKMAL, M.; AULANNI'AM A.; WIDODO, A. M.; SUMITRO, B.S.; PURMONO, B.B.; WIDODO. The important role of protamine in spermatogenesis and quality of sperm: A mini review. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 5, n. 5, p. 357-360, 2016.

AMIRI, B. E.; BENMOULA, A.; FADILI, M. E.; HORVÁTH, A.; SZENCI, O. Effects of environmental heat stress on ram's scrotal circumference and semen quality of the INRA180 sheep. **Animal Reproduction**, v. 17, n. 36, p. 10, 2020.

ANEL, L.; PAZ, P. D.; ÁLVAREZ, M.; CHAMORRO, C.A.; BOIXO, J.C.; MANSO, A.; GONZÁLES, M.; KAABO, M.; ANEL, E. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. **Theriogenology**, v. 60, n. 7, p. 1293-1308, 2003.

ASHRAFI, I.; KOHRAM, H.; NAIJIAN, H.; BAHREINI, M.; MIRZAKHANI, H. Effect of controlled and uncontrolled cooling rate on motility parameters of cryopreserved ram spermatozoa. **BMC Res Notes**, v. 4, n. 44, p. 547, 2011.

BAÊTA, F. C.; MEADOR, N.F.; SHANKLIN, M.D.; JOHNSON, H.D. Equivalent temperature index at temperatures above the thermoneutral for lactating dairy cows. **American Society of Agricultural Engineers Summer Meeting**. p. 22, 1987.

BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon Minireview. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 1, p. 7, 2000.

BAKHACH, J. The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. **Organogenesis**, v. 5, n. 3, p. 119-126, 2009.

BALDI, E.; TAMBURRINO, L.; MURATORI, M.; DEGL'INNOCENTI, S.; MARCHIANI, S. Adverse effects of in vitro manipulation of spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 220, p. 106314, 2020.

BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, p. 1-7, 2011.

BARBAS, J. P.; MASCARENHAS, R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell and Tissue Banking**, v. 10, n. 1, p. 49-62, 2009.

BARBOSA, O.; SILVA, R. Índice de conforto térmico para ovinos. **Boletim de Indústria Animal**, v. 52, n. 1, p. 29-35, 1994.

BERMAN, A.; HOROVITIZ, T.; KAIM, M.; GACITUA, H. A comparison of THI indices leads to a sensible heat-based heat stress index for shaded cattle that aligns temperature and humidity stress. **International Journal of Biometeorology**, v. 60, n. 10, p. 1453-1462, 2016.

BIANCA, W. Relative importance of dry- and wet-bulb temperatures in causing heat stress in cattle. **Nature**, v. 195, n. 4838, p. 251-252, 1962.

BISPO, C. A. S.; PUGLIESI, G.; GALVÃO, P.; RODRIGUES, M.T.; KER, P.G.; FILGUEIRAS, B.; CARVALHO, G.R. Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 100, n. 1, p. 54-58, 2011.

BISWAL, J.; VIJAYALAKSHMY, K.; RAHMAN, H. Impact of Climate Change on Small Ruminants Production: A Review: **Approaches in poultry, dairy and veterinary sciences**. v. 8, n. 1. p. 7, 2021.

BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J.P.; GUIENNE, B.M.; GUÉRIN, B.; CAMUS, A.; LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin-based diluents. **Theriogenology**, v. 50, n. 5, p. 699-706, 1998.

BREITBART, H. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, n. 1-2, p. 139-144, 2002.

BUFFINGTON, D. E.; AROCHO, A.C.; CANTON, G.H.; PITT, D.; THATCHER, W.W.; COLLIER, R.J. Black Globe-Humidity Index (BGHI) as Comfort Equation for Dairy Cows. **Structures and Environment Division of ASAE**, v. 24, n. 3, p. 0711-0714, 1981.

BURT, M. G.; JOHANSSON, G.; UMPLEBY, A.M.; CHISHOLM, D.J.; HO, K.K.Y. Impact of Acute and Chronic Low-Dose Glucocorticoids on Protein Metabolism. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, n. 10, p. 3923-3929, 2007.

BURTON, I.; EBI, K. L.; MCGREGOR, G. Biometeorology for Adaptation to Climate Variability and Change. EBI, K.L; BURTON, I.; MCGREGOR, G.R. In: **Biometeorology for adaptation to climate variability and change**. 1.ed. London: Springer, 2009. cap. 1, p. 1-8.

BYRNE, G. P.; LONERGAN, P.; WADE, M.; DUFFY, P.; 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, n. 4, p. 265-275, 2000.

CENA, K.; MONTEITH, L. Transfer processes in animal coats. II. Conduction and convection. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences**, v. 188, n. 1093, p. 395-411, 1975.

CRIMP, S.J.; STOKES, C.J.; HOWDEN, S.M.; MOORE, A.D.; JACOBS, B.; BROWN, P.R.; ASH, A.J.; KOKIK, P.; LEITH, P. Managing Murray–Darling Basin livestock systems in a variable and changing climate: challenges and opportunities. **The Rangeland Journal**, v. 32, n. 3, p. 293-304, 2010.

CURRY, M. R.; MILLAR, J. D.; WATSON, P. F. Calculated Optimal Cooling Rates for Ram and Human Sperm Cryopreservation Fail to Conform with Empirical Observations1. **Biology of Reproduction**, v. 51, n. 5, p. 1014–1021, 1994.

DALAL, J.; KUMAR, A.; DUTT, R.; SINGH, G.; CHANDOLI, R.K. Different Cooling Rates for Cryopreservation of Semen in Various Livestock Species: A Review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 8, p. 1903-1911, 2018.

ELDRIDGE, D. J.; BEECHAM, G. The Impact of Climate Variability on Land Use and Livelihoods in Australia's Rangelands. In: GAUR, M. K.; SQUIRES, V. R. **Climate Variability Impacts on Land Use and Livelihoods in Drylands**. 1. ed. Rajasthan, India, Cham: Springer, 2018. p. 293-315.

EL-SISY, G. A.; EL-NATTAT, W.S.; EL-SHESHTAWY, R.I.; EL-MAATY, A.M.B. Substitution of egg yolk with different concentrations of soybean lecithin in tris-based extender during bulls' semen preservability. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 5, n. 6, p. 514-518, 2016.

EMAMVERDI, M.; ZHANDI, M.; SHAHNEH, A.Z.; SHARAFI, M.; SHARIF, A.A. Optimization of Ram Semen Cryopreservation Using a Chemically Defined Soybean Lecithin-Based Extender. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 6, p. 899-904, 2013.

EPSTEIN, Y.; MORAN, D. S. Thermal Comfort and the Heat Stress Indices. **Industrial Health**, v. 44, n. 3, p. 388-398, 2006.

EUSTÁQUIO FILHO, A.; TEODORO, S.M; CHAVES, M.A.; DOS SANTOS, P.E.F.; DA SILVA, M.W.R.; MURTA, R.M.; CARVALHO, G.G.P.; SOUZA, L.E.B. Zona de conforto térmico de ovinos da raça Santa Inês com base nas respostas fisiológicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 8, p. 1807-1814, 2011.

EVENSON, D.; JOST, L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. **Methods in Cell Science**, v. 22, p. 169-189, 2000.

FOROUZANFAR, M. SHARAFI, M.; HOSSEINI, S.M.; OSTADHOSSEINI, S.; HAJIAN, M.; HOSSEINI, L.; ABEDI, P.; NILI, N.; RAHMANI, H.R.; NASR-ESFAHANI, M.H. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. **Theriogenology**, v. 73, n. 4, p. 480-487, 2010.

FREITAS, A. DE P. SANTOS, G.F.F. DO.; FERNANDES, A.R.; MENDOÇA, G.G.; PAZ, C.C.P. DE.; FILHO, A.E.V.; FARO, L. EL. Effect of thermal stress on basic seminal characteristics of Gyr bulls. *International Journal of Biometeorology*, v. 64, n. 10, p. 1649-1656, out. 2020.

FURTADO, D. A.; OLIVEIRA, F.M.M.; SOUSA, W.H.; MEDEIROS, G.R.; OLIVEIRA, E.M.C.; VEIGAS, R.R. Thermal comfort indexes and physiological parameters of Santa Inês and crossbreed ewes in the semi-arid. **Journal of Animal Behaviour and Biometeorology**, v. 5, n. 2, p. 72-77, 2017.

GARCIA-OLIVEROS, L. N.; ARRUDA, R.P.; BATISSACO, L.; GONZAGA, V.H.G.; NOGUERIA, V.J.M.; RODRIGUEZ, S.A.F.; ALMEIDA, F.S.; ALVES, M.B.R.; PINTO, S.C.C.; NICHI, M.; LOSANO, J.D.A.; KAWAI, G.K.V.; CELEGHINI, E.C.C. Heat stress effects on bovine sperm cells: a chronological approach to early findings. **International Journal of Biometeorology**, v. 64, n. 8, p. 1367-1378, 2020.

GAUGHAN, J.; LACETERA, N.; VALTORTA, S.E.; KHALIFA, H.H, HANH, L.; MADER, T. Response of Domestic Animals to Climate Challenges. EBI, K.L; BURTON, I.; MCGREGOR, G.R. In: **Biometeorology for adaptation to climate variability and change**. 1.ed. London: Springer, 2009. cap. 7, p. 131-170.

GE, R.-S.; HARDY, D.O.; CATTERALL, J.F.; HARDY, M.P. Developmental Changes in Glucocorticoid Receptor and 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Oxidative and Reductive Activities in Rat Leydig Cells. **Endocrinology**, v. 138, n. 12, p. 5089–5095, 1997.

GIBBONS, A.; GALARRAGA, M.B.; FERNANDEZ, J.; BULNES, A.G. Vitified embryo transfer in Merino sheep under extensive conditions. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 2, p. 297-301, 2019.

GONZALEZ-RIVAS, P. A.; CHAUHAN, S.S.; HA, M.; FEGAN, N.; DUNSHEA, F.R.; WARNER, R.D. Effects of heat stress on animal physiology, metabolism, and meat quality: A review. **Meat Science**, v. 162, p. 108025, 2020.

GOOTWINE, E. Management of Dairy Animals: Sheep: Reproductive Management. FUQUAY, J.W.; FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.L.H. In: **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2.ed. Washington. Elsevier, 2016. p. 887-896.

HABEEB, A. A.; GAD, A. E.; ATTA, M. A. Temperature-Humidity Indices as Indicators to Heat Stress of Climatic Conditions with Relation to Production and Reproduction of Farm Animals. **International Journal of Biotechnology and Recent Advances**, v. 1, n. 1, p. 35-50, 2018.

HAHN, G.L.; GAUGHAN, J.B.; MADER, T.L.; EIGENBERG, R.A. Thermal Indices and Their Applications for Livestock Environments. In: **Livestock Energetics and Thermal Environment Management**. 1. ed. Michigan: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009. cap. 5, p. 113–130.

HAMILTON, T. R. DOS S.; MENDES, C.M.; CASTRO, L.S.; ASSIS, P.M.; SIQUEIRA, A.F.P.; DELGADO, L.S.; GOISSIS, M.D.; BLANCO, T.M.; PÉREZ, J.A.C.; NICHI, M.; VISINTIN, J.A.; D'ÁVILA ASSUMPÇÃO, M.E.O. Evaluation of Lasting Effects of Heat Stress on Sperm Profile and Oxidative Status of Ram Semen and Epididymal Sperm. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-12, 2016a.

HAMILTON, T. R. DOS S.; CASTRO, L.S.; DELGADO, L.S.; ASSIS, P.M.; SIQUEIRA, A.F.P.; MENDES, C.M.; GOISSIS, M.D.; BLANCO, T.M.; PÉREZ, J.A.C.; NICHI, M.; VISINTIN, J.A.; D'ÁVILA ASSUMPÇÃO, M.E.O. Induced lipid peroxidation in ram sperm: semen profile, DNA fragmentation and antioxidant status. **REPRODUCTION**, v. 151, n. 4, p. 379-390, 2016b.

HAMILTON, T. R. DOS S.; SIQUEIRA, A.F.P.; CASTRO, L.S.; MENDES, C.M.; DELGADO, L.S.; ASSIS, P.M.; MESQUITA, L.P.; MAIORKA, P.C.; NICHI, M.; GOISSIS, M.D.; VISINTIN, J.A.; D'ÁVILA ASSUMPÇÃO, M.E.O. Effect of Heat Stress on Sperm DNA: Protamine Assessment in Ram Spermatozoa and Testicle. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1-14, 2018.

HAZEL, L. N. The genetic basis for constructing selection indexes. In: **Genetics**. v. 28, n. 6, p. 476-490, 1943.

HERNÁNDEZ, P. J. E.; RODRÉGUEZ, S.J.L.; JUÁREZ, R.E.; SOTO, M.Y.G.; GARCÍA, R.A.D. Effect of cryopreservation of sheep semen related to its viability and acrosomal status. **Revista de Salud Animal**, v. 34, n. 2, p. 78-83, 2012.

HINKOVSKA-GALCHEVA, V.; PETKOVA, D.; KOUMANOV, K. Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. **Cryobiology**, v. 26, n. 1, p. 70-75, 1989.

HOUSTON, B. J.; NIXON, B.; MARTIN, J.H.; DEIULIIS, G.N.; BROMFIELD, E.G.; MCEWAN, K.E.; AITKEN, R.J. Heat exposure induces oxidative stress and DNA damage in the male germ line†. **Biology of Reproduction**, v. 98, n. 4, p. 593-606, 2018.

HOWARTH, B. Fertility in the ram following exposure to elevated ambient temperature and humidity. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 19, n. 1, p. 179-183, 1969.

HUFANA-DURAN, D.; DURAN, P. G. Animal reproduction strategies for sustainable livestock production in the tropics. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 492, p. 012065, 2020.

JHA, P. K.; ALAM, M.G.S.; MANSUR, A.A.; NAHER, N.; ISLAM, T.; BHUIYAN, M.U.; BARI, F.Y. Cryopreservation of Bangladeshi ram semen using different diluents and manual freezing techniques. **Cryobiology**, v. 89, p. 35-41, 2019.

JONES, R. Plasma Membrane Composition and Organisation During Maturation of Spermatozoa in the Epididymis. In: ROBAIRE, B.; HINTON, B. T. **The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice**. 1. ed. Boston, MA: Springer, 2002. cap. 22, p. 405–416.

KADIRVEL, G. KUMAR, S.; KUMARESAN, A.; KATHIRAVAN, P. Capacitation status of fresh and frozen-thawed buffalo spermatozoa in relation to cholesterol level, membrane fluidity and intracellular calcium. **Animal Reproduction Science**, v. 116, n. 3-4, p. 244-253, 2009.

KANTER, M.; AKTAS, C.; ERBOGA, M. Heat stress decreases testicular germ cell proliferation and increases apoptosis in short term: an immunohistochemical and ultrastructural study. **Toxicology and Industrial Health**, v. 29, n. 2, p. 99-113, 2013.

KASTELIC, J. P.; COOK, R.B.; COULTER, G.H.; SAACKE, R.G. Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the bull. **Theriogenology**, v. 45, n. 5, p. 935-942, 1996.

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G. H. Contribution of the scrotum and testes to scrotal and testicular thermoregulation in bulls and ram. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 1081, n. 1, p. 81-85, 1996.

KELLY, C. F.; BOND, T. E. A guide to environmental research on animals. In: **A Guide to Environmental Research on Animals**. Washington, 1971.

KHALIL, W. A.; EL-HARAIRY, M.A.; ZEIDAN, A.E.B.; HASSAN, M.A.E.; MOHEY-ELSAEED, O. Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 6, n. sup1, p. S49-S56, 2018.

KUMAR, S.; MILLAR, J. D.; WATSON, P. F. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. **Cryobiology**, v. 46, n. 3, p. 246-253, 2003.

LACETERA, N. Impact of climate change on animal health and welfare. **Animal Frontiers**, v. 9, n. 1, p. 26–31, 2019.

LEN, J. S.; KOH, W. S. D.; TAN, S.-X. The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 8, p. BSR20191601, 2019.

LPHSI. **Livestock and Poultry Heat Stress Indices Agriculture Engineering Technology Guide**. Clemson, USA, 1990.

MADER, T. L.; DAVIS, M. S.; BROWN-BRANDL, T. Environmental factors influencing heat stress in feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 3, p. 712-719, 2006.

MAXWELL, W. M. C. Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronised oestrus. 2. Effect of dose of spermatozoa and site of intrauterine insemination on fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 10, n. 4, p. 309-316, 1986.

MAZUR, P. Causes of injury in frozen and thawed cells. **Journal of General Physiology**, v. 47, p. 347-369, 1965.

MAZUR, P. Cryobiology: The Freezing of Biological Systems. **Science, New Series**, v. 168, n. 3934, p. 939-949, 1970.

MCMANUS, C. M.; FARIA, D. A.; LUCCI, C. M.; LOUVANDINI, H.; PEREIRA, S. A.; PAIVA, S. R. Heat stress effects on sheep: Are hair sheep more heat resistant? **Theriogenology**, v. 155, p. 157-167, 2020.

MENEGASSI, S. R. O.; PEREIRA, G.R.; BREMM, C.; JR, C.K.; LOPES, F.G.; FIORENTINI, E.C.; MACMANUS, C.; DIAS, E.A.; ROCHA, M.K. DA.; LOPES, R.B.; BARCELLOS, J.O.J. Effects of ambient air temperature, humidity, and wind speed on seminal traits in Braford and Nellore bulls at the Brazilian Pantanal. **International Journal of Biometeorology**, v. 60, n. 11, p. 1787-1794, 2016.

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, n. 6, p. 1695-1706, 2002.

NEVES, M. L. M. W.; AZEVEDO, M. DE.; COSTA, L.A.B. DA.; GUIM, A.; LEITE, A.M.; CHANGAS, J.C. Níveis críticos do índice de conforto térmico para ovinos da raça Santa Inês criados a pasto no agreste do Estado de Pernambuco. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 31, n. 2, p. 169-175, 2009.

NGUYEN, V. V.; PONCHUNCHOVONG, S.; KUPITTAYANANT, S.; KUPITTAYANANT, P. Effects of egg yolk and soybean lecithin on sperm quality determined by computer-assisted sperm analysis and confocal laser scanning microscope in chilled canine sperm. **Veterinary Medicine and Science**, v. 5, n. 3, p. 345-360, 2019.

NTEMKA, A.; TSAKMAKIDIS, I.; KIOSSIS, E.; MILOVANOVÍČ, A.; BOSCO, C. Current status and advances in ram semen cryopreservation. **Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, v. 69, n. 2, p. 911, 2018.

OAKLEY, A. E.; BREEN, K.M.; CLARKE, L.J.; KARSCH, F.J.; WAGENMARKER, E.R.; TILBROOK, A.J. Cortisol Reduces Gonadotropin-Releasing Hormone Pulse Frequency in Follicular Phase Ewes: Influence of Ovarian Steroids. **Endocrinology**, v. 150, n. 1, p. 341-349, 2009.

PAIM, T. P.; BORGES, B. O.; LIMA, P. M. T.; DALLAGO, B. S. L.; LOUVANDINI, H.; MCMANUS, C. M. Relation between thermographic temperatures of lambs and thermal comfort indices. **International Journal of Applied Animal Sciences**, v. 4, n. 1, p. 108-115, 2012.

PARKS, J. E.; HAMMERSTEDT, R. H. Developmental Changes Occurring in the Lipids of Ram Epididymal Spermatozoa Plasma Membrane. **Biology of Reproduction**, v. 32, n. 3, p. 653-668, 1985.

PARKS, J.E.; LYNCH, D.V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29, n. 2, p. 255-266, 1992.

PHILLIPS, C. The welfare risks and impacts of heat stress on sheep shipped from Australia to the Middle East. **The Veterinary Journal**, v. 218, p. 78-85, 2016.

POLGE, C. Low-temperature storage of mammalian spermatozoa. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences**, v. 147, n. 929, p. 498-508, 1957.

POOLE, D.C.; ERICKSON, H.H. Exercise Physiology of Terrestrial Animals. In: **Dukes' Physiology of domestic animals**. 13. ed. Manhatam, USA: Wiley, 2015. p. 763.

PURDY, P.H. The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48h at 5°C prior to cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 93, n. 1-2, p. 114-123, 2006.

RAHIMI, J.; MUTUA, J.Y.; NOTENBAERT, A.M.O.; MARSHALL, K.; BUTTERBACH-BAHL, K. Heat stress will detrimentally impact future livestock production in East Africa. **Nature Food**, v. 2, n. 2, p. 88-96, 2021.

RAMÓN, M.; DIAZ, C.; PÉREZ-GUZMAN, M.D.; CARABAÑO, M.J. Effect of exposure to adverse climatic conditions on production in Manchega dairy sheep. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 7, p. 5764-5779, 2016.

REED, M.L.; EZEH, P.C. Soy lecithin replaces egg yolk for cryopreservation of human sperm without adversely affecting postthaw motility, morphology, sperm DNA integrity, or sperm binding to hyaluronate. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 5, p. 1787-1790, 2009.

REZAIE, F.S.; HEZAVEHEI, M.; SHARAFI, M.; SHAHVERDI, A. Improving the post-thaw quality of rooster semen using the extender supplemented with resveratrol. **Poultry Science**, v. 100, n. 9, p. 101290, 2021.

RHOAD, A. O. The Iberia heat tolerance test for cattle. v. 21, p. 162-164, 1944.

ROMO-BARRON, C.B.; DIAZ, D.; PORTILLO-LOERA, J.J.; ROMO-RUBIO, J.A.; JIMENEZ-TREJO, F.; MONTERO-PARDO, A. Impact of heat stress on the reproductive performance and physiology of ewes: a systematic review and meta-analyses. **International Journal of Biometeorology**, v. 63, n. 7, p. 949-962, 2019.

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, n. 3-4, p. 185-249, 1995.

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

SANTOS, G.C. DE L.; CABRAL, A.M.D. Índices bioclimáticos, modelagem matemática e índices estatísticos para avaliação de modelos utilizados na estimativa do conforto térmico animal. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p. e20910313328, 2021.

- SEJIAN, V.; BHATTA, R.; GAUGHAN, J.B.; DUNSHEA, F.R.; LACETERA, N. Review: Adaptation of animals to heat stress. **Animal**, v. 12, p. s431-s444, 2018.
- SEVI, A.; CAROPRESE, M. Impact of heat stress on milk production, immunity and udder health in sheep: A critical review. **Small Ruminant Research**, v. 107, n. 1, p. 1–7, 2012.
- SEIXAS, L.; MELO, C.B DE.; TANURE, C.B; PERIPOLLI, V.; MCMANUS, C. Heat tolerance in Brazilian hair sheep. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 30, n. 4, p. 593-601, 2016.
- SHAHRAM, B. et al. The Effect of Different Extenders on Post-thaw Sperm Viability, Motility and Membrane Integrity in cryopreserved semen of Zandi Ram. **Journal of Basic and Applied Scientific Research**, v. 2, n. 2, p. 1120-1123, 2012. Padronizar formatação. Aqui colocou o primeiro autor e et al. Diferentes dos demais
- SHARAFI, M.; FOROUZANFAR, M.; HOSSEINI, S.M.; HAJIAN, M.; OSTADHOSSEINI, S.; HOSSEINI, L.; ABEDI, P.; NILI, N.; RAHMANI, H.R.; JAVAHERI, A.R.; ESFAHANI, M.H.N. In vitro comparison of soybean lecithin based-extender with commercially available extender for ram semen cryopreservation. **International Journal of Fertility and Sterility**, v. 3, n. 3, p. 149-152, 2009.
- SILVA, R.G. DA; MORAIS, D. A.E.F.; GUILHERMINO, M. M. Evaluation of thermal stress indexes for dairy cows in tropical regions. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 4, p. 1192-1198, 2007.
- SILVA, R.O. DA.; OLIVEIRA, R.P.M. DE.; SILVA, A.F.; OLIVEIRA, F.F. DE.; RUFINO, J.P.F, SILVA, M.L.M. DA. Effect of different protocols for estrus synchronization on reproductive performance of Santa Inês ewes under Amazon environmental conditions. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 43, p. e48954, 2020.
- SILVA, R.G.; BARBOSA, O.R. **Thermal comfort index for sheep**. In: Proceedings of The 13th International Congress of Biometeorology. Canada: Calgary, 1993.
- SILVA, R.; MAIA, A.S. **Principles of Animal Biometeorology**. v. 2 Dordrecht: Springer Netherlands, 2013.
- SIMMONS, L. W.; LOVEGROVE, M.; LYMBERY, S. J. Dietary antioxidants, but not courtship effort, affect oxidative balance in the testes and muscles of crickets. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. 20, p. jeb.184770, 2018.
- SIMONS, J.; FAUCI, L. A Model for the Acrosome Reaction in Mammalian Sperm. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 80, n. 9, p. 2481-2501, 2018.
- THOM, E. C. The Discomfort Index. **Weatherwise**, v. 12, n. 2, p. 57-61, 1959.
- THOMAS, A.D.; MEYERS, S.A.; BALL, B.A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1531-1550, 2006.
- TOKER, M. B.; ALCAY, S.; GOKCE, E.; USTUNER, B. Cryopreservation of ram semen with antioxidant supplemented soybean lecithin-based extenders and impacts on incubation resilience. **Cryobiology**, v. 72, n. 3, p. 205-209, 2016.
- VALLÉS, A. S.; AVELDAÑO, M. I.; FURLAND, N. E. Altered Lipid Homeostasis in Sertoli Cells Stressed by Mild Hyperthermia. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e91127, 2014.

VAN WETTERE, W. H. E. J.; KIND, K.L.; GATFORD, K.L.; SWINBOURNE, A.M.; LEU, S.T.; HAYMAN, P.T.; KELLY, J.M.; WEAVER, A.C.; KLEEMANN, D.O.; WALKER, S.K. Review of the impact of heat stress on reproductive performance of sheep. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 12, n. 26, p. 18, 2021.

VICENTE PÉREZ, R. et al. Impacto del estrés por calor en la producción de ovinos de pelo. Revisión. **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias**, v. 11, n. 1, p. 205-222, 2020.

VIDAL, A. H.; BATISTA, A.M.; SILVA, E.C.B. DA.; GOMES, W.A.; PELINCA, M.A.; SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 109, n. 1, p. 47-51, 2013.

VIEIRA, F. M. C.; PILATTI, J.A.; CZEKOSKI, Z.M.W.; FONSÊCA, V.F.C.; HERBUT, P.; ANGREGKA, S.; VISMARA, E.S.; MACEDO, V.P.; SANTOS, M.C.R. DOS.; PASMIONKA, I. Effect of the Silvopastoral System on the Thermal Comfort of Lambs in a Subtropical Climate: A Preliminary Study. **Agriculture**, v. 11, n. 8, p. 790, 2021.

VITLIC, A.; LORD, J. M.; PHILLIPS, A. C. Stress, ageing and their influence on functional, cellular and molecular aspects of the immune system. **AGE**, v. 36, n. 3, p. 9631, 2014.

WALSBERG, G.E.; WOLF, B.O. Effects of solar radiation and wind speed on metabolic heat production by two mammals with contrasting coat colours. **Journal of Experimental Biology**, v. 198, p. 1499-507, 1995.

WALSH, B. S.; PARRATT, S.R.; HOFFMANN, A.A.; ATKINSON, D.; SNOOK, R.R.; BRETMAN, A.; PRICE, T.A.R. The impact of climate change on fertility. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 34, n. 3, p. 249-259, 2019.

WATSON, P. F.; GAO, D.Y.; MAZUR, P.; CRITSER, J.L. Ice nucleation temperature of bovine spermatozoa and causes of sperm cell lysis below 0 °C. **Cryobiology**, n. 28, p. 526, 1991.

WHIRLEDGE, S.; CIDLOWSKI, J. A. Glucocorticoids, Stress, and Fertility. **Minerva Endocrinology**, v. 35, n. 2, p. 109-125, 2013.

WHITE, I. G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, n. 6, p. 639-658, 1993.

WINGFIELD, J. C.; ROMERO, M. L. Adrenocortical responses to stress and their modulation in free-living vertebrates. TERJUNG, R. In: **Comprehensive Physiology**. v.4, p. 211-234. 2001

YOUNAN, G.; EL-DIN, A.M.S.; ABDEL-KHALEK, A.E.; EL-SHERBIENY, M.A.; HELMY, A.A. Soybean Lecithin as an Alternative to Egg Yolk in Tris-Based Extender of Cryopreserved Apri Rabbit Semen. **Journal of Animal and Poultry Production**, v. 12, n. 1, p. 47-54, 2021.

YOUSEF, M. K. **Stress physiology in livestock**. v. 1, Florida: CRC Press, 1985.

ZHAO, J.; XIAO, G.; ZHU, W.; FANG, D.; LI, N.; HAN, C.; GAO, Q. Ram semen preserved at 0°C with soybean lecithin Tris-based extender substituted for egg yolk. **Animal Bioscience**, v. 34, n. 2, p. 192-197, 2021.

4. ARTIGO 1

ÍNDICES DE ESTRESSE TÉRMICO BIOCLIMÁTICO AO LONGO DO ANO E SUAS RELAÇÕES COM CARACTERÍSTICAS ANDROLÓGICAS CONSIDERANDO-SE O PERÍODO DA ESPERMATOGÊNESE E TRÂNSITO ESPERMÁTICO EM CARNEIROS

Periódico a ser re-submetido: *International Journal of Biometeorology* (ISSN: 1432-1254)

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a relação entre os Índices Bioclimáticos Temperatura e Umidade (ITU), Temperatura Equivalente (ITE), Temperatura de Globo Negro e Umidade (ITGU), e Conforto Térmico (ICT), considerando o período prévio da espermatogênese (P45) e trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo (P15), e os parâmetros reprodutivos e, determinar a melhor época do ano para uso de carneiros criados no Nordeste brasileiro. Carneiros Santa Inês (n=25) foram submetidos a duas avaliações reprodutivas (ARe) por quadrimestre do ano (Q1, Q2 e Q3), sendo os índices bioclimáticos calculados no P45 e P15 anterior a cada ARe. Os dados dos índices e dos parâmetros reprodutivos foram analisados por ANOVA, as médias foram comparadas pelo Teste-Tukey, a correlação e regressão foram usadas para determinar a relação entre eles ($p < 0,05$). Observou-se uma piora nos parâmetros cinéticos espermáticos no Q1 em relação ao Q2 e Q3 ($p < 0,05$). Os valores dos índices apresentaram correlação antagônica com a maioria dos parâmetros e a regressão mostrou que o ITGU e o ICT tiveram relação negativa com as velocidades curvilínea, linear e do percurso médio (VCL, VSL e VAP), e positiva com espermatozoides lentos no P45 e P15 ($p < 0,05$). O ITGU e ICT classificaram o ambiente de maneira mais coerente com o comportamento da cinética espermática, que é afetada quando no P45 e P15 estes índices estão acima de 83 e 41, respectivamente, considerados níveis perigosos e de desconforto para os ovinos. A qualidade do sêmen é prejudicada no primeiro e é melhor nos dois últimos quadrimestres do ano.

Palavras-chave: Cinética espermática. Espermatogênese. Estresse térmico. Ovinos. Santa Inês.

ABSTRACT

Title: BIOCLIMATIC THERMAL STRESS INDICES DURING THE YEAR AND THEIR RELATIONSHIPS WITH ANDROLOGICAL CHARACTERISTICS CONSIDERING THE PERIOD OF SPERMATOGENESIS AND SPERM TRANSIT IN RAMS

The aim of the study was to evaluate the relationship between the following bioclimatic indices: Temperature and Humidity (THI), Equivalent Temperature (ETI), Black Globe Temperature and Humidity (BGTHI), and Thermal Comfort (TCI), considering the previous period of spermatogenesis (P45) and period of sperm transit through the epididymis (P15), and reproductive parameters, as well as to determine the best time of the year to use rams raised in Northeast region of Brazil. Santa Inês rams ($n = 25$) underwent two reproductive evaluations (RE) per four-month period of the year (Q1, Q2, and Q3), and the bioclimatic indices were calculated in P45 and P15 prior to each RE. Data from the indices and reproductive parameters were analyzed by ANOVA, the means were compared by the Tukey-Test, and correlation and regression were used to determine the relationship between them ($p < 0.05$). Sperm kinetic parameters in Q1 were worse than in Q2 and Q3 ($p < 0.05$). The index values showed an antagonistic correlation with most parameters; and regression showed that the BGTHI and the TCI had a negative relationship with the curvilinear, straight line, and average path velocities (VCL, VSL, and VAP), and a positive relationship with slow spermatozoa in P45 and P15 ($p < 0.05$). The BGTHI and TCI classified the environment in a more consistent way with the response of sperm kinetics, which is affected when these indices are above 83 in P45 and above 41 in P15; these levels are considered dangerous and uncomfortable for sheep. Semen quality is impaired in the first four-month period of the year and better in the last two four-month periods.

Keywords: sperm kinetics, spermatogenesis, thermal stress, sheep, Santa Inês

4.1. Introdução

As características reprodutivas de fêmeas e de machos são afetadas pelos impactos das mudanças climáticas, tanto em animais selvagens (Delcroix et al. 1990) e domésticos (Rosa e Bryant 2003). Neste sentido, a utilização de espécies e raças de animais mais bem adaptadas às condições ambientais é uma premissa para viabilizar a produção pecuária em todas as regiões, em especial naquelas onde esta atividade é desafiada pelo clima.

Estudos demonstraram que as características clínico-andrológicas das diferentes espécies são influenciadas pelas variações estacionais (Karagiannidis et al. 2000; Gündoğan et al. 2003), representadas pelas suas principais variáveis como a temperatura do ar (Moule e Waites 1963; Karaca et al. 2002; Ramón et al. 2014), a umidade relativa do ar e suas interações com outros parâmetros climáticos (Suriyasomboon et al. 2005; Peters et al. 2008; Dikmen e Hansen 2009; Malama et al. 2013; Soares et al. 2015; Menegassi et al. 2016) e ainda a radiação térmica (Collier et al. 1982; Marai et al. 2007). Um exemplo disso é que, em condições extremas, a interferência do ambiente sobre a produção e qualidade espermática pode ser aguda, resultando na destruição dos espermatozoides no epidídimo e até mesmo do epitélio germinativo (Marai et al. 2007; Van Wettère et al. 2021).

Não é fácil compreender e mensurar o efeito direto que o ambiente possa ter sobre as células testiculares de suporte e epididimárias no sistema reprodutivo dos mamíferos (Bedford 1991), em especial entender a influência das variáveis ambientais sobre a espermatogênese, por esta envolver uma série complexa de processos no desenvolvimento dos espermatozoides (Schlatt e Ehmcke 2014). As flutuações das variáveis ambientais como a alta temperatura e umidade são sentidas como desconforto em grau variável pelos animais (Thom 1959; Bianca

1962). Neste sentido, a adequação do manejo para adaptação e o uso de melhoramento animal com foco na adaptabilidade das espécies, particularmente em regiões tropicais, podem tornar-se importantes ferramentas na produção pecuária com resultados benéficos para o produtor (McManus et al. 2011). O ovino da raça Santa Inês é um animal com alto valor adaptativo e reprodutivo, destacando-se pelo seu bom desenvolvimento e, consequentemente, sendo considerada uma excelente alternativa para a produção de carne em quase todas as regiões do Brasil e de outros países tropicais, posicionando-se como recurso genético importante para programas de melhoramento desta espécie nestas condições ambientais (Sousa et al. 2003).

Neste sentido, diante dos desafios impostos pelas mudanças climáticas, em especial o aquecimento global, mais do que nunca o manejo e a utilização das biotecnologias reprodutivas devem se basear nas condições ambientais para que tenham resultados satisfatórios em prol da produção, produtividade e sustentabilidade dos sistemas de produção. Assim, a previsibilidade do desempenho reprodutivo dos animais e das técnicas de manejo e biotecnologias para definição do melhor momento e de ajustes e estratégias compensatórias que serão necessários para sua aplicação podem ser feitas através do monitoramento das condições climáticas ao longo do ano. Este monitoramento pode ser feito por meio do cálculo dos chamados índices de estresse térmico bioclimáticos, que são estimados pela mensuração meteorológica do ambiente e que foram estudados e relacionados ao desconforto térmico nos animais das diferentes espécies. Os índices de Temperatura e Umidade (ITU), Temperatura Equivalente (ITE), Temperatura de Globo Negro e Umidade (ITGU) e Conforto Térmico (ICT) têm sido propostos por diversos autores para estudar o desconforto nos animais dentre eles os ovinos (West 2003, Marai et al. 2007, Baêta et al. 1987, Silva e Maia 2013, Menegassi et al. 2016, Buffington et al. 1981, Paim et al. 2012, Barbosa e Silva 1994).

Apesar de terem sido encontradas correlações dos índices bioclimáticos com o desconforto térmico dos animais, nenhum trabalho até o momento havia sido desenvolvido para comparar estes índices quanto ao seu poder de predição e monitoramento do potencial reprodutivo de carneiros. Também, até agora, não tinha sido proposta a aplicação destes índices considerando-se o período de produção e trânsito espermáticos que antecedem o momento em que estes animais são utilizados na reprodução. Na avaliação dos efeitos ambientais deve-se considerar que os sinais clínico-andrológicos e principalmente o sêmen utilizado na reprodução natural ou artificial é também reflexo dos eventos passados e não só do momento presente. Uma amostra de sêmen representa uma coleção de espermatozoides que foi formada e adquiriu suas características ao longo de um período anterior de aproximadamente 60 dias que compreendeu a espermatogênese e trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo (Brackett 2004). Assim, é preciso ter em mente que os espermatozoides contidos numa amostra seminal colhida no presente foram sujeitos no passado, durante a sua formação, estocagem e disponibilização, às variáveis ambientais que antecederam a sua colheita e utilização, e este período deve ser levado em conta no cálculo e análise dos índices bioclimáticos que têm ação direta sobre este momento.

O presente estudo teve como objetivos avaliar a relação entre ITU, ITE, ITGU e ICT, calculados considerando-se o período de produção espermática que compreende a espermatogênese e trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo, e os parâmetros reprodutivos (PR) de carneiros Santa Inês criados em ambiente tropical, no Agreste do Nordeste do Brasil, e determinar a melhor época para uso destes animais para a reprodução neste ambiente e região.

4.2. Material e Métodos

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Tabuleiros Costeiros, unidade da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) com o número de protocolo 13072016.0006.

4.2.1. Período e local experimental

O estudo foi conduzido durante 12 meses no Campo Experimental Pedro Arle (CEPA) da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado no município de Frei Paulo (Longitude: 37° 38' 30,41'' Oeste, Latitude: 10° 36' 12,63'' Sul), estado de Sergipe, Brasil. O local apresenta amplitude de fotófase ao longo do ano de 12h46' no solstício de verão (11h14' de escuridão) a 11h29' no solstício de inverno (12h31' de escuridão), apresentando uma diferença de 1h17' do dia mais longo em relação ao mais curto do ano. O CEPA localiza-se no Agreste da região Nordeste do Brasil, sub-região caracterizada como zona de transição entre os biomas Caatinga e Mata Atlântica, sendo classificada como clima de savana tropical segundo Köppen–Geiger, com os seguintes registros históricos (1950-2012) anuais de temperatura e umidade: 26 °C e 87% nos meses de janeiro a abril (Primeiro Quadrimestre – Q1/época seca e início de transição seca/chuva); 22 °C e 94% nos meses de maio a agosto (Segundo Quadrimestre – Q2/época chuvosa) e; 24 °C e 88% nos meses de setembro a dezembro (Terceiro Quadrimestre – Q3/ época de transição chuva/seca) conforme Santos et al. (2013). As análises laboratoriais foram feitas nas instalações da sede da Embrapa, município de Aracaju, Sergipe, Brasil.

4.2.2. Animais e manejo experimental

Foram utilizados 25 carneiros sexualmente maduros do Núcleo de Conservação de ovinos da raça Santa Inês da Embrapa Tabuleiros Costeiros que mantiveram as seguintes características ao longo de todo experimento: média aproximada de 60 kg de peso vivo, bom estado nutricional e libido com experiência sexual prévia sendo constantemente expostos e estimulados utilizando vagina artificial em contatos com ovelhas em estro natural.

Todos os animais foram mantidos no mesmo ambiente ao longo do experimento sendo manejados em regime semi-intensivo. Os animais eram soltos às 07h00 e permaneciam à pasto no campo até 16h00, onde consumiam forragem nativa e cultivada, composta pelos capins-pangola (*Digitaria decumbens* L), estrela (*Cynodon nlemfuensis*), buffel (*Cenchrus ciliaries*) e *Panicum maximum* das cultivares aruana e green-panic. Após esse período, os animais permaneciam em estábulo coberto para pernoitar das 16h00 até às 07h00, onde recebiam suplementação alimentar com volumoso (Vo) de silagem de milho e concentrado (C) à base de farelo de soja e farelo de milho, na proporção 50Vo:50C, com disponibilidade de sal mineral específico para ovinos e água *ad libitum*.

4.2.3. Avaliações reprodutivas

Foram realizadas avaliações reprodutivas (ARe) que consistiram em análises clínico-andrológicas e seminais realizadas concomitantemente em todo o grupo de 25 carneiros, sempre num mesmo dia a cada 60 dias, período total de produção espermática em carneiros que correspondia à duração da espermatogênese e trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo (Brackett 2004). As ARe foram agrupadas aos pares de acordo com o quadrimestre do ano em que elas foram realizadas como segue: Q1 – janeiro a abril; Q2 – maio a agosto e; Q3 – setembro a dezembro. Assim, foram realizadas duas avaliações do grupo de 25 animais por quadrimestre compreendendo duas avaliações por animal por quadrimestre, totalizando assim seis avaliações por animal e 150 avaliações totais nos 12 meses do estudo.

4.2.3.1 Avaliações clínico-andrológicas

Os carneiros foram submetidos a exames clínico-andrológicos para mensuração de parâmetros de biometria testicular. Foram mensurados a circunferência escrotal (CE), circundando-se com fita métrica ambos os testículos na sua maior curvatura, e o volume testicular (VT) que foi obtido utilizando-se os seguintes parâmetros testiculares mensurados com um paquímetro: altura (AT) e largura (LT), nas posições dorso-ventral e látero-medial, respectivamente. A estimativa do VT de cada gônada foi obtida a partir da equação matemática sugerida por Bailey et al. (1998), considerando-se a forma ovoide dos testículos:

$VT=2[4/3 \pi (LT/2)^2 (AT/2)] \text{ cm}^3$, onde: $\pi = 3,1416$; LT = Largura e AT= Altura dos testículos.

4.2.3.2 Avaliações do sêmen

Foram realizadas colheitas e avaliações de sêmen dos carneiros com auxílio de vagina artificial aquecida (45 °C) e de uma ovelha em estro natural como estímulo sexual. Os ejaculados foram mantidos sob aquecimento em banho de água (37 °C) até a realização imediata das análises seminais descritas a seguir.

a. Volume seminal e concentração espermática

O volume do sêmen ejaculado (VE) foi medido com auxílio de uma pipeta automática de precisão e expresso em mL, enquanto a concentração espermática (CEsp) foi mensurada adicionando-se uma alíquota de sêmen à água destilada (1:400) e realizando-se a contagem dos espermatozoides em câmara de Neubauer, sob microscopia óptica, em aumento de 400x. O número total de espermatozoides expresso em bilhões/mL no ejaculado foi determinado pela multiplicação do VE e a concentração espermática.

b. Morfologia espermática

A avaliação da morfologia dos espermatozoides foi realizada por meio de câmara úmida. Amostras de sêmen (5 µL) foram transferidas para microtubos contendo solução de Dulbecco (PBS) com glutaraldeído a 0,2% (500 µL) sob aquecimento a 37° C (Barth e Oko 1989). A leitura da lâmina foi feita em microscopia óptica de contraste de fase, sob imersão em óleo e aumento de 1000x, observando-se as características morfo-patológicas de 200 espermatozoides, que foram classificados como portadores de defeitos maiores (Dma) e menores (Dme), segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA 2013).

c. Cinética espermática

A cinética espermática foi avaliada utilizando-se o sistema computadorizado Sperm Class Analyzer (SCA, Microptics, S.L. Versão 5.1, Barcelona, Espanha), tendo-se como padrão o set – up de fábrica para a espécie ovina com ajuste nas partículas de área entre 30 e 70 µm². Uma alíquota de sêmen foi diluída em uma solução avaliadora (Bandeira et al. 2017), a fim de obter-se uma concentração de 20 x 10⁶ espermatozoides/mL. Depois de homogeneizada e incubada (37° C), foram pipetados 3 µL da amostra diluída para uma câmara de Makler (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel), pré-aquecida a 37° C, para captura e análise de imagens por meio de uma câmara de vídeo (Basler Vision Technologies 602FC, Ahrensburg, Alemanha) conectada a um microscópio com contraste de fase (Nikon 50i, Japão), sob aumento de 100x. Foram analisados os seguintes parâmetros de cinética espermática: MT – motilidade total, MP – motilidade progressiva; VCL – velocidade curvilinear; VSL – velocidade em linha reta; VAP – velocidade do percurso médio; LIN – linearidade; STR – retilinearidade; WOB – índice de oscilação ou wobble; ALH – deslocamento lateral da cabeça; BCF – frequência de batimento flagelar cruzado e; HYP – hiperatividade. A análise das subpopulações de espermatozoides baseada na sua velocidade também foi realizada nas amostras de sêmen pelo SCA por meio dos seguintes parâmetros e critérios: RAP – espermatozoides rápidos (VCL ≥ 200 µm/s); MED – espermatozoides médios (VCL ≥ 100 a 200 < µm/s); LEN – espermatozoides lentos (VCL ≥ 20 a 100 < µm/s); EST – Espermatozoides estáticos (VCL < 20 µm/s).

4.2.4. Avaliações ambientais e cálculo dos índices bioclimáticos

As variáveis ambientais básicas, temperatura do ar (°C), temperatura do ponto de orvalho (°C), umidade relativa do ar (%), radiação térmica (kJ/m²) e velocidade do vento (m/s) foram coletadas a cada hora durante todo o ano de experimento na estação meteorológica automática CARIRA do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET 2014 –

2015) do Brasil localizada na mesma região (Longitude: 37° 44' 51,011'', Latitude: 10° 23' 58,988'') a 21,4 km de distância de onde foram mantidos os animais. A estação conta com equipamentos como Anemômetro, Termógrafo, Piranômetro e Higrógrafo, os quais medem as variáveis ambientais básicas em valores relativos. A partir destas variáveis foram feitos os cálculos para obtenção das variáveis temperatura do globo negro (Tgn, °C), validada na região Nordeste do Brasil (da Silva et al. 2019), e da pressão parcial de vapor de água (Ppv, kPa), seguindo as fórmulas abaixo:

$$Tgn = [(1,3897 Ta - 5,4421) (0,0384 \text{ Log RT} + 0,7935)] \rightarrow (\text{da Silva et al. 2019})$$

$$Ppv = [0,61078 \times 10 \exp^{(7,5 Ta)/(237,3 + Ta)}] \rightarrow (\text{Tetens 1930})$$

Onde: Ta é a temperatura do ar (°C); RT é a radiação térmica (w/m²).

O desconforto térmico sentido pelos animais devido a mudanças do ambiente foi avaliado considerando-se as variáveis ambientais médias de cada dia e calculando-se os Índices Bioclimáticos de Temperatura e Umidade (ITU), Temperatura Equivalente (ITE), Temperatura de Globo Negro e Umidade (ITGU) e de Conforto Térmico (ICT), seguindo as fórmulas abaixo:

$$ITU = [Ta - (0,55) (1-UR) (Ta-58)] \rightarrow (\text{LPHSI 1990})$$

Onde: Ta é a temperatura de bulbo seco (°F); UR é a umidade relativa em decimais (/100)

$$ITE = [(27,88 - 0,456 Ta) + (0,010754 Ta^2 - 0,4905 UR + 0,00088 UR^2 + 1,1507 V) - (0,126447V^2 + 0,019876 Ta UR) - (0,046313 Ta V)] \rightarrow (\text{Baêta et al. 1987})$$

Onde: Ta é a temperatura do ar (°C); UR é a umidade relativa (%); V é a velocidade do vento (m/s).

$$ITGU = [Tgn + 0,36 Tpo + 41,5] \rightarrow (\text{Buffington et al. 1981})$$

Onde: Tgn é a temperatura do globo negro (°C); Tpo é a temperatura do ponto de orvalho (°C).

$$ICT = [0,6678Ta + 0,4969 Ppv + 0,5444 Tgn + 0,1038 V] \rightarrow (\text{Barbosa e Silva 1994})$$

Onde: Ta é a temperatura do ar (°C); Ppv é a pressão parcial do vapor de água (kPa); Tgn é a temperatura do globo negro (°C) e V é a velocidade do vento (m/s).

Para a interpretação dos resultados, os valores dos índices bioclimáticos foram estratificados em suas respectivas escalas, que expressam a ocorrência ou não e gradua os diferentes níveis de estresse. Assim, o ITU foi classificado em quatro escalas: i) 82 < ausência de estresse; ii) ≥ 82 a 84 < estresse moderado; iii) ≥ 84 a 86 $\leq$ estresse intenso; iv) > 86 estresse extremamente severo, segundo o Livestock and Poultry Heat Stress Índices Agriculture (LPHSI 1990) em ovinos. Para o ITE foram consideradas cinco escalas citadas por Silva e Maia (2013): i) ≥ 18 a 27 $\leq$ normal; ii) > 27 a 32 $\leq$ precaução; iii) > 32 a 38 $\leq$ extrema precaução; iv) > 38 a 44 $\leq$ perigo; v) > 44 perigo extremo. O ITGU foi classificado em quatro escalas (NWS 1976): i) 74 $\leq$ ambiente confortável; ii) > 74 a 79 $\leq$ ambiente de alerta; iii) > 79 a 84 $\leq$ ambiente perigoso; iv) > 84 situação de emergência. Já para o ICT foram analisadas três escalas validadas em ovinos Santa Inês (Neves et al. 2009): i) 38 $\leq$ ausência de estresse; ii) > 38 a 45 $\leq$ ambiente de desconforto; iii) > 45 ambiente crítico. A partir dessas interpretações foram calculadas as frequências em que os valores dos índices atingiram as respectivas escalas que expressam a ocorrência ou não e gradua os diferentes níveis de estresse.

Os índices bioclimáticos foram mensurados coletando-se as variáveis ambientais básicas a cada hora em dois períodos P45 e P15, que compreenderam as fases do processo de produção de espermatozoides considerando o período total da espermatogênese e o trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo de carneiros, respectivamente (Brackett 2004). O P45 compreendeu as variáveis ambientais básicas mensuradas durante 45 dias entre o 60º e o 16º dia que antecederam as avaliações reprodutivas, representando apenas a fase da espermatogênese composta pelas fases de proliferação, crescimento, maturação e espermiogênese, período entre o início da primeira mitose da espermatogônia até a liberação do espermatozoide no túbulo seminífero nos carneiros (Cardoso e Queiroz 1988). O P15 considerou as mensurações das variáveis ambientais básicas ocorridas durante 15 dias entre o 15º ao 1º dia que antecederam as avaliações reprodutivas representando a fase do trânsito epididimário dos espermatozoides (Amir et al. 1968).

4.2.5. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com a ajuda do programa computacional SAS 9.1®. Inicialmente os dados das avaliações reprodutivas foram agrupados aos pares de maneira que a média de cada par representou um dos três quadrimestres do ano (duas avaliações reprodutivas por quadrimestre). Em seguida, os dados foram submetidos à análise de normalidade e homocedasticidade mediante os testes de Shapiro–Wilk ($P > 0,05$) e Hartley ($H_c > H$) e, quando necessário, foram transformados à potência.

Os dados com distribuição normal e aqueles que apresentaram esse comportamento após a transformação foram avaliados usando-se um modelo linear de efeitos mistos do pacote PROC MIXED. O modelo incluiu o efeito do carneiro, da sua idade, da data das avaliações reprodutivas e a interação entre eles. O modelo estatístico relativo às análises das variáveis estudadas foi representado por:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + \beta_j + T\beta_{ij} + \gamma_k + \epsilon_{ijk}$$

Onde: Y_{ijk} é a variável dependente, μ é a média de todas as observações, T_i representa o efeito da data da avaliação, β_j é a idade do carneiro, $T\beta_{ij}$ representa a interação entre a data da avaliação e a idade do carneiro, γ_k é o efeito do carneiro e ϵ_{ijk} representa o erro experimental.

As médias das variáveis foram comparadas usando o teste de Tukey. As variáveis que não apresentaram normalidade mesmo depois da transformação foram analisadas com estatística não paramétrica utilizando o teste de Kruskal-Wallis e para comparações múltiplas foi usado o teste *póst-hoc* de Dunn. A correlação de Pearson e a Regressão foram utilizadas para correlacionar e determinar a relação dos índices bioclimáticos (variáveis independentes) com os parâmetros reprodutivos (variáveis dependentes). Para todas as análises foi considerado nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

4.3. Resultados

Os resultados relativos às variáveis ambientais básicas e suas correlações, assim como os índices bioclimáticos estão expostos, respectivamente, nas Tabelas 1, 2 e 3. O comportamento dos índices bioclimáticos no P45 e P15, que precederam as avaliações reprodutivas, assim como as frequências médias em que seus valores determinaram a ocorrência ou não de estresse térmico nos quadrimestres do ano estão expostos na Figura 1.

A variável ambiental básica umidade relativa do ar apresentou correlações negativas altas com a temperatura do ar e a radiação térmica, mas apresentou correlação negativa moderada com a velocidade do vento ($p < 0,05$). A temperatura do ar por sua parte apresentou correlação positiva alta com a radiação térmica e positiva moderada com a velocidade do vento ($p < 0,05$). Por último, a velocidade do vento apresentou correlação positiva baixa com a radiação térmica ($p < 0,05$).

As médias do ITU, ITE, ITGU e ICT tanto no P45 quanto no P15 variaram entre os quadrimestres e foram maiores no Q1 em relação ao Q2 e Q3 ($p < 0,05$). Levando-se em

consideração o P45, as menores médias do ITU e ITE foram observadas no Q3 ($p < 0,05$) e do ITGU e ICT foram obtidas tanto no Q2 quanto no Q3 ($p > 0,05$).

Tabela 1. Variáveis ambientais básicas coletadas ao longo de 12 meses do experimento nos diferentes quadrimestres do ano.

Quadrimestres do ano	Variáveis ambientais básicas											
	Ta (°C)			UR (%)			V (m/s)			RT (kJ/m²)		
	Média	Mín	Máx	Média	Mín	Máx	Média	Mín	Máx	Média	Mín	Máx
Q1	26,42	17,80	38,10	69,49	25,00	100	3,95	0	10,60	1087,56	0	4930,80
Q2	23,31	15,70	36,00	84,41	29,00	100	2,60	0	7,70	824,42	0	5051,20
Q3	23,27	14,60	36,70	80,81	26,00	100	3,31	0	8,90	1034,17	0	4792,70

Primeiro (Q1), segundo (Q2) e terceiro (Q3) quadrimestre do ano; Ta = temperatura do ar; UR = umidade relativa do ar; V = velocidade do vento; RT = radiação térmica; Mín = Mínimo; Máx = Máximo.

Tabela 2. Correlações entre as variáveis ambientais básicas ao longo de 12 meses do experimento.

	UR (%)	Ta (°C)	V (m/s)	RT (w/m ²)
UR (%)	-	-0,91 *	-0,40 *	-0,61 *
Ta (°C)		-	0,39 *	0,66 *
V (m/s)			-	0,22 *
RT (w/m ²)				-

UR = umidade relativa do ar; Ta = temperatura do ar; V = velocidade do vento; RT = radiação térmica. * $P < 0,05$

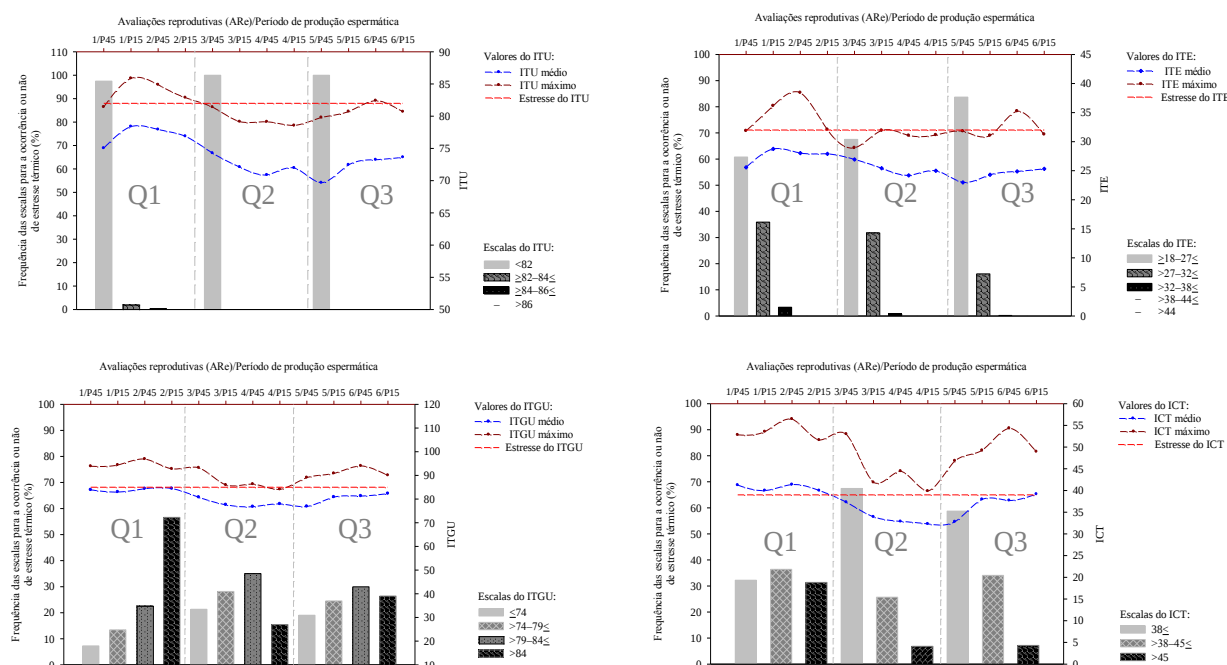


Figura 1. Comportamento e frequências em que os Índices Bioclimáticos de Temperatura e Umidade (ITU), Temperatura Equivalente (ITE), Temperatura de Globo Negro e Umidade (ITGU) e Conforto Térmico (ICT) atingiram escalas de estresse térmico após sua mensuração nos períodos que compreenderam a espermatogênese (P45) e o trânsito dos espermatozoides no epidídimo (P15) que ocorreram antes das avaliações reprodutivas (ARe) de carneiros Santa Inês realizadas ao longo do primeiro (Q1), segundo (Q2) e terceiro (Q3) quadrimestre do ano.

Tabela 3. Índices bioclimáticos ao longo dos quadrimestres do ano mensurados nos períodos que compreenderam a espermatogênese (P45) e o trânsito dos espermatozoides no epidídimo (P15) que ocorreram antes das avaliações reprodutivas de carneiros Santa Inês.

Índices bioclimáticos / Período produção espermática	Quadrimestres do ano						Média ± EP	p-valor
	Q1		Q2		Q3			
	Média ± EP	Mín – Máx	Média ± EP	Mín – Máx	Média ± EP	Mín – Máx		
ITU – P45	76,49 ± 0,10 a	67,27 – 84,88	72,57 ± 0,10 b	60,38 – 81,40	71,46 ± 0,11 c	58,98 – 82,42	73,51 ± 0,10	<0,001
ITE – P45	26,81 ± 0,08 a	18,61 – 38,41	25,56 ± 0,08 b	14,52 – 31,04	23,93 ± 0,08 c	13,08 – 35,24	25,43 ± 0,08	<0,001
ITGU – P45	84,05 ± 0,14 a	69,55 – 96,91	78,79 ± 0,16 b	59,96 – 93,18	79,08 ± 0,17 b	61,09 – 93,99	80,64 ± 0,16	<0,001
ICT – P45	42,23 ± 0,26 a	25,80 – 56,49	35,51 ± 0,22 b	18,68 – 52,98	35,70 ± 0,23 b	19,18 – 54,33	37,81 ± 0,24	<0,001
ITU – P15	77,64 ± 0,24 a	66,41 – 85,87	72,04 ± 0,25 c	62,42 – 79,14	73,04 ± 0,21 b	63,87 – 80,72	74,24 ± 0,23	<0,001
ITE – P15	28,33 ± 0,16 a	14,34 – 36,16	25,21 ± 0,18 b	16,58 – 31,91	24,81 ± 0,13 b	18,12 – 31,24	26,12 ± 0,16	<0,001
ITGU – P15	83,67 ± 0,31 a	69,23 – 94,39	77,78 ± 0,28 c	62,48 – 85,95	81,57 ± 0,27 b	67,06 – 90,83	81,01 ± 0,29	<0,001
ICT – P15	41,28 ± 0,46 a	26,81 – 53,54	33,46 ± 0,39 c	20,14 – 41,85	39,09 ± 0,42 b	24,22 – 49,24	37,95 ± 0,42	<0,001

Índices de Temperatura e Umidade (ITU), Temperatura Equivalente (ITE), Temperatura de Globo Negro e Umidade (ITGU) e Conforto Térmico (ICT); primeiro (Q1), segundo (Q2) e terceiro (Q3) quadrimestre do ano; EP = erro padrão; Mín = Mínimo; Máx = Máximo. Valores com letras diferentes na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$).

As menores médias do ITU, ITGU e ICT no P15 foram verificadas no Q2 ($p < 0,05$), já o ITE deste período apresentou menores valores no Q2 e Q3 em relação ao Q1 ($p < 0,05$). De uma maneira geral, os valores máximos de todos os índices bioclimáticos registrados no P45 e P15 foram muito superiores no Q1 em relação ao Q2 e Q3. À exceção do ITE-P15 todos os demais índices bioclimáticos no P45 e P15 apresentaram os menores valores mínimos no Q2 e Q3. As maiores frequências em que os valores dos índices bioclimáticos atingiram as escalas consideradas de alerta e precaução, perigosas e estressoras foram observadas no Q1 em comparação com Q2 e Q3, em especial para o ITGU e ICT.

Os resultados das avaliações reprodutivas ao longo dos quadrimestres do ano do experimento estão expostos na Tabela 4. As médias dos parâmetros clínico-andrológicos (CE, VT) e daqueles relacionados ao sêmen (VE e CEsp) não variaram entre os quadrimestres ($p > 0,05$). Também não sofreram variações ($p > 0,05$) entre os quadrimestres alguns poucos parâmetros cinéticos (STR, WOB e MED) e os morfológicos dos espermatozoides (Dma e Dme). Todos os demais parâmetros cinéticos espermáticos variaram ao longo dos quadrimestres do ano ($p < 0,05$). Os parâmetros MT, VCL, VSL, VAP e ALH apresentaram menores médias no Q1 quando comparados com o Q2 e Q3 ($p < 0,05$), os quais não diferiram entre si para estes parâmetros ($p > 0,05$). A MP apresentou menor média no Q1 em relação ao Q3 ($p < 0,05$), não diferindo com o Q2 ($p > 0,05$). As médias de LIN, BCF e HYP no Q1 foram menores que no Q3 ($p < 0,05$) e aquelas do Q2 não diferiram com as dos outros quadrimestres ($p > 0,05$). No Q1 foram obtidas menores médias de RAP, assim como maiores médias do LEN e EST em relação ao Q2 e Q3 ($p < 0,05$).

Os resultados da correlação entre os índices bioclimáticos e os parâmetros reprodutivos estão expostos na Tabela 5. Não foram observadas correlações entre os índices bioclimáticos no P45 e P15 e os parâmetros CE, VT, VE, CEsp, MED e Dma ($p > 0,05$). O ITU e ITE apresentaram correlações negativas com MP, VCL, VSL, VAP, HYP ($> 0,30$; $p < 0,05$), WOB e BCF ($0,30 \leq$; $p < 0,05$), e correlações positivas com EST ($> 0,30$; $p < 0,05$) no P45 e P15. Em adição também foram verificadas correlações negativas entre ITU e MT no P45 ($> 0,30$; $p < 0,05$) e no P15 ($0,30 \leq$; $p < 0,05$). O ITU apresentou correlações negativas com LIN, SRT ($0,30 \leq$; $p < 0,05$) no P45; correlação negativa com ALH e RAP ($> 0,30$; $p < 0,05$), e positiva com LEN ($> 0,30$; $p < 0,05$) no P45 e P15. O ITU apresentou ainda correlação negativa com o Dme ($0,30 \leq$; $p < 0,05$) no P15. O ITE correlacionou-se negativamente com MT, ALH e RAP no P45 ($0,30 \leq$; $p < 0,05$) e no P15 ($> 0,30$; $p < 0,05$); com LIN ($0,30 \leq$; $p < 0,05$) no P45 e P15, e com SRT ($0,30 \leq$; $p < 0,05$) no P45. O ITE e LEN apresentaram correlação positiva entre si no P45 ($0,30 \leq$; $p < 0,05$) e no P15 ($> 0,30$; $p < 0,05$).

O ITGU e ICT apresentaram correlações negativas com MT, MP, VCL, VSL, VAP, ALH, HYP, RAP ($> 0,30$; $p < 0,05$), WOB e BCF ($0,30 \leq$; $p < 0,05$) no P45; e no P15 com MT, VCL, VAP e ALH ($0,30 \leq$; $p < 0,05$) e RAP ($> 0,30$; $p < 0,05$). O ITGU e ICT correlacionaram-se positivamente com LEN no P45 ($> 0,30$; $p < 0,05$) e no P15 ($0,30 \leq$; $p < 0,05$); e com EST ($> 0,30$; $p < 0,05$) no P45 e P15. O ITGU e ICT se correlacionaram negativamente com LIN e BCF ($0,30 \leq$; $p < 0,05$) no P45. O ITGU apresentou correlação negativa com VSL ($0,30 \leq$; $p < 0,05$) no P15.

As análises dos coeficientes de regressão linear determinaram o efeito significativo ($p < 0,05$) dos índices bioclimáticos mensurados no P45 e P15 sobre os parâmetros reprodutivos (Tabela 6). Os parâmetros gerados a partir das avaliações clínico-andrológicas (CE, VT) e do sêmen (VE, CEsp) e alguns da avaliação da cinética (STR, WOB, MED) e da morfologia dos espermatozoides (Dma, Dme) que não apresentaram variação nos quadrimestres ($p > 0,05$) também não foram influenciados pelos índices bioclimáticos avaliados no P45 e P15 ($p > 0,05$).

As análises da regressão linear demonstraram que os parâmetros cinéticos MP, VCL, VSL, VAP e HYP (tendência negativa) e LEN (tendência positiva) foram afetados significativamente por alguns índices bioclimáticos avaliados no P45 e P15 ($p < 0,05$). Adicionalmente foi observado que todos os índices bioclimáticos no P45 e P15 apresentaram

comportamento antagonico em relação aos parâmetros cinéticos que tiveram variação nos quadrimestres à exceção do LEN e EST.

Tabela 4. Parâmetros das avaliações reprodutivas realizadas ao longo dos quadrimestres do ano do experimento em carneiros Santa Inês.

Parâmetros reprodutivos	Quadrimestres do ano			Média ± EP	p-valor
	Q1	Q2	Q3		
	Média ± EP	Média ± EP	Média ± EP		
CE (cm)	32,41 ± 0,32 a	32,43 ± 0,29 a	32,95 ± 0,28 a	32,60 ± 0,30	0,813
VT (cm ³)	353,61 ± 8,25 a	350,18 ± 10,75 a	376,47 ± 10,76 a	360,09 ± 9,92	0,893
VE (mL)	1,17 ± 0,65 a	1,31 ± 0,63 a	1,19 ± 0,82 a	1,22 ± 0,70	0,408
CEsp (x 10 ⁹ SPTZ/mL)	3,67 ± 0,19 a	4,11 ± 0,23 a	4,58 ± 0,34 a	4,12 ± 0,25	0,211
MT (%)	74,69 ± 4,49 b	86,77 ± 2,84 a	89,21 ± 1,36 a	83,56 ± 2,90	0,004
MP (%)	33,67 ± 3,48 b	42,32 ± 1,64 b	50,01 ± 1,61 a	42,00 ± 2,24	< 0,001
VCL (µm/s)	221,89 ± 10,61 b	274,43 ± 7,55 a	274,46 ± 8,03 a	256,93 ± 8,73	< 0,001
VSL (µm/s)	93,21 ± 6,77 b	116,02 ± 4,23 a	122,85 ± 4,01 a	110,69 ± 5,00	< 0,001
VAP (µm/s)	124,85 ± 7,38 b	157,18 ± 4,65 a	159,69 ± 4,76 a	147,24 ± 5,60	< 0,001
LIN (%)	40,71 ± 1,71 b	42,45 ± 0,68 ab	44,74 ± 0,79 a	42,63 ± 1,06	0,041
STR (%)	72,49 ± 2,16 a	73,79 ± 0,77 a	76,67 ± 0,69 a	74,31 ± 1,21	0,173
WOB (%)	55,48 ± 1,08 a	57,41 ± 0,44 a	57,96 ± 0,54 a	56,95 ± 0,69	0,060
ALH (µm)	3,26 ± 0,14 b	3,69 ± 0,05 a	3,68 ± 0,07 a	3,54 ± 0,09	0,004
BCF (Hz)	43,54 ± 2,01 b	46,85 ± 0,85 ab	48,88 ± 0,84 a	46,42 ± 1,23	0,025
HYP (%)	25,77 ± 2,93 b	34,68 ± 1,66 ab	38,49 ± 2,21 a	32,98 ± 2,26	0,002
RAP (%)	11,37 ± 3,21 b	28,83 ± 2,65 a	27,06 ± 3,29 a	22,42 ± 3,05	< 0,001
MED (%)	40,35 ± 4,05 a	43,51 ± 2,77 a	47,31 ± 2,53 a	43,72 ± 3,12	0,357
LEN (%)	23,21 ± 2,68 a	15,66 ± 1,31 b	15,29 ± 1,58 b	18,05 ± 1,86	< 0,001
EST (%)	28,57 ± 5,46 a	13,22 ± 2,84 b	10,93 ± 1,37 b	17,57 ± 3,22	< 0,001
Dma (%)	2,66 ± 0,25 a	2,31 ± 0,24 a	2,27 ± 0,26 a	2,41 ± 0,25	0,420
Dme (%)	1,92 ± 0,36 a	3,52 ± 0,52 a	2,15 ± 0,28 a	2,53 ± 0,39	0,067

CE = circunferência escrotal; VT = volume testicular; VE = volume do ejaculado; CEsp = concentração espermática; MT = motilidade total; MP = motilidade progressiva; VCL = velocidade curvilinear; VSL = velocidade em linha reta; VAP = velocidade do percurso médio; LIN = linearidade; STR = retilinearidade; WOB = índice de oscilação ou wobble; ALH = amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF = frequência de batimento flagelar cruzado; HYP = hiperatividade; RAP = espermatozoides rápidos; MED = espermatozoides médios; LEN = espermatozoides lentos; EST = espermatozoides estáticos; Dma = defeitos maiores; Dme = defeitos menores. Primeiro (Q1), segundo (Q2) e terceiro (Q3) quadrimestre do ano; EP = erro padrão. Valores com letras diferentes na mesma linha diferem significativamente (p<0,05).

Tabela 5. Correlação entre os índices bioclimáticos mensurados nos períodos que compreenderam a espermatogênese (P45) e o trânsito dos espermatozoides no epidídimo (P15) que ocorreram antes das avaliações e os parâmetros reprodutivos de carneiros Santa Inês.

Parâmetros reprodutivos	Índice bioclimático/Período de produção espermática							
	ITU		ITE		ITGU		ICT	
	P45	P15	P45	P15	P45	P15	P45	P15
CE (cm)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
VT (cm ³)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
VE (mL)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CEsp (x 10 ⁹ SPTZ/mL)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
MT (%)	-0,31 *	-0,28 *	-0,27 *	-0,31 *	-0,30 *	-0,19 *	-0,30 *	-0,17 *
MP (%)	-0,42 *	-0,32 *	-0,44 *	-0,40 *	-0,36 *	NS	-0,36 *	NS
VCL (µm/s)	-0,39 *	-0,39 *	-0,31 *	-0,40 *	-0,40 *	-0,29 *	-0,40 *	-0,27 *
VSL (µm/s)	-0,36 *	-0,33 *	-0,33 *	-0,36 *	-0,35 *	-0,20 *	-0,35 *	NS
VAP (µm/s)	-0,40 *	-0,39 *	-0,33 *	-0,40 *	-0,40 *	-0,28 *	-0,40 *	-0,26 *
LIN (%)	-0,22 *	NS	-0,25 *	-0,21 *	-0,18 *	NS	-0,19 *	NS
STR (%)	-0,19 *	NS	-0,23 *	NS	NS	NS	NS	NS
WOB (%)	-0,24 *	-0,22 *	-0,22 *	-0,24 *	-0,23 *	NS	-0,24 *	NS
ALH (µm)	-0,33 *	-0,34 *	-0,27 *	-0,34 *	-0,34 *	-0,26 *	-0,34 *	-0,24 *
BCF (Hz)	-0,29 *	-0,24 *	-0,28 *	-0,28 *	-0,26 *	NS	-0,27 *	NS
HYP (%)	-0,34 *	-0,31 *	-0,33 *	-0,34 *	-0,32 *	NS	-0,33 *	NS
RAP (%)	-0,37 *	-0,40 *	-0,27 *	-0,39 *	-0,40 *	-0,33 *	-0,40 *	-0,31 *
MED (%)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
LEN (%)	0,33 *	0,31 *	0,28 *	0,33 *	0,32 *	0,20 *	0,33 *	0,19 *
EST (%)	0,41 *	0,42 *	0,32 *	0,43 *	0,43 *	0,33 *	0,43 *	0,31 *
Dma (%)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Dme (%)	NS	-0,19 *	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Índices de Temperatura e Umidade (ITU); Temperatura Equivalente (ITE); Temperatura de Globo Negro e Umidade (ITGU); Conforto Térmico (ICT); CE = circunferência escrotal; VT = volume testicular; VE = volume do ejaculado; CEsp = concentração espermática; MT = motilidade total; MP = motilidade progressiva; VCL = velocidade curvilinear; VSL = velocidade em linha reta; VAP = velocidade do percurso médio; LIN = linearidade; STR = retilinearidade; WOB = índice de oscilação ou wobble; ALH = amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF = frequência de batimento flagelar cruzado; HYP = hiperatividade; RAP = espermatozoides rápidos; MED = espermatozoides médios; LEN = espermatozoides lentos; EST = espermatozoides estáticos; Dma = defeitos maiores; Dme = defeitos menores. * P < 0,05; e NS = não significativo.

Tabela 6. Análise de regressão linear dos parâmetros reprodutivos em função dos índices bioclimáticos mensurados nos períodos que compreenderam a espermatogênese (P45) e o trânsito dos espermatozoides no epidídimo (P15) que ocorreram antes das avaliações reprodutivas de carneiros Santa Inês.

Parâmetros Reprodutivos	Índice bioclimático/Período de produção espermática							
	ITU		ITE		ITGU		ICT	
	P45	P15	P45	P15	P45	P15	P45	P15
CE (cm)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
VT (cm ³)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
VE (mL)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CEsp (x 10 ⁹ SPTZ/mL)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
MT (%)	-2,93 ^{NS} (-299,48)	-2,36 ^{NS} (-258,87)	-4,57 ^{NS} (-200,43)	-4,01 ^{NS} (-188,47)	-2,52 ^{NS} (-286,95)	-1,43 ^{NS} (-200,27)	-1,96 ^{NS} (-56,26)	-0,93 ^{NS} (-119,49)
MP (%)	-2,98 * (-261,09)	-1,99 ^{NS} (-189,80)	-5,55 * (-183,33)	-3,89 * (-143,33)	-2,27 ^{NS} (-224,84)	-0,69 ^{NS} (-99,03)	-1,79 ^{NS} (-109,48)	-0,36 ^{NS} (-56,26)
VCL (µm/s)	-11,20 ^{NS} (-1081,16)	-9,81 * (-985,13)	-15,76 ^{NS} (-660,76)	-15,71 ^{NS} (-667,57)	-10,20 * (-1079,92)	-6,85 * (-812,91)	-7,91 * (-556)	-4,62 * (-433,62)
VSL (µm/s)	-5,87 ^{NS} (-542,40)	-4,57 * (-449,72)	-9,45 ^{NS} (-352,20)	-7,96 ^{NS} (-318,61)	-4,94 * (-508,62)	-2,56 * (-318,48)	-3,86 * (-256,26)	-1,62 * (-173,32)
VAP (µm/s)	-7,26 ^{NS} (-681,42)	-6,15 * (-603,67)	-10,65 ^{NS} (-419,93)	-10,08 ^{NS} (-410,74)	-6,47 * (-668,49)	-4,06 * (-477,05)	-5,02 * (-337,05)	-2,70 * (-250,81)
LIN (%)	-0,71 ^{NS} (-95,02)	-0,43 ^{NS} (-74,86)	-1,40 ^{NS} (-78,32)	-0,91 ^{NS} (-66,36)	-0,51 ^{NS} (-83,96)	-0,09 ^{NS} (-50,11)	-0,40 ^{NS} (-57,96)	-0,02 ^{NS} (-43,86)
STR (%)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
WOB (%)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ALH (µm)	-0,09 ^{NS} (-10,18)	-0,07 ^{NS} (-9,46)	-0,12 ^{NS} (-6,82)	-0,12 ^{NS} (-6,85)	-0,08 ^{NS} (-10,19)	-0,05 ^{NS} (-8,19)	-0,06 ^{NS} (-5,96)	-0,03 ^{NS} (-5,03)
BCF (Hz)	-1,00 ^{NS} (-120,07)	-0,74 ^{NS} (-101,45)	-1,80 ^{NS} (-92,38)	-1,33 ^{NS} (-81,21)	-0,81 ^{NS} (-111,72)	-0,38 ^{NS} (-77,42)	-0,63 ^{NS} (-70,37)	-0,23 ^{NS} (-55,30)
HYP (%)	-2,46 * (-214,03)	-1,83 ^{NS} (-169,25)	-4,13 * (-138,44)	-3,30 * (-119,17)	-2,01 ^{NS} (-195,24)	-0,92 ^{NS} (-108,49)	-1,57 ^{NS} (-92,48)	-0,57 ^{NS} (-55,07)
RAP (%)	-3,46 ^{NS} (-277,16)	-3,18 ^{NS} (-258,52)	-4,60 ^{NS} (-140,62)	-4,91 ^{NS} (-151,06)	-3,25 ^{NS} (-285,13)	-2,40 ^{NS} (-217,68)	-2,51 ^{NS} (-117,46)	-1,64 ^{NS} (-85,41)
MED (%)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
LEN (%)	1,66 * (-104,35)	1,42 * (-87,48)	2,39 * (-43,23)	2,31 * (-42,53)	1,49 * (-102,20)	0,95 * (-59,26)	1,15 * (-25,71)	0,63 * (-6,33)
EST (%)	3,6 ^{NS} (-247,34)	2,95 ^{NS} (-201,88)	5,43 ^{NS} (-121,42)	4,96 ^{NS} (-112,07)	3,14 ^{NS} (-235,68)	1,84 ^{NS} (-132,33)	2,44 ^{NS} (-74,79)	1,21 ^{NS} (-28,94)
Dma (%)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Dme (%)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Índices de Temperatura e Umidade (ITU); Temperatura Equivalente (ITE); Temperatura de Globo Negro e Umidade (ITGU); Conforto Térmico (ICT); CE = circunferência escrotal; VT = volume testicular; VE = volume do ejaculado; Cesp = concentração espermática; MT = motilidade total; MP = motilidade progressiva; VCL = velocidade curvilínea; VSL = velocidade em linha reta; VAP = velocidade do percurso médio; LIN = linearidade; STR = retilinearidade; WOB = índice de oscilação ou wobble; ALH = amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF = frequência de batimento flagelar cruzado; HYP = hiperatividade; RAP = espermatozoides rápidos; MED = espermatozoides médios; LEN = espermatozoides lentos; EST = espermatozoides estáticos; Dma = defeitos maiores; Dme = defeitos menores. Ordem da equação de regressão linear = inclinação da reta / (intercessão da reta). * P < 0,05; e NS = não significativo.

4.4. Discussão

Nos ovinos a atividade reprodutiva e produtiva sofre influência ambiental com a exposição direta dos animais às elevadas temperaturas do ar e radiação térmica (Sevi et al. 2001;

Teodoro et al. 2013), assim como à alta umidade relativa do ar consequente do incremento da pluviosidade (Frazão Sobrinho et al. 2014).

As interações entre radiação térmica, temperatura e umidade elevadas geram estresse térmico provocando desconforto fisiológico que obriga os animais a reagirem para restabelecerem a sua homeotermia, diminuindo o consumo de alimento e metabolismo com consequente diminuição das concentrações hormonais (Silanikove 2000). O animal reage aumentando a vasodilatação periférica para dissipar o calor, com gasto da energia que seria usada para produção e reprodução que é desviada para resistir ao estresse térmico (Silanikove 2000), com consequente redução do desempenho reprodutivo (Arias et al. 2008) e produtivo (Collier et al. 2006) chegando, em casos extremos, a comprometer a vida do animal (Fisher et al. 2005).

No presente trabalho foi verificado que a temperatura do ar teve um comportamento variável ao longo do ano, apresentando maiores médias no primeiro quadrimestre (Q1), caracterizado na sub-região Agreste do Nordeste brasileiro por ser uma época seca e início da transição para a época chuvosa, quando comparadas às médias do segundo (Q2) e terceiro (Q3) quadrimestres. Observou-se também que a radiação térmica apresentou maiores valores médios no Q1 e Q3 em relação ao Q2. Tanto a temperatura do ar como a radiação térmica foram correlacionadas negativamente com a umidade relativa do ar cujos menores valores foram observados no Q1 em relação ao Q2 e Q3.

Resultados similares foram reportados por Santos et al. (2013) na mesma sub-região, obtendo temperaturas do ar maiores e umidades relativas menores na época seca quando comparadas com a época de chuva. Tem sido demonstrado que ambientes semelhantes ao Q1 caracterizados com altas temperaturas e baixas umidades são associados à baixa qualidade do sêmen (Verón et al. 2021). Já a velocidade do vento foi maior no Q1 em relação ao Q2 e Q3, o que de certa forma pode ter amenizado o efeito das elevadas temperaturas típicas do período seco com a redução dos efeitos da insolação nos ovinos, como descrito por Cena e Monteith (1975).

Apesar da análise das variáveis ambientais básicas ser amplamente utilizada de forma isolada, a combinação dos seus efeitos e a relativização de sua importância têm sido propostas e utilizadas para monitorar o estresse ambiental sofrido pelos animais de produção. Sabe-se que os valores dos índices bioclimáticos ITU, ITE, ITGU e ICT são usados para identificar e classificar o estresse térmico ambiental, visto que consideram a combinação das variáveis básicas e as relativizam apresentando correlações positivas com as temperaturas retal e da pele do escroto e com as frequências respiratória e cardíaca (Silva et al. 2007; Dikmen e Hansen 2009; Nascimento et al. 2019), sinais vitais que, ao serem incrementados, produzem mudanças drásticas nas funções biológicas afetando negativamente a fisiologia reprodutiva dos animais (Al-Dawood 2017).

Em geral, o Q1 apresentou maiores valores médios e máximos do ITU e ITE que o Q2 e Q3, similar ao que foi reportado por Menegassi et al. (2016) em região tropical que apresentou valores maiores de ITU e ITE no verão – primeiro quadrimestre do ano. Apesar disso, os valores médios do ITU e ITE no P45 e P15 se mantiveram na escala de ausência de estresse e ambiente normal durante todos os quadrimestres do ano, à exceção do ITE-P15 no Q1 que classificou o ambiente na escala de precaução segundo Silva e Maia (2013). Porém, no Q1 foram observadas maiores frequências em que o ITU (0,41%) e ITE (3,34%) atingiram as escalas de estresse térmico intenso (≥ 84 a $86 \leq$) e de extrema precaução (> 32 a $38 \leq$), respectivamente, em relação ao Q2 (0% e 0,72%) e Q3 (0% e 0,22%) e, estes extremos, mesmo que de forma pontual e pouco frequentes, podem ter sido suficientes para gerar um maior desconforto nos animais no primeiro quadrimestre.

Ebi et al. (2009) manifestam que a vulnerabilidade do animal a mudanças climáticas é o produto da interação entre a magnitude e a frequência de exposição a climas extremos, o que pode ao final afetar negativamente a fisiologia reprodutiva, piorando ainda mais se o animal apresenta alguma suscetibilidade biofísica. Segundo a Livestock and Poultry Heat

Stress Índices Agriculture (LPHSI 1990), o ITU acima de 82 caracteriza o ambiente com presença de estresse térmico moderado nos ovinos.

Carneiros maduros foram mantidos por Howarth (1969) por um período de quatro dias em ambiente controlado com temperatura de 32 °C (89,6 °F) e umidade de 65%, representando um ITU de 83,5 classificado como de estresse moderado. Foi verificada pelo autor uma redução significativa da motilidade espermática e do potencial de fertilização do sêmen destes carneiros mensurado pela viabilidade dos embriões produzidos a partir do acasalamento de ovelhas. Em adição, El-Darawany (1999) relatou que quando o valor de ITU é acima de 84,3, classificado como estresse térmico intenso, a qualidade do sêmen de carneiros é deteriorada significativamente pelos danos estruturais e funcionais, com a redução drástica da motilidade dos espermatozoides e da taxa de concepção.

Ambientes classificados como de extrema precaução pelo ITE por sua vez afetam negativamente os parâmetros reprodutivos e produtivos na espécie bovina segundo Freitas et al. (2020) que, ao estudarem o sêmen de touros da raça Gir, mostraram que o vigor e a concentração dos espermatozoides foram reduzidos quando este índice foi acima de 35 e, segundo Ludovico et al. (2015), que na raça holandesa demonstraram uma redução na produção de leite quando o valor foi acima de 32.

Também no Q1 foram observados maiores valores médios e máximos, de ITGU e ICT em relação ao Q2 e Q3. Estes índices atingiram no Q1 escalas de emergência térmica (> 84) e de desconforto/crítico (> 38 a 45 e > 45), respectivamente, resultados que coincidem com os reportados por Cordão (2010) e Neves et al. (2009) em regiões semiáridas na época de calor. Também se observou no Q1 maiores frequências de registros de ITGU (56,60%) e ICT (31,37%) acima dos valores de emergência e críticos em comparação ao Q2 (15,49% e 6,85%, respectivamente) e Q3 (26,40% e 7,10%, respectivamente).

Valores do ITGU acima de 84 ocasionam prejuízos fisiológicos e reprodutivos ao animal, o que significa que eles precisam urgentemente de sombreamento ou resfriamento (Buffington et al. 1981). Nós observamos que no Q1 o ITGU-P45 apresentou média de 84,05, possibilitando algum tipo de alteração na etapa da espermatogênese. Determinou-se nos ovinos que a frequência respiratória se incrementa em até 32 movimentos/minuto quando o valor do ITGU muda de 78 para 83 (Andrade et al. 2007), considerando 20-34 movimentos/minuto como faixa fisiologicamente normal em ovinos (Reece 2015).

Baseando-se nisso pode-se afirmar que os carneiros do nosso estudo se mantiveram numa escala de nível de estresse média a alta podendo ter alcançado no Q1 desde uma frequência respiratória entre 60 e 80 movimentos/minuto (Silanikove 2000), ou até entre 80 e 120 movimentos/minuto, quando considerada a interação entre os valores máximos de ITGU e a maior frequência em que seus valores atingiram as escalas de emergência térmica. Portanto, pode-se estimar que no Q1 o valor da frequência respiratória esteve acima do limite da capacidade adaptativa da raça Santa Inês que é de 113 movimentos/minuto (Gesualdi Júnior et al. 2014).

Em contrapartida, no P45 do Q2 os valores médios de ITGU e ICT foram ≤ 79 e ≤ 38 , mantendo-se nas escalas de ambiente de alerta e ausência de estresse, respectivamente. No P45 do Q3 o valor do ITGU (79,08) foi apenas pouco superior ao valor máximo da escala de ambiente de alerta, entrando na escala de ambiente perigoso, enquanto o valor de ICT manteve-se na escala de ausência de estresse (Neves et al. 2009; Baêta e Sousa 2010). Adicionalmente no P15 do Q2 o ITGU (77,78) e ICT (33,46) classificaram o ambiente como em alerta e ausência de estresse, respectivamente. Tem sido demonstrado que ovinos da raça Santa Inês não sofrem mudanças significativas na frequência respiratória quando o valor do ITGU chega a 79 (Santos et al. 2013). Também existem relatos de que não são alteradas a frequência respiratória quando o ICT chega a 38, nem a temperatura retal quando este índice permanece na faixa de 44,5 em ovinos de pelagem preta, a 45,5 naqueles de pelagem castanha (Neves et al. 2009). Os carneiros utilizados no nosso trabalho tinham diferentes padrões de pelagem aceitos para a raça Santa Inês, variando entre o castanho claro ao preto.

Já no P15 do Q3 houve um ligeiro incremento do ITGU e ICT, que alcançaram valores de 81,57 e 39,09 e caracterizaram o ambiente como perigoso e de desconforto, respectivamente. Adicionalmente, quando considerados os valores máximos destes índices neste período, o ambiente caracterizou-se como de emergência (>84) e crítico (>45) com potencial geração de estresse aos animais. Entretanto, as frequências em que estes índices atingiram escalas de estresse no P15 do Q3 foram ligeiramente menores para o ITGU (41,05%) e menos da metade para o ICT (14,29%) comparativamente ao Q1 (54,42% e 33,33%, respectivamente). O incremento dos valores médios e das frequências em que o ITGU e ICT atingiram as escalas de estresse no P15 do Q3, poderiam, de certo modo, sobrepassar a capacidade de termorregulação dos carneiros da raça Santa Inês, submetidos a curtos períodos de estresse térmico, quando comparada com outras raças (MacManus e Miranda 1997; Titto et al. 2016; Santos et al. 2006; Castro et al. 2020), em especial na manutenção da qualidade do sêmen e principalmente em consequência do ICT.

A circunferência escrotal, o volume testicular, o volume do ejaculado e a concentração espermática não foram alterados ao longo do ano e não apresentaram correlação nem tiveram relação com os índices bioclimáticos em nenhum dos períodos avaliados. Como se sabe, a idade e o peso são as variáveis que mais influenciam as dimensões testiculares, a exemplo da circunferência escrotal (Martins et al. 2003; Al-kawmani 2019). Aparentemente são necessárias temperaturas extremas como aquelas submetidas durante a insulação escrotal para provocar alterações como a diminuição da concentração espermática, apesar do volume do ejaculado de sêmen de carneiros Santa Inês, mesmo nesta condição, não ter apresentado variação (Moreira et al. 2001). Possivelmente os carneiros utilizados no nosso trabalho não sofreram variações na circunferência escrotal porque eles já eram maduros sexualmente e não apresentaram mudanças do seu peso ao longo do ano, tendo atingido a maturidade sexual e o desenvolvimento corpóreo máximo antes das avaliações reprodutivas. Além disso, as temperaturas altas neste trabalho talvez não tenham sido suficientemente estressoras para a variação destas características, em especial se considerarmos as raças autóctones, naturalmente adaptadas às regiões de origem como é o caso do ovino Santa Inês, originária do Nordeste do Brasil.

Divergências entre os resultados obtidos em nosso trabalho e outros relatados na literatura quanto à influência ambiental sobre a circunferência escrotal (Sarlós et al. 2013), o volume testicular (Avdi et al. 2004), o volume do ejaculado e a concentração espermática (Karagiannidis et al. 2000; Milczewski et al. 2015) podem ter decorrido do fato de muitos destes estudos citados terem sido conduzidos em ambientes sob influência do fotoperíodo (Lincoln e Davidson 1977), cujos efeitos se dão pela regulação das hipófises via ação do LH e FSH sobre a fisiologia reprodutiva (Pelletier e Ortavant 1975). Estudos conduzidos em locais sob influência do fotoperíodo têm mostrado que a testosterona e melatonina sofrem variação sazonal, incrementando suas concentrações nos meses próximos ao acasalamento na estação reprodutiva (Casao et al. 2010) e que a melatonina incrementa o volume testicular dos carneiros (Cevik et al. 2017). Os carneiros utilizados no estudo foram criados e mantidos em região próxima à linha Equatorial, caracterizada por uma insignificante diferença na quantidade de horas de luz diária entre os meses ou estações, desta forma, não se espera que o fotoperíodo seja um fator que possa influenciar significativamente a fisiologia reprodutiva dos animais neste trabalho (Da Silva et al. 2018).

A cinética dos espermatozoides variou fortemente ao longo do ano, com a concentração dos valores médios mais baixos no Q1 quando comparado ao Q2 e Q3. No Q1 houve uma redução significativa da qualidade do sêmen com a diminuição dos parâmetros cinéticos importantes como MT, VCL, VSL e VAP na ordem de 13,9; 19,14; 19,66 e 20,56% em relação àquela registrada no Q2, e de 16,27; 19,15; 24,12 e 21,81% em relação ao Q3, para os parâmetros citados, respectivamente. Adicionalmente, a MP apresentou uma redução significativa de 32,67% no Q1 quando comparado ao Q3.

À exceção da MT todos os parâmetros cinéticos anteriormente citados apresentaram correlações negativas médias significativas com todos os índices no P45. Em adição, observou-se que as classificações de emergência térmica e desconforto pelo ITGU e ICT no Q1 relacionaram-se de uma maneira mais coerente à diminuição dos parâmetros cinéticos quando comparadas com as classificações de ausência de estresse e normal pelo ITU e ITE.

Na comparação entre quadrimestres pôde-se observar que a motilidade total foi maior no Q2 (época chuvosa) e Q3 (época de transição chuva/seca), o que foi compatível com o ambiente de ausência de estresse (ITU, ICT), normal (ITE) e confortável (ITGU) caracterizado no P45, sendo que a maioria desses índices (ITU, ITGU e ICT) apresentou correlação negativa média com este parâmetro. Este resultado se assemelha com aqueles encontrados por Ibrahim (1997) que relatou que no outono (época chuvosa) foram obtidos os maiores valores da motilidade espermática total no sêmen de ovinos da raça Chio quando comparados aos de outras estações.

O fato do Q2 e Q3 do ano terem apresentado dias com valores máximos de ITU, ITE, ITGU e ICT que classificaram o ambiente como estressor moderado, precaução à extrema precaução, emergência e crítico, com a possibilidade de alteração da homeotermia nos animais, não prejudicou a cinética espermática possivelmente pela baixa frequência em que estes valores máximos foram atingidos nestes quadrimestres em comparação ao Q1.

Mesmo com algum tipo de estresse, é possível que o organismo faça compensações como a liberação de maiores quantidades de diversas enzimas antioxidantes e proteínas de choque térmico (HSPs) presentes no plasma seminal, a fim de manter a qualidade espermática (Graham 1994). Além disso, os animais apresentam mecanismos para compensar os efeitos do calor sobre o testículo com o controle do seu posicionamento em relação ao abdome e da área de superfície escrotal, e o incremento da sudorese e frequência respiratória para resfriar o cordão espermático, artérias e vênulas do plexo pampiniforme (Cottle 2010), estratégias que podem ajudar a amenizar o estresse sofrido em curtos períodos do tempo.

A melhor qualidade da cinética espermática observada no sêmen coletado no Q2 e Q3 em ambientes de bem-estar animal caracterizados pelos valores mais baixos dos índices bioclimáticos pode ter sido devido à maior concentração e consequentemente maior ação das enzimas antioxidantes e proteínas do plasma seminal que cumprem funções específicas ao combater as espécies reativas de oxigênio (ERO) e impedir a lipoperoxidação excessiva nos espermatozoides (Tremellen 2008). Nos ovinos mostrou-se que as concentrações das enzimas antioxidantes como a glutatona redutase, superóxido dismutase e catalase presentes no plasma seminal, apresentaram diferenças sazonais, sendo maiores no Outono quando comparado com o Verão (Casao et al. 2010). Além disso, segundo Singh et al. (2017) a HSP70 se expressa de forma diferente a depender da estação do ano e, baseado nisso, é provável que esta proteína tenha sido expressa em maior nível no Q2 e Q3 nos carneiros da raça Santa Inês de maneira a proteger melhor os espermatozoides do estresse térmico nestes quadrimestres em comparação ao Q1.

Adicionalmente, a proteína HSP70 se expressa de forma diferente de acordo com a raça: a expressão é maior nas raças mais adaptadas (Singh et al. 2017), e assim, recomenda-se fazer estudos da quantidade de proteína HSP70 nos quadrimestres do ano. A Santa Inês utilizada neste trabalho é uma raça autóctona de ovinos deslanados que surgiu na região Nordeste do Brasil com alto grau de adaptabilidade às condições tropicais e que tem elevada capacidade fisiológica para manter sua homeotermia em ambiente quente (Santos et al. 2006).

De uma maneira geral, a maioria dos parâmetros de cinética espermática, incluindo as percentagens dos espermatozoides com velocidade rápida e lenta diminuíram, e dos estáticos aumentou no Q1. Os valores médios de ITU, ITE, ITGU e ICT que foram registrados no P45 do Q1 caracterizaram o ambiente com ausência de estresse, normal, de emergência e de desconforto, respectivamente, enquanto aqueles registrados no P15 classificaram o ambiente, respectivamente, com ausência de estresse, de precaução, perigoso e desconforto.

O efeito das variáveis independentes, representadas pelos índices bioclimáticos, sobre as variáveis dependentes, representadas pela cinética espermática, ficou evidente diante do comportamento antagônico obtido pela análise de regressão linear e das correlações negativas médias significativas entre estas variáveis. Apesar da relação antagônica suportada pela regressão linear significativa de alguns parâmetros cinéticos com o ITU (MP, VCL, VSL, VAP, HYP e LEN) e ITE (MP, HYP e LEN), em alguns períodos avaliados, foram observados que os valores médios destes índices no Q1 classificaram o ambiente como sem estresse ou normal, subestimando os efeitos do ambiente sobre a qualidade do sêmen se comparados ao ITGU e ICT que, por sua vez, caracterizaram o ambiente como de estresse intenso e de desconforto, respectivamente.

Segundo Berman et al. (2016) o ITU pode apresentar valores similares a outros índices bioclimáticos modificados que também são baseados em umidade e temperatura, mas ressaltam que a maior sensibilidade deste índice na classificação do estresse ambiental é obtida em condições de alta umidade e temperatura. Hahn et al. (2009) ainda ponderaram que o ITE pode fornecer resultados representativos para desafios de calor de curto prazo, mas que seu valor médio, mesurado em períodos longos como foi o caso do P45 de nosso trabalho, não consegue refletir bem o estado de estresse ambiental nos quais os animais foram submetidos.

Possivelmente a piora nos parâmetros cinéticos espermáticos ocorrida no Q1 foi devido à influência das variáveis ambientais sobre a fisiologia reprodutiva no P45, que compreendeu as fases de proliferação, crescimento, maturação e espermiogênese (Cardoso e Queiroz 1988) e no P15 que representou a fase do trânsito epididimário dos espermatozoides nos carneiros (Amir et al. 1968). Esta hipótese é suportada pelos índices bioclimáticos em especial o ITGU e ICT que mostraram ter efeito antagônico suportado pela regressão linear significativa com importantes parâmetros cinéticos, como: VCL, VSL, VAP e LEN nos dois períodos avaliados (P45 e P15).

Apesar das células espermáticas serem mais suscetíveis a sofrer danos durante seu estágio da espermatogênese, que correspondeu ao P45 (Petrovic et al. 2017), prejuízos à fisiologia provocados pelo estresse térmico também podem ter ocorrido no P15, período no qual os espermatozoides adquirem a motilidade no epidídimo. As unidades proteicas da bainha mitocondrial e os ácidos graxos insaturados da membrana plasmática que garantem a estabilidade e oferecem energia necessária para a motilidade espermática, respectivamente (Suleiman et al. 1996; Nissen e Kreysel 2009), sofrem alterações quando são oxidadas pelas espécies reativas de oxigênio (EROs).

O estresse por incremento térmico ocasiona a liberação das EROs e uns dos primeiros radicais livres que incrementam sua produção é o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que, em grandes quantidades, pode prejudicar a estrutura e funcionalidade da mitocôndria provocando sua degeneração e apoptose das células germinativas e espermáticas (Gille e Sigler 1995; Barreiros et al. 2006; Kanter et al. 2013; Aitken et al. 2014). Além disso, espermatozoides afetados pelo estresse térmico, quando submetidos ao processo de criopreservação, apresentam maior suscetibilidade às mudanças físicas e bioquímicas, que posteriormente provocam maior mortalidade embrionária quando utilizados na reprodução (Braden e Mattner 1970; Arman et al. 2006).

Os percentuais de espermatozoides com alterações morfológicas não variaram ao longo do experimento e mantiveram-se muito baixos (4,17%), segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal que recomenda usar amostras de sêmen com no máximo de 20% de células com defeitos totais. Teodoro et al. (2013) também não observaram nenhuma variação na morfologia espermática em carneiros Santa Inês submetidos a temperaturas ambientais elevadas quando comparados com outros que foram criados em ambientes confortáveis. A proporção de espermatozoides com defeitos morfológicos não diferiu entre os quadrimestres possivelmente pela boa adaptabilidade ao ambiente tropical que possui a raça Santa Inês (Quesada et al. 2001; McManus et al. 2009, 2020). Mesmo os valores máximos dos índices bioclimáticos que classificaram o ambiente de estresse térmico intenso no Q1 não foram

suficientemente estressores para incrementar os defeitos morfológicos nos espermatozoides que poderiam inviabilizar seu uso na reprodução. Alterações na morfologia dos espermatozoides de ovinos são evidentes em condições extremas de estresse térmico como na insulação escrotal (Dada et al. 2001; Moreira et al. 2001).

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, e a despeito de não ter sido feito teste de fertilidade, recomenda-se evitar a realização de acasalamentos, colheita, refrigeração e congelamentos de sêmen de carneiros Santa Inês criados na sub-região Agreste do Nordeste brasileiro no primeiro quadrimestre do ano ou em períodos com as mesmas características ambientais, já que neste período há uma diminuição da qualidade espermática e consequentemente seminal. Deve-se considerar que estes efeitos podem não ser perceptíveis em condições de manejo e que eles devem ser amenizados ou mesmo anulados pela implementação de práticas de manejo e instalações mais adequadas para minimizar o estresse térmico dos carneiros e que promovam seu bem-estar.

4.5. Conclusões

Os Índices de Temperatura e Umidade (ITU), de Temperatura Equivalente (ITE), Temperatura de Globo e Umidade (ITGU) e de Conforto Térmico (ICT) calculados considerando o período prévio referente ao ciclo de produção espermática têm relações com características andrológicas de carneiros da raça Santa Inês.

As classificações dos ambientes obtidas pelo cálculo do ITU e ITE durante o período prévio de produção espermática não guardaram relação com a redução da qualidade do sêmen quanto à cinética espermática, apesar destes índices apresentarem relação antagônica com o comportamento da maioria dos seus parâmetros.

O ITGU e ICT mensurados durante o período prévio de produção espermática por outro lado, além de guardarem relação antagônica, classificam o ambiente de uma maneira mais coerente com o comportamento dos parâmetros cinéticos dos espermatozoides no sêmen e, neste sentido, estes índices são mais eficazes para monitorar as consequências do estresse térmico bioclimático sobre a capacidade reprodutiva de carneiros da raça Santa Inês.

A cinética dos espermatozoides de carneiros é afetada negativamente quando os valores médios do ITGU e ICT mensurados no período de produção espermática estão acima de 83 e 41, respectivamente, que são níveis considerados perigosos e de desconforto térmicos em ovinos.

As características andrológicas de carneiros Santa Inês criados em regime semi-intensivo no Agreste do Nordeste brasileiro variam ao longo do ano. A cinética espermática e consequentemente a qualidade do sêmen de carneiros Santa Inês é prejudicada no primeiro e é melhor nos dois últimos quadrimestres do ano nesta região.

Estudos futuros devem ser feitos para determinar se a diminuição da cinética espermática no primeiro quadrimestre pode afetar negativamente a fertilidade *in vivo* em relação ao segundo e terceiro quadrimestre do ano. Adicionalmente o uso de instalações e práticas de manejo podem ser estratégias para mitigar os efeitos ambientais negativos do estresse térmico bioclimático sobre as características andrológicas a fim de manter a boa qualidade do sêmen e a capacidade reprodutiva de carneiros da raça Santa Inês no primeiro quadrimestre do ano na região Agreste do Nordeste brasileiro.

4.6. Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq), da Fundação de Apoio à Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (Fapitec/SE) – Brasil e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – Brasil (CAPES – Código 001).

4.7. Referências

- Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Iuliis GN (2014) Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl* 16:31. <https://doi.org/doi:10.4103/1008-682X.122203>
- Al-Dawood A (2017) Towards heat stress management in small ruminants – A Review. *Ann Anim Sci* 17:59–88. <https://doi.org/10.1515/aoas-2016-0068>
- Al-kawmani AA (2019) Testicular parameters and scrotal measurements in relation to age and body weight in growing Naemi-Rams. *J Applied Sci* 19:605–611. <https://doi.org/10.3923/jas.2019.605.611>
- Amir D, Ortavant R, Bure A (1968) Influence de la fréquence des collectes sur la durée du transit des spermatozoïdes dans le canal épидидymaire du bélier. *Ann Biol anim Bioch Biophys* 8:195–207. <https://doi.org/10.1051/rnd:19680202>
- Andrade IS, De Souza BB, Filho JMP (2007) Parâmetros fisiológicos e desempenho de ovinos santa inês submetidos a diferentes tipos de sombreamento e a suplementação em pastejo. *Ciênc Agrotec Lavras* 31:540–547. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542007000200039>
- Arias R, Mader T, Escobar P (2008) Factores climáticos que afectan el desempeño productivo del ganado bovino de carne y leche. *Arch Med Vet* 40. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2008000100002>
- Arman C, Quintana Casares PI, Sanchez-Partida LG, Setchell BP (2006) Ram sperm motility after intermittent scrotal insulation evaluated by manual and computer-assisted methods. *Asian Journal of Andrology* 8:411–418. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2006.00145.x>
- Avdi M, Banos G, Stefos K, Chemineau P (2004) Seasonal variation in testicular volume and sexual behavior of Chios and Serres rams. *Theriogenology* 62:275–282. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.10.004>
- Baêta FC, Sousa CF (2010) *Ambiência em Edificações Rurais. Conforto Animal*, 2nd edn. UFV, Viçosa
- Baêta FC, Meador, N.F. B FC, Shanklin, M.D. B FC, Johnson, H.D. B FC (1987) Equivalent temperature index at temperatures above the thermoneutral for lactating dairy cows. In: *Summer Meeting of American Society of Agricultural Engineers*. Michigan, pp 87–4015
- Bailey TL, Hudson RS, Powe TA, Riddell MG, Wolfe DF, Carson RL (1998) Caliper and ultrasonographic measurements of bovine testicles and a mathematical formula for determining testicular volume and weight in vivo. *Theriogenology* 49:581–594. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00009-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00009-0)
- Bandeira AMP, Matos JE, Maria AN, Carneiro PC, Purdy PH, Azevedo HC (2017) The effects of gelatin supplementation prior to cooling on ram semen quality and fertility. *Anim Reprod* 15:23–28. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2017-0021>
- Barbosa O, Silva R. (1994). Índice de conforto térmico para ovinos. *B Indústr Anim* 52:29-35. Recuperado de <http://www.iz.sp.gov.br/bia/index.php/bia/article/view/799>

- Barreiros ALBS, David JM, David JP (2006) Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím Nova* 29:113–123. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021>
- Barth AD, Oko RJ (1989) Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University Press, USA
- Bedford JM (1991) Effects of Elevated Temperature on the Epididymis and Testis: Experimental Studies. In: Zorngiotti AW (ed) Temperature and Environmental Effects on the Testis. Springer US, Boston, MA, pp 19–32. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5913-5_3
- Berman A, Horovitz T, Kaim M, Gacitua H (2016) A comparison of THI indices leads to a sensible heat-based heat stress index for shaded cattle that aligns temperature and humidity stress. *Int J Biometeorol* 60:1453–1462. <https://doi.org/10.1007/s00484-016-1136-9>
- Bianca W (1962) Relative importance of dry- and wet-bulb temperatures in causing heat stress in cattle. *Nature* 195:251–252. <https://doi.org/10.1038/195251a0>
- Brackett B BG (2004) Male reproduction in mammals. In: Dukes' Physiology of Domestic Animals, 12th edn. Wiley, New York, pp 688–670
- Braden AWH, Mattner PE (1970) The effects of scrotal heating in the ram on semen characteristics, fecundity, and embryonic mortality. *Crop and Pasture Science* 21:509–518. <https://doi.org/10.1071/ar9700509>
- Buffington DE, Canton GH, Pitt D, Thatcher WW, Collier RJ (1981) Black Globe-Humidity Index (BGHI) as comfort equation for dairy cows. *Transactions of the ASAE* 24:0711–0714. <https://doi.org/10.13031/2013.34325>
- Cardoso FM, Queiroz GF (1988) Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and daily sperm production of Brazilian hairy rams. *Anim Reprod Sci* 17:77–84. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(88\)90047-4](https://doi.org/10.1016/0378-4320(88)90047-4)
- Casao A, Cebrián I, Asumpção ME, Pérez-Pé R, Abecia JA (2010) Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reprod Biol Endocrinol* 8:59. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-59>
- Castro MSM, Vasconcelos AM de, Santos VO, Lopes AK, Farias MR, Lima FR, Rogério MC, Ferreira J, Silveira RM (2020) Thermoregulatory capacity of *Santa Inês* hair ewes of different genotypes associated with coat colors raised in a hot environment. *J Appl Anim Welf Sci* 1–11. <https://doi.org/10.1080/10888705.2020.1819808>
- CBRA (2013) Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 3rd edn. Belo Horizonte, MG
- Cena K, Monteith L (1975) Transfer processes in animal coats. II. Conduction and convection. *Proc R Soc Lond B* 188:395–411. <https://doi.org/10.1098/rspb.1975.0027>
- Cevik M, Yilmazer C, Kocyigit A (2017) Comparison of sexual performance and testicular characteristics of melatonin treated Kivircik and Charollais rams during the non-breeding season. *Arq Bras Med Vet Zootec* 69:278–284. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8937>

Collier RJ, Beede DK, Thatcher WW, Israel LA, Wilcox CJ (1982) Influences of environment and Its modification on dairy animal health and production. *Int J Dairy Sci* 65:2213-2227. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82484-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82484-3)

Collier RJ, Stiening CM, Pollard BC, VanBaale MJ, Gentry PC, Coussens PM (2006) Use of gene expression microarrays for evaluating environmental stress tolerance at the cellular level in cattle1. *J Anim Sci* 84:E1–E13. https://doi.org/10.2527/2006.8413_supplE1x

Cordão MA (2010) Respostas fisiológicas de cordeiros Santa Inês em confinamento à dieta e ao ambiente físico no trópico semiárido. *ACSA* 6:47-51. DOI: <http://dx.doi.org/10.30969/acsa.v6i1.71>

Cottle D J (2010) International sheep and wool handbook. In: SP de Graaf (2 ed) *Reproduction*. University Press, Nottingham, p 189-231

Da Silva AAF, Gois GC, Pessoa RM dos S, Campos FS, De Lima CA, (2018) Efeito do fotoperíodo sobre ruminantes. *Nutri -Time* 15: p.8164-8171. IOP Publishing Physics Web <https://www.nutritime.com.br/site/artigo-467>

Da Silva TGF, Santos GCL, Duarte AMC, Turco SHN, Cruz Neto JF, Jardim AMR, Do Santos TS (2019) Black globe temperature from meteorological data and a bioclimatic analysis of the Brazilian Northeast for Saanen goats. *J Therm Biol* 85:102408. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.102408>

Dada R, Gupta NP, Kucheria K (2001) Deterioration of sperm morphology in men exposed to high temperature. *J Anat Soc India* 50:107–111

Delcroix I, Mauget R, Signoret JP (1990) Existence of synchronization of reproduction at the level of the social group of the European wild boar (*Sus scrofa*). *J Reprod Fertil* 89:613–617 DOI: <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0890613>

Dikmen S, Hansen PJ (2009) Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment. *J Dairy Sci* 92:109–116. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1370>

Ebi KL, Burton I, McGregor GR (2009) *Biometeorology for adaptation to climate variability and change*. Springer, London

El-Darawany AA (1999) Improving semen quality of heat stressed rams in Egypt. *Ind J Anim Sci* 69:1020–1023

Fisher A, Stewart M, Duganzich D, Tacon J, Matthews L (2005) The effects of stationary periods and external temperature and humidity on thermal stress conditions within sheep transport vehicles. *NZVJ* 53:6–9. <https://doi.org/10.1080/00480169.2005.36461>

Frazão Sobrinho JM, Branco MA, Júnior A, Nascimento IMR, Mota LHCM, Carvalho YNT, Ferreira SB, Costa DNM, Júnior FJ, Souza A (2014) Characteristics of the semen of Dorper, Santa Ines and undefined breed sheep, pre-and post-freezing, in the rainy and dry period. *Arq Bras Med Vet Zootec* 66:969–976. <https://doi.org/10.1590/1678-6465>

Freitas A de P, dos Santos GFF, Fernandes AR, Mendon GG, de Paz CCP, Vercesi AG, El-Faro L (2020) Effect of thermal stress on basic seminal characteristics of Gyr bulls. *Int J Biometeorol* 64:1649–1656. <https://doi.org/10.1007/s00484-020-01945-6>

- Gesualdi Júnior A, Sales ÉSV, Freitas RS, Henry FC, Oliveira VP, Gesualdi AC (2014) Effects of heat stress on the physiological parameters and productivity of hair sheep in tropical and coastal environments. *R Bras Zootec* 43:556–560. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982014001000008>
- Gille G, Sigler K (1995) Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiol* 40:131–152. <https://doi.org/10.1007/BF02815413>
- Graham JK (1994) Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology* 41:1151–1162. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(05\)80037-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(05)80037-8)
- Gündoğan M, Baki D, Yeni D (2003) Reproductive seasonality in sheep. *Acta Agric Scand A Anim Sci* 53:175–179. <https://doi.org/10.1080/09064700310014960>
- Hahn GL, Gaughan JB, Mader TL, Eigenberg RA (2009) Thermal indices and their applications for livestock environments. In: *Livestock Energetics and Thermal Environment Management*, 1st edn. American Society of Agricultural and Biological Engineers, Michigan, pp 113–130
- Howarth B (1969) Fertility in the ram following exposure to elevated ambient temperature and humidity. *J Reprod Fertil* 19:179–183. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0190179>
- Ibrahim SA (1997) Seasonal variations in semen quality of local and crossbred rams raised in the United Arab Emirates. *Anim Reprod Sci* 49:161–167. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(97\)00063-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(97)00063-8)
- Kanter M, Aktas C, Erboğa M (2013) Heat stress decreases testicular germ cell proliferation and increases apoptosis in short term: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Toxicol Ind Health* 29:99–113. <https://doi.org/10.1177/0748233711425082>
- Karaca AG, Parker HM, Yeatman JB, McDaniel CD (2002) The effects of heat stress and sperm quality classification on broiler breeder male fertility and semen ion concentrations. *Br Poult Sci* 43:621–628. <https://doi.org/10.1080/0007166022000004552>
- Karagiannidis A, Varsakeli S, Alexopoulos C, Amarantidis I (2000) Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. *Small Rumin Res* 37:125–130. DOI: 10.1016/S0921-4488(99)00143-1
- Lincoln GA, Davidson W (1977) The relationship between sexual and aggressive behaviour, and pituitary and testicular activity during the seasonal sexual cycle of rams, and the influence of photoperiod. *J Reprod Fert* 49:267–276. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0490267>
- LPHSI (1990) *Livestock and Poultry Heat Stress Indices Agriculture Engineering Technology Guide*. Clemson, USA
- Ludovico A, Maion VB, Bronkhorst DE, Grecco FA, Cunha LF, Mizubuti IY, Almeida KM, Ludovico MS, Santana EH (2015) Losses in milk production and quality due to milk somatic cell count and heat stress of Holsteins cows in temperate climate. *Sem Ci Agr* 36:3455. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n5p3455>
- MacManus C, Miranda RM (1997) Comparação das raças Santa Inês e Bergamácia no Distrito Federal. *R Bras Zootec* 26:1055–1059

- Malama E, Bollwein H, Taitzoglou IA, Theodos T, Boscós CM, Kiossis E (2013) Chromatin integrity of ram spermatozoa. Relationships to annual fluctuations of scrotal surface temperature and temperature-humidity index. *Theriogenology* 80:533–541. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.05.019>
- Marai IFM, El-Darawany AA, Fadiel A, Abdel-Hafez MAM (2007) Physiological traits as affected by heat stress in sheep—A review. *Small Rumin Res* 71:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.10.003>
- Martins RD, McManus C, Carvalhêdo AS, Borges HV, Silva AE, Santos NR (2003) Avaliação da sazonalidade reprodutiva de carneiros Santa Inês criados no Distrito Federal. *R Bras Zootec* 32:1594–1603. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982003000700008>
- McManus C, Louvandini H, Carneiro HC, Lima PR, Neto JB (2011) Production indices for dual purpose cattle in central Brazil. *R Bras Zootec* 40:1576–1586. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000700025>
- McManus CM, Paludo GR, Louvandini H, Gugel R, Sasaki LC, Paiva SR (2009) Heat tolerance in Brazilian sheep: Physiological and blood parameters. *Trop Anim Health Prod* 41:95–101. <https://doi.org/10.1007/s11250-008-9162-1>
- McManus CM, Faria DA, Lucci CM, Louvandini H, Pereira SA, Paiva SR (2020) Heat stress effects on sheep: Are hair sheep more heat resistant? *Theriogenology* 155:157–167. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.047>
- Menegassi SRO, Pereira GR, Bremm C, Koetz C, Lopes FG, Fiorentini EC, McManus C, Dias EA, Da Rocha MK, Lopes RB, Barcellos JO (2016) Effects of ambient air temperature, humidity, and wind speed on seminal traits in Braford and Nellore bulls at the Brazilian Pantanal. *Int J Biometeorol* 60:1787–1794. <https://doi.org/10.1007/s00484-016-1167-2>
- Milczewski V, Chahad-Ehlers S, Spercoski KM, Moraes RN, Thomaz V (2015) Quantifying the effect of seasonality on testicular function of Suffolk ram in lower latitude. *Small Rumin Res* 124:68–75. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.12.012>
- Moreira EP, Moura A de AA, Araújo AA de (2001) Efeitos da insulação escrotal sobre a biometria testicular e parâmetros seminais em carneiros da raça Santa Inês criados no estado do Ceará. *R Bras Zootec* 30:1704–1711. DOI: 10.1590/S1516-35982001000700007
- Moule GR, Waites GMH (1963) Seminal degeneration in the ram and its relation to the temperature of the scrotum. *J Reprod Fertil* 5:433–446. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0050433>
- Nascimento FG de O, Aguiar HCP, Rodrigues GM, Guimarães EC, Nascimento MRB (2019) What is the best temperature-humidity index equation to indicate heat stress in crossbred dairy calves in a tropical environment? *C R* 49: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180132>
- Neves MLMW, Azevedo MD, Costa LAB Da, Guim A, Leite AM, Chagas JC (2009) Níveis críticos do índice de conforto térmico para ovinos da raça Santa Inês criados a pasto no agreste do Estado de Pernambuco. *Acta Sci Anim Sci* 31:169–175. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v31i2.3766>
- Nissen HP, Kreysel HW (2009) Polyunsaturated fatty acids in relation to sperm motility. *Andrologia* 15:264–269. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1983.tb00374.x>

- NWS -National Weather Service (1976) Livestock Hot Weather Stress. Regional Operations Manual Letter C:31–76
- Paim TP, Borges BO, Lima PMT, Dallago BSL, Louvand H, McManus C (2012) Relation between thermographic temperatures of lambs and thermal comfort indices. *Int J Appl Anim* 4:108-115. <https://publons.com/publon/14876883/>
- Pelletier J, Ortavant R (1975) Photoperiodic control of LH release in the ram I. Influence of increasing and decreasing light photoperiods. *Theriogenology* 4:94. <https://doi.org/DOI:10.1530/acta.0.0780442>
- Peters SO, Shoyebo OD, Ilori BM, Ozoje MO, Ikeobi CON, Adebam OA (2008) Semen quality traits of seven strains of chickens raised in the humid tropics. *Int J Poult Sci* 7:949–953. <https://doi.org/10.3923/ijps.2008.949.953>
- Petrovic MP, Stanojkovic A, Petrovic VC, Ilic ZZ, Petrovic MM, Ru D, Maksim N (2017) Relevant factors affecting the fertility of rams. *J Mt Agric Balk* 20:77–91
- Quesada M, McManus C, Couto FAD (2001) Tolerância ao calor de duas raças de ovinos deslanados no Distrito Federal. *R Bras Zootec* 30:1021–1026. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982001000400016>
- Ramón M, Salces-Ortiz J, González C, Péres MD, Garde JJ, García AO, Maroto MA, Calvo JH, Serrano MM (2014) Influence of the temperature and the genotype of the HSP90AA1 gene over sperm chromatin stability in Manchega rams. *PLoS ONE* 9:e86107. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086107>
- Reece WO (2015) *Dukes' Physiology of Domestic Animals*. Blackwell, Iowa
- Rosa HJD, Bryant MJ (2003) Seasonality of reproduction in sheep. *Small Rumin Res* 48:155–171. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(03\)00038-5](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(03)00038-5)
- Santos JRS dos, Souza BB de, Souza WH, Cesar MF, Tavares GP (2006) Respostas fisiológicas e gradientes térmicos de ovinos das raças Santa Inês, Morada Nova e de seus cruzamentos com a raça Dorper às condições do semi-arido nordestino. *Ciênc agrotec* 30:995–1001. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542006000500025>.
- Santos G de B, Sousa IF de, Brito CO, Santos VS, Barbosa RJ, Soares C (2013) Estudo bioclimático das regiões litorânea, agreste e semiárida do estado de Sergipe para a avicultura de corte e postura. *Cienc Rural* 44:123–128. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782013005000148>
- Sarlós P, Egerszegi I, Balogh O, Molnár A, Cseh S, Rátky J (2013) Seasonal changes of scrotal circumference, blood plasma testosterone concentration and semen characteristics in Racka rams. *Small Rumin Res* 111:90–95. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.11.036>
- Schlatt S, Ehmcke J (2014) Regulation of spermatogenesis: An evolutionary biologist's perspective. *Semin Cell Dev Biol* 29:2–16. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2014.03.007>
- Sevi A, Annicchiarico G, Albenzio M, Taibi L, Muscio A, Dell'Aquila S (2001) Effects of Solar Radiation and Feeding Time on Behavior, Immune Response and Production of Lactating Ewes Under High Ambient Temperature. *J Dairy Sci* 84:629–640. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74518-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74518-3)

- Silanikove N (2000) Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. *Livest Prod Sci* 67:1–18. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(00\)00162-7](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(00)00162-7)
- Silva RG da, Morais DAEF, Guilhermino MM (2007) Evaluation of thermal stress indexes for dairy cows in tropical regions. *R Bra Zootec* 36:1192–1198. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982007000500028>
- Silva R, Maia AS (2013) *Principles of Animal Biometeorology*. Springer Netherlands, Dordrecht
- Singh KM, Singh S, Ganguly I, Nachiap RK, Ganguly A, Venkatar R, Chopra A, Narula HK (2017) Association of heat stress protein 90 and 70 gene polymorphism with adaptability traits in Indian sheep (*Ovis aries*). *Cell Stress Chaperones* 22:675–684. <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0770-4>
- Soares FN, Oliveira MEF, Padilha-Nakaghi LC, De Oliveira FB, Teixeira PP, Vicente WR, Faturi C, Rodrigues LF (2015) Reproductive and productive performances of Santa Inês ewes submitted to breeding in different periods of the Amazonian humid tropical climate. *Trop Anim Health Prod* 47:1465–1471. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0886-4>
- Sousa WH, Lôbo RNB, Morais O R (2003) Ovinos Santa Inês: Estado de arte e perspectivas. 23:501-522
- Suleiman SA, Elamin AM, Zaki ZMS, Malik EMA, Nasr MA (1996) Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J Androl* 17:530–537. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1996.tb01830.x>
- Suriyasomboon A, Lundeheim N, Kunavongkrit A, Einarsson S (2005) Effect of temperature and humidity on sperm morphology in Duroc boars under different housing systems in thailand. *J Vet Med Sci* 67:777–785. <https://doi.org/10.1292/jvms.67.777>
- Teodoro SM, Pereira AMF, Filho JDG (2013) Influence of availability of shade on testicular characteristics of Santa Inês rams. *Acta Sci Anim Sci* 35:441-446. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v35i.18479>
- Tetens (1930) Uber einige meteorologische. Begriffe, *Zeitschrift fur Geophysik* 6:257–309
- Thom EC (1959) The Discomfort Index. *Weatherwise* 12:57–61. <https://doi.org/10.1080/00431672.1959.9926960>
- Titto CG, Veríssimo CJ, Pereira AMF, Geraldo AM, Katiki LM, Titto EA (2016) Thermoregulatory response in hair sheep and shorn wool sheep. *Small Rumin Res* 144:341–345. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.10.015>
- Tremellen K (2008) Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 14:243–258. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn004>
- Van Wettere WHEJ, Kind KL, Gatford KL, Swinbourne AM, Leu ST, Hayman PT, Kelly JM, Weaver AC, Kleemann DO, Walker SK (2021) Review of the impact of heat stress on reproductive performance of sheep. *J Animal Sci Biotechnol* 12:26. <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00537-z>

Verón GL, Tissera AD, Bello R, Estofan GM, Hernández M, Beltram F, Molina RI, Vasquez MB (2021) Association between meteorological variables and semen quality: a retrospective study. *Int J Biometeorol*. <https://doi.org/10.1007/s00484-021-02112-1>

West JW (2003) Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *J. Dairy Sci* 86:2131–2144. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73803-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73803-X)

5. ARTIGO 2

INTERAÇÕES ENTRE DIFERENTES EXTENSORES À BASE DE LECITINA DE SOJA E TAXAS DE CONGELAÇÃO NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CARNEIRO

Periódico a ser submetido: Cryobiology (ISSN: 0011-2240)

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da interação entre extensores à base de lecitina de soja (LS) e taxas de congelação (TC) sobre a qualidade do sêmen de carneiros submetido à congelação. Foram utilizados pools de sêmen de carneiros (n=12) diluídos em extensores (fator 1) com gema de ovo a 20% (GO-20%), ou diferentes concentrações de LS: 0,5 (LS-0,5), 1,0 (LS-1,0) e 2,0% (LS-2,0%). O sêmen diluído (150×10^6 espermatozoides/0,25 mL) foi refrigerado até 5 °C a 0,30 °C/min, e submetido a três TC (fator 2) de 10, 20 e 60 °C/min. O sêmen foi descongelado (40°C/20') e avaliado, e os dados dos parâmetros espermáticos foram analisados pela ANOVA (fatorial 4x3) e Tukey, considerando-se o efeito dos fatores isoladamente e da interação entre eles ($P < 0,05$). O GO-20% e LS-2,0% apresentaram melhores parâmetros cinéticos, maiores percentagens de espermatozoides viáveis, não-apoptóticos com membrana plasmática íntegra (A⁺/PI⁻) e não-capacitados (F), e menor com acrossomo reagido (AR) em relação ao LS-0,5 e LS-1,0% ($P < 0,05$). As TC de 20 e 60 °C/min mantiveram maior A⁺/PI⁻ e viáveis em relação a 10 °C/min. A interação entre GO-20% e 60 °C/min apresentou maior A⁺/PI⁻ e F em relação a todas as demais ($P < 0,05$), e menor de AR, não diferindo com as interações entre GO-20% e LS-2,0% com 20 °C/min ($P > 0,05$). O extensor LS-2,0% pode ser uma alternativa a ser usada independente da TC, mas a interação entre o extensor GO-20% e a TC de 60 °C/min protege melhor os espermatozoides após descongelação no sêmen de carneiros.

Palavras-chave: capacitação espermática; gema de ovo; viabilidade espermática; Santa Inês.

ABSTRACT

Title: INTERACTIONS BETWEEN DIFFERENT SOYBEAN LECITHIN - BASED EXTENDERS AND FREEZING RATES IN RAM SEMEN CRYOPRESERVATION

The aim of the study was to evaluate the effect of the interaction between soybean lecithin - based extenders (SL) and freezing rates (FR) on the quality of frozen ram semen. Ram semen pools ($n = 12$) were diluted in extenders (Factor 1) with 20% egg yolk (EY-20%) or different concentrations of SL: 0.5% (SL-0.5), 1.0% (SL-1.0), and 2.0% (SL-2.0%). The diluted semen (150×10^6 sperm/0.25 mL) was cooled to 5 °C at 0.30 °C/min, and then subjected to three FR (Factor 2) of 10, 20, and 60 °C/min. The semen was thawed (40°C/20') and evaluated, and the sperm parameter data were analyzed by ANOVA (4×3 factorial design) and the Tukey test, considering the effect of the factors alone and the interaction between them ($p < 0.05$). The EY-20% and SL-2.0% had better kinetic parameters and higher percentages of viable sperm, were non-apoptotic with intact plasma membrane (A-/PI-), were non-capacitated (F), and were smaller with acrosome reaction (AR) compared to SL-0.5 and SL-1.0% ($p < 0.05$). The FR at 20 and 60 °C/min maintained higher A-/PI- and viable sperm compared to 10 °C/min. The interaction between EY-20% and 60 °C/min showed higher A-/PI- and F compared to all others ($p < 0.05$) and lower AR, and did not differ from the interactions between EY-20% and SL-2.0% at 20 °C/min ($p > 0.05$). The LS-2.0% extender can be an alternative for use regardless of FR, but the interaction between the GO-20% extender and 60 °C/min FR better protects sperm after thawing in ram semen.

Keywords: sperm capacitation, egg yolk, sperm viability, Santa Inês

5.1. Introdução

A criopreservação do sêmen é um processo que contribui para a multiplicação e disseminação de material genético superior mediante o uso de biotecnologias, como, por exemplo, a inseminação artificial (IA) e fertilização *in vitro* [1,2]. Entretanto, espermatozoides criopreservados de carneiros apresentam baixa qualidade com danos nas estruturas do axonema, da membrana plasmática, acrossomal e mitocondrial, redução da atividade mitocondrial que consequentemente diminui a sua motilidade dificultando seu trânsito pelo trato reprodutivo da fêmea [3,4]. Estes danos impossibilitam o uso do sêmen congelado em técnicas de IA mais práticas e econômicas, como aquelas não-cirúrgicas que utilizam a via cervical ou transcervical para deposição do sêmen, já que apresentam baixa fertilidade e menor número de cordeiros nascidos por ovelha inseminada com o uso deste tipo de sêmen [5].

Assim, estratégias de melhoria da qualidade do sêmen congelado por meio de ajustes nos protocolos de criopreservação do sêmen de carneiros baseadas nas áreas da química, física e biologia têm sido aplicadas. Neste sentido, têm sido testados diferentes extensores, tipos de embalagens e protocolos, com a finalidade de obter espermatozoides de boa qualidade com capacidade fertilizante que possam garantir seu uso [6] no manejo reprodutivo e nas diferentes biotecnologias da reprodução.

A crioresistência dos espermatozoides é determinada, dentre outras características, pela capacidade da célula de manter a integridade e funcionalidade da sua membrana plasmática, permitindo um intercâmbio iônico adequado que, por sua vez, está intimamente relacionado com a proporção entre colesterol:fosfolípido e proteínas [7]. Esta proporção permite também manter a ordem estrutural da membrana plasmática e o funcionamento normal da atividade enzimática que são necessários posteriormente nos processos de capacitação [8], fertilização [9] e no desenvolvimento inicial do embrião [10]. Na criopreservação, os fosfolípidos predominantes, tais como fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina presentes na membrana plasmática sofrem alterações

estruturais e de distribuição, afetando sua composição, quantidade e simetria [11], prejudicando a atividade enzimática [12] requerida para garantir a sobrevivência e a capacidade fertilizante dos espermatozoides pós-descongelamento.

Diante dessa ação indesejada da criopreservação sobre os fosfolipídios da membrana plasmática dos espermatozoides, diferentes componentes são adicionados aos extensores de congelamento do sêmen para sua proteção e restauração, dentre os quais temos a gema de ovo (GO) que possui lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que cumprem essa função [13]. Apesar de possuir várias vantagens como sua elevada eficiência, baixo custo e facilidade de obtenção, a GO é de origem animal e pode transmitir doenças e propiciar a proliferação de bactérias prejudiciais que produzem endotoxinas [14], capazes de produzir danos na estrutura e prejudicar a função e capacidade de fertilização dos espermatozoides, afetando negativamente a sua qualidade [15].

O uso de substâncias de origem vegetal como a lecitina de soja (LS) pode ser uma alternativa para substituir a GO como fonte, proteção e restauração dos fosfolipídios dos espermatozoides [16]. A LS é composta por fosfolipídios poli-insaturados em uma grande proporção como a fosfatidilcolina, rica em ácido linoleico (ômega 6), que mostrou ser efetiva na proteção e restauração da membrana plasmática dos espermatozoides de homens [17], aves [18], cães [19], caprinos [20], bovinos [21] e ovinos [16].

A taxa de congelamento é também um dos fatores principais que determinam o êxito da criopreservação de sêmen, devendo ser suficientemente lenta para a saída de água dos espermatozoides por osmose evitando a formação de gelo intracelular e, ao mesmo tempo, suficientemente rápida para minimizar os danos às células causados pela exposição a altas concentrações de solutos [22]. Assim, a estrutura e a cinética de espermatozoides descongelados de touros, varrões, carneiros [23], ratos [24] e galos [25] são fortemente influenciados pela taxa de congelamento utilizada nos protocolos de criopreservação do sêmen.

Um protocolo efetivo e consensual de criopreservação de sêmen na espécie ovina ainda não foi totalmente padronizado, já que uma grande porção de espermatozoides ainda não sobrevive às etapas de congelamento e descongelamento, devido principalmente a diversos fatores internos inerentes à espécie, como a composição de fosfolipídios, colesterol e proteínas da membrana plasmática dos espermatozoides [7], os quais interagem de maneira diferente a fatores externos como os distintos extensores e taxas de congelamento [26].

A maioria das estratégias de melhoria da criopreservação de espermatozoides de carneiros, entretanto, têm testado isoladamente e separadamente os efeitos dos fatores a exemplo dos extensores [27,28] e taxas de congelamento [29,30]. A maior desvantagem de se testar os níveis de um único fator isoladamente, é que neste caso está se considerando que os demais fatores são constantes, podendo determinar seu comportamento apenas em um caso predeterminado e fixo, como ocorre em análises do delineamento inteiramente casualizado [31]. Compreender da melhor maneira o funcionamento de processos industriais [32], produtivos [33] e biológicos [34–36] em diferentes cenários nos leva aos estudos feitos usando esquema fatorial, considerado o desenho de maior eficiência quando comparado aos outros desenhos experimentais. O esquema fatorial permite que sejam estudados o comportamento e a interação de diferentes variáveis gerando maior e mais precisa informação do funcionamento biológico espermático, permitindo assim a otimização de um processo específico, a exemplo da criopreservação do sêmen.

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da interação entre extensores à base de lecitina e taxas de congelamento sobre os parâmetros dos espermatozoides após a descongelamento, determinando assim a melhor interação destes fatores no processo de criopreservação do sêmen de carneiros.

5.2. Material e Métodos

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da unidade da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Tabuleiros Costeiros (No: 0035/2020).

5.2.1. Preparação dos extensores

Quatro extensores para criopreservação do sêmen de carneiros foram preparados a partir de meio padrão à base de Glicina-Leite (GL) [37] com gema de ovo (GO) ou sem GO que foi substituída por diferentes concentrações de lecitina de soja (LS). Inicialmente em uma primeira etapa foram preparadas uma solução A (1,475g de glicina; 3,125g de citrato de sódio diluídos em 47,37 mL de água Mili Q) e uma solução B (3,157g de Frutose diluídos em 47,37 mL de água Mili Q), sendo adicionadas a estas soluções 5,25 mL (q.s.p) de sulfato de gentamicina (0,231g), gerando ao final uma solução mãe A+B comum a todos os extensores.

Em uma segunda etapa, 50 mL de cada extensor foram preparados separadamente a partir da combinação de 15 mL da solução A+B (30%) com 10 mL (20%) de GO (GO-20) ou com 0,5 (LS-0,5), 1,0 (LS-1,0) e 2,0 % (LS-2,0) de LS que corresponderam às quantidades de 0,27; 0,54 e 1,08 g (m/v), para corrigir a concentração de 90% da lecitina usada (Lecitina, Alfa Aesar, Índia).

Em uma terceira etapa, todos os quatro extensores receberam uma solução C composta por 0,20 mL (0,4%) de orvus es paste (OEP – v/v), 7,5 mL (15%) de leite em pó desnatado reconstituído na proporção de 11% (v/v) e pré-aquecido a 92-95°C por 10 minutos, 2,5 mL (5%) de glicerol (v/v) e água Mili Q até completar 50 mL. Para uma melhor homogeneização dos extensores durante seu processo de confecção, a cada adição de um novo componente foi usado um agitador (IKA® VORTEX Genius 3. São Paulo, Brasil) por um tempo não menor a um minuto.

Após preparo completo, os extensores foram avaliados quanto ao pH (Calibração Check™ HI 2221. São Paulo, Brasil) e à osmolaridade (VAPRO® 5520. Utah, USA), tendo sido obtidos os seguintes resultados, respectivamente: GO-20% (7,05 e 1320 mOsm/Kg), LS-0,5% (7,19 e 1034 mOsm/Kg), LS-1,0% (7,11 e 1061 mOsm/Kg) e LS-2,0% (7,05 e 1100 mOsm/Kg). Finalmente os quatro extensores foram devidamente identificados e armazenados a -20 °C até seu uso após a descongelação em banho de água a 37 °C.

5.2.2. Animais e colheita de sêmen

Foram utilizados 12 carneiros da raça Santa Inês sexualmente maduros, com média de 60 kg de peso vivo, previamente aprovados pelo exame andrológico segundo recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [38]. Os animais foram mantidos no Campo Experimental Pedro Arle (CEPA) da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado no município de Frei Paulo (Longitude: 37° 38' 30,41'' Oeste, Latitude: 10° 36' 12,63'' Sul), estado de Sergipe-Brasil, sendo manejados em regime semi-intensivo. Os animais consumiram forragem nativa e cultivada composta pelos capins-pangola (*Digitaria decumbens* L), estrela (*Cynodon nlemfuensis*), buffel (*Cenchrus ciliaries*) e Panicum maximum cultivares aruana e green-panic, e permaneciam presos no estábulo coberto para pernoitar das 16h00 até às 07h00, onde recebiam suplementação alimentar com volumoso (Vo) de silagem de milho e concentrado (C) à base de farelo de soja e farelo de milho, na proporção 50Vo:50C, com disponibilidade de sal mineral específico para ovinos e água *ad libitum*.

Foram realizadas três colheitas de sêmen de cada carneiro com auxílio de vagina artificial aquecida (45 °C) e de uma ovelha em estro natural como estímulo sexual no intervalo de 36 h entre elas. Os ejaculados foram mantidos sob aquecimento em banho de água (37 °C) até a realização das análises iniciais e processamento para congelamento.

5.2.3. Triagem, congelamento e descongelamento do sêmen

Amostras de sêmen *in natura* foram removidas dos ejaculados para serem analisadas quanto à motilidade massal, vigor e concentração dos espermatozoides usando um

microscópio com contraste de fase (Olympus Optica Co. Tokyo, Japan). Para avaliação da motilidade massal e vigor, uma alíquota de sêmen de 10 μ L, proveniente do ejaculado de cada carneiro, foi transferida e misturada com 500 μ L de solução avaliadora (X-Cell[®]) e incubada a 37 °C por 5 minutos. Seguidamente, 12 μ L da mistura foi colocada numa lâmina e coberta com lamínula aquecidas (37 °C) para avaliação. A concentração espermática por sua vez foi mesurada adicionando-se uma alíquota de sêmen *in natura* à água destilada numa diluição de 1:400, colocação desta mistura em uma câmara de Neubauer e contagem do número de espermatozoides sob microscopia óptica, em aumento de 400x. Foram aprovados para congelação aqueles ejaculados cujas amostras de sêmen apresentaram espermatozoides com motilidade massal $\geq 70\%$ e vigor ≥ 3 , e concentração espermática $\geq 4,5 \times 10^9$ espermatozoides/mL. Cada três ejaculados aprovados de três carneiros foram misturados para formar um pool de sêmen, gerando ao final quatro pools dos 12 carneiros utilizados no estudo.

Os pools de sêmen foram mantidos em banho de água a 37 °C e homogeneizados delicadamente antes da remoção de uma amostra inicial de cada contendo aproximadamente $5,0 \times 10^9$ espermatozoides. Cada uma destas amostras foi dividida em quatro alíquotas iguais para logo serem diluídas (1:6) e misturadas com seus respectivos extensores (Ex) que estavam previamente aquecidos (37°C) e que representaram os grupos experimentais (GO–20%; LS–0,5%; LS–1,0% e LS–2,0%) do primeiro fator testado (Fator 1). As amostras de sêmen diluídas em seus respectivos extensores foram transferidas para a temperatura ambiente de bancada (25 a 28 °C, aproximadamente) onde foram envasadas em palhetas francesas de 0,25 mL (600×10^6 espermatozoides/mL) previamente identificadas e posteriormente seladas com álcool polivinílico em pó. Foram envasadas 48 palhetas por pool que representou 12 palhetas de sêmen de cada um dos quatro extensores. Cada grupo de 12 palhetas por extensor foi dividido em três subgrupos de quatro palhetas cada para serem distribuídas e dispostas horizontalmente em três bandejas de aço vazadas para permitir a ação direta do frio.

As bandejas de aço contendo as palhetas de sêmen foram colocadas no refrigerador (Minitub[®] Minitube do Brasil, Porto Alegre, Brasil), previamente ajustado à temperatura de 5°C, por um período de 1h30min que compreendeu o tempo de refrigeração a uma taxa média de 0,30 °C/min e subsequente tempo de equilíbrio até a temperatura final (30 °C até 5 °C). Esta taxa foi obtida com o uso de bolsas de plástico (48 cm de comprimento x 32 cm de largura x 0,3 mm de espessura) contendo em seu interior água que foram previamente aquecidas com temperatura inicial de 30 °C, técnica adaptada que foi previamente utilizada na etapa de refrigeração da congelação do sêmen de carneiros [39].

Para o início da etapa da congelação, as três bandejas contendo as palhetas de sêmen foram retiradas simultaneamente do refrigerador e transferidas para uma cuba de aço (55 cm de comprimento x 40 cm de largura x 35 cm de altura; com uma cobertura interna de poliuretano de 3,5 cm de espessura em todos seus lados), que tinha previamente recebido 7,2 litros de N₂L. As bandejas foram dispostas na cuba de aço em três alturas diferentes, a 7,5; 4,5 e 1,5 cm acima do nível de N₂L, permanecendo sob ação do seu vapor por 11 minutos, tempo requerido para que todas as palhetas contendo sêmen atingissem uma temperatura mínima de -110 °C. Com este procedimento, foram geradas curvas com três diferentes taxas de congelação (TC) com médias aproximadas de 10, 20 e 60 °C/min (Fator 2) até atingir a temperatura de -110 °C. Estas curvas de congelação foram previamente caracterizadas (Figura 1) com uso de um termômetro digital (Dual Input Thermometer Model 710. BK precision, EUA). Logo em seguida todas as bandejas foram submergidas simultaneamente no N₂L a -196 °C e posteriormente as palhetas de sêmen foram transferidas para um botijão criogênico para serem conservadas e armazenadas em N₂L até sua descongelação para avaliação.

Após um ano de armazenamento as palhetas de sêmen foram descongeladas em água aquecida a 40 °C durante 20 segundos, enxutas e cortadas suas extremidades para transferência do seu conteúdo para microtubos mantidos a temperatura de 37 °C para avaliações dos espermatozoides.

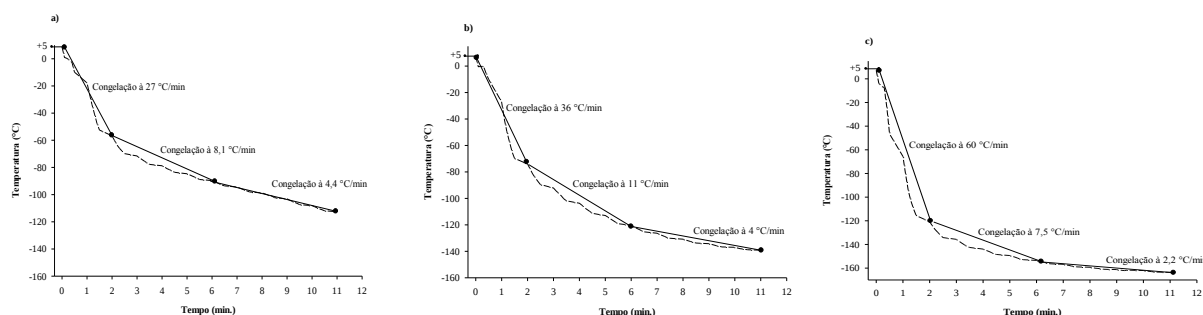


Figura 1. Características das curvas que compreenderam as taxas de congelação de 10, 20 e 60 °C/min obtidas a partir da exposição das palhetas contendo o sêmen às respectivas alturas de 7,5 (a), 4,5 (b) e 1,5 cm (c) acima do nível de nitrogênio líquido.

5.2.4. Avaliações dos espermatozoides após a descongelação

a. Motilidade massal e vigor espermáticos

Os valores da motilidade massal (Mot) que, expressa em percentagem de 0 a 100, a proporção de espermatozoides que apresentam movimento, assim como do vigor (Vig) que representa a intensidade do movimento dos espermatozoides que é classificado atribuindo-se uma nota de 0 à 5 [38], foram determinados de forma subjetiva seguindo os procedimentos descritos a seguir. Foram retirados 100 μ L do sêmen descongelado para serem misturados com 150 μ L de solução avaliadora (X-Cell[®]) em um microtubo previamente aquecido a 37° C, obtendo-se ao final uma diluição com concentração de 240×10^6 espermatozoides/mL. Uma alíquota de 10 μ L da mistura foi colocada entre lâmina e lamínula previamente aquecida (37° C) para finalmente ser avaliada no microscópio óptico de contraste de fase (Olympus Optica Co. Tokyo, Japan) sobre aumento de 400x. Tanto a motilidade massal como o vigor dos espermatozoides foram avaliados por um único técnico que foi previamente treinado antes das avaliações.

b. Cinética espermática computadorizada

Amostras de sêmen descongelado foram previamente diluídas em solução avaliadora X-Cell[®] pré-aquecida a 37 °C [40], a uma concentração de 20×10^6 espermatozoides/mL. Depois de homogeneizadas e mantidas a 37°C por 5 minutos, foram pipetadas alíquotas de 2 μ L das amostras diluídas para uma câmara de Makler[®] (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel) pré-aquecida a 37 °C, para captura e análise de imagens por meio de uma câmera de vídeo (Basler ace acA1300-200um, Ahrensburg, Alemanha) conectada a um microscópio com contraste de fase (Nikon[®] 50i, Japão), sob aumento de 100x. A captura foi feita a uma velocidade de 203 frames/segundo, com seleção manual de cinco campos equidistantes de um mesmo ponto central, capturando-se no mínimo 600 células por amostra e uma média de 120 células por campo. As imagens capturadas foram analisadas pelo Sperm Class Analyzer (SCA[®], Microptics, S.L. Versão 6.5, Barcelona, Espanha) tendo-se como padrão o setup de fábrica para a espécie ovina com ajustes de partículas com área entre 30 e 70 μ m. Foram analisados os parâmetros cinéticos motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade do percurso médio (VAP), velocidade em linha reta (VSL), linearidade (LIN), retilinearidade (STR), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) e índice de oscilação (WOB). Foram considerados como móveis apenas aqueles espermatozoides que apresentaram valores de VCL superiores a 20 μ m/segundo. Os espermatozoides foram classificados como rápidos (RAP) com $VCL \geq 200$; médios (MED) com $VCL \geq 100$ a $200 <$; lentos (LEN) com $VCL \geq 20$ a $100 <$ e estáticos (EST) quando apresentaram $VCL < 20$ μ m/segundo. Espermatozoides que apresentaram $STR > 80$ % foram considerados progressivos e com $LIN \geq 40$ % caracterizados com movimento linear.

c. *Integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides*

A integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides foi avaliada usando-se o teste HOST [41] baseado nas caudas enroladas ou inchadas dos espermatozoides depois de submetê-los a uma solução hiposmótica de 100 mOsm [9 g de frutose e 4,9 g de citrato de sódio/ litro de água Mili Q]. A técnica foi realizada ao incubar 10 μ L de sêmen com 100 μ L da solução hiposmótica a 37 °C por 60 minutos. Depois da incubação 20 μ L da mistura foi colocada sobre uma lâmina e coberta com uma lamínula para ser visualizada em microscópio com contraste de fase (Nikon 50i, Japão) sob aumento de 1000x em óleo de imersão, para contagem de 200 espermatozoides por amostra considerando-se aqueles com cauda enrolada ou inchada como possuindo membrana plasmática funcional.

d. *Viabilidade espermática*

Foi realizado o procedimento para avaliação da viabilidade espermática por citometria de fluxo relacionado à detecção da externalização da fosfatidilserina na membrana plasmática dos espermatozoides. Foram utilizados dois corantes fluorescentes Annexina-V e Iodeto de Propídio - PI (Kit–Alexa Fluor® 488 Molecular Probes/Invitrogen, Brasil) com alta afinidade à fosfatidilserina e à cadeia dupla do DNA, respectivamente. Primeiramente foram misturados 1,6 μ L de sêmen ($0,96 \times 10^6$ espermatozoides) em 98,4 μ L da solução tampão de Annexina V (1:5/Tampão de ligação de Annexina: Água deionizada). Em ambiente escuro, adicionou-se a esta mistura 5 μ L de Annexina-V (25 mM) que permaneceram sob incubação por 5 minutos, para logo serem acrescentados 2 μ L de PI (1,5 mM) que também foram incubados por mais 10 minutos. As análises das amostras foram realizadas em citômetro de fluxo (Attune NxT Acoustic Cytometer, Thermo Fisher Scientific) nos canais BL1-H e BL3-H usando filtro com comprimento de onda de excitação/emissão de 488/499 e de 535/617 nanômetros para Annexina-V e PI, respectivamente. Para cada amostra foram coletados 10.000 eventos sendo distinguidos quatro tipos de células espermáticas: i) não–apoptóticas com membrana plasmática íntegra - negativas para Annexina-V e PI (A^-/PI^-); ii) em início de apoptose - positivas para Annexina-V e negativas para PI (A^+/PI^-); iii) apoptóticas tardias - positivas para Annexina-V e PI (A^+/PI^+); e vi) necróticas - negativas para Annexina-V e positivas para PI (A^-/PI^+). O percentual de espermatozoides viáveis (Viab) foi mensurado pela somatória das proporções dos espermatozoides A^-/PI^- e A^+/PI^- [42].

e. *Capacitação e reação acrossomal espermáticas*

A capacitação e reação acrossomal foram avaliadas seguindo a técnica da clortetraciclina (CTC) conforme técnicas descritas por [43] e [40]. Uma alíquota de 11 μ L de sêmen foi adicionada a 150 mL de solução tamponada de Dulbecco (PBS) [44] obtendo-se ao final uma solução com aproximadamente 40×10^6 espermatozoides/mL. Dessa mistura foram retirados 20 μ L que foram transferidos para um microtubo ao qual adicionou-se 20 μ L de CTC (1 mM). Depois de homogeneizada, 10 μ L desta mistura foram transferidos para uma lâmina que foi coberta por uma lamínula e submetida a uma leve pressão com a finalidade de diminuir o excesso de fluído e melhorar a distribuição da amostra. A amostra foi levada à geladeira calibrada a 4° C por 10 minutos até sua avaliação pela contagem de 200 células sob imersão em óleo, com aumento de 1000x, em microscópio com iluminação epifluorescente (CARL ZEISS, AX10 Cam MRc Göttingen, Alemanha) usando o filtro com comprimento de onda de excitação de 450-490 e de emissão de 514 nanômetros. Três categorias de espermatozoides foram classificadas de acordo com a fluorescência amarela esverdeada: F – não capacitados e sem reação acrossomal = fluorescência uniforme por toda a cabeça; B – capacitados = fluorescência uniforme na porção anterior (acrossomal) da cabeça; AR – com reação acrossomal = região anterior da cabeça com pouca ou nenhuma fluorescência.

5.2.5. Delineamento experimental e análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com a ajuda do programa computacional SAS 9.1® e do software R. Inicialmente foi avaliado se os dados das variáveis dependentes representadas pelos parâmetros espermáticos cumpriam as suposições mínimas determinadas pela estatística paramétrica por meio das análises da heterogeneidade de variância e de normalidade com aplicação dos testes de Hartley ($H_c > H$) e Shapiro–Wilk ($P > 0,05$), respectivamente. Os dados dos parâmetros espermáticos que não apresentaram distribuição normal foram transformados pelo arco seno da raiz quadrada. Os dados que apresentaram distribuição normal naturalmente (VAP, LIN, LEN, EST, A⁺/PI⁻, Viab e AR) ou após a transformação (MT, VSL, WOB, MED, A⁻/PI⁻, A⁺/PI⁺, A⁻/PI⁺ e F) foram analisados mediante um desenho aleatório de blocos causalizados no esquema fatorial 4x3, considerando-se como efeitos fixos os extensores (Ex: Fator 1) e as taxas de congelção (TC: Fator 2) seguindo o modelo descrito abaixo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + (T\beta)_{ij} + \epsilon_{ij}$$

Onde: Y_{ij} é a variável dependente ou parâmetro espermático, μ é a média de todas as observações, T_i representa o efeito do extensor, β_j é o efeito da taxa de congelção, $(T\beta)_{ij}$ representa a interação entre o extensor e a taxa de congelção, e ϵ_{ij} representa o erro experimental.

Os dados dos parâmetros espermáticos que não apresentaram normalidade depois da transformação (Mot, Vig, MP, VCL, STR, BCF, ALH, RAP, HOST e B) foram analisados com estatística não paramétrica usando primeiramente a transformação de postos alinhados de cada parâmetro pelo pacote ARTool [45]. Finalmente todos os dados dos parâmetros espermáticos foram analisadas pela ANOVA para que seja verificada a influência dos fatores e sua interação pelo Teste F . As diferenças entre as médias dos grupos experimentais foram determinadas pelo teste de Tukey (HSD). Para todas as análises foi considerado nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

5.3. Resultados

a. Motilidade massal e vigor espermáticos

A motilidade massal (Mot) e o vigor dos espermatozoides (Vig) foram fortemente afetados pelos fatores extensor e taxa de congelção ($P < 0,001$) e pela interação entre eles ($P < 0,01$) (Tabela 1). Como pode ser observado na Tabela 2, as médias da Mot e Vig do GO-20% e LS-2,0% foram semelhantes entre si ($P > 0,05$) e superiores em relação ao LS-0,5% e LS-1,0% ($P < 0,05$). Já o LS-1,0% apresentou maiores médias destes parâmetros que LS-0,5% ($P < 0,05$). Ao compararem-se os efeitos das taxas de congelção sobre Mot e Vig observou-se que as maiores médias foram das amostras submetidas a 20 °C/min e 60 °C/min, não havendo diferenças significativas entre elas ($P > 0,05$), mas ambas diferiram de 10 °C/min ($P < 0,05$) para estes dois parâmetros (Tabela 3).

Os efeitos das interações entre os diferentes extensores e taxas de congelção sobre a motilidade massal (Mot) e vigor (Vig) estão expostos na Figura 2. Valores de Mot das interações entre GO-20% e 60 °C/min, e LS-2,0% e 20 e 60 °C/min foram maiores em relação àqueles das interações entre LS-0,5% e 10, 20 e 60 °C/min, e entre LS-1,0% e 10 e 60 °C/min ($P < 0,05$), mas não diferiram dos valores das interações entre GO-20% e 10 e 20 °C/min, LS-2,0% e 10 °C/min, e LS-1,0% e 20 °C/min ($P > 0,05$). O valor do Vig obtido na interação entre GO-20% e 20 °C/min foi maior em relação aos provenientes das interações entre GO-20% e 10 °C/min, LS-0,5% e 10, 20 e 60 °C/min, LS-1,0% e 10, 20 e 60 °C/min, e entre LS-2,0% e 10 °C/min ($P < 0,05$), mas não diferiu das interações GO-20% e 60 °C/min, e LS-2,0% e 20 e 60 °C/min ($P > 0,05$). Em síntese, os menores valores de Mot e Vig foram provenientes das interações entre LS-0,5% e 10, 20 e 60 °C/min e entre LS-1,0% e 10 °C/min ($P < 0,05$).

b. Cinética espermática computadorizada

O fator extensor teve efeito significativo sobre quase a totalidade dos parâmetros da cinética espermática computadorizada como pode ser visto na Tabela 1. Como exposto na Tabela 2, maiores médias de MT, MP, VAP, VSL, LIN, BCF, WOB e MED e menor média de EST ($P < 0,05$) foram encontradas no extensor GO-20% e LS-2,0% os quais não diferiram entre si ($P > 0,05$), mas foram significativamente diferentes em relação ao LS-0,5% e LS-1,0% ($P < 0,05$) que também não apresentaram diferenças entre si ($P > 0,05$), para nenhum destes parâmetros cinéticos.

Maiores médias da VCL e de RAP foram encontradas no GO-20% em relação ao LS-0,5% e LS-1,0% ($P < 0,05$) mas não diferiram daquelas observados no LS-2,0%. Já o LS-2,0% apresentou maiores médias destes parâmetros que o LS-0,5% ($P < 0,05$), não diferindo do LS-1,0% ($P > 0,05$) que se manteve numa posição intermediária.

O STR e ALH no LS-2,0% apresentaram maiores médias que no LS-1,0% e LS-0,5% ($P < 0,05$), mas não diferiram do GO-20% ($P > 0,05$). Maiores médias de LEN foram encontradas nas amostras do GO-20% e LS-2,0% em relação a LS-0,5% ($P < 0,05$), entretanto não diferindo com a média deste parâmetro observada no LS-1,0% ($P > 0,05$).

Dentre os parâmetros de cinética espermática computadorizada o fator taxa de congelamento só teve efeito ($P < 0,05$) sobre VAP e SRT (Tabela 1). Como pode ser observado na Tabela 3, a média de VAP foi maior em 10 °C/min que em 60 °C/min ($P < 0,05$), e ambas as taxas não diferiram com 20 °C/min neste parâmetro ($P > 0,05$). A maior média de STR foi encontrada na taxa de congelamento 20 °C/min que diferiu com daquelas observadas em 10 °C/min e 60 °C/min ($P < 0,05$). Em adição, a taxa de 10 °C/min apresentou maior média deste parâmetro comparada a 60 °C/min ($P < 0,05$).

A interação entre extensor e taxa de congelamento influenciou de forma significativa ($P < 0,001$ a $P < 0,05$) os parâmetros da cinética computadorizada dos espermatozoides VAP, VSL, STR e LIN (Tabela 1, Figura 3). A interação entre GO-20% e 20 °C/min apresentou maior VAP em relação às interações dos extensores LS-0,5% e LS-1,0% independente das taxas de congelamento ($P < 0,05$), mas não diferiu com as interações entre GO-20% e 10 e 60 °C/min, nem entre LS-2,0% e 10, 20 e 60 °C/min ($P > 0,05$). Ao comparar-se apenas as interações entre os extensores à base de lecitina de soja e as taxas de congelamento observou-se que o valor do VAP foi maior na interação entre LS-2,0% e 10 °C/min em relação às interações entre LS-0,5% e 20 e 60 °C/min, e LS-1,0% e 10 e 60 °C/min ($P < 0,05$), mas não diferiu da interação entre LS-2,0% e 20 e 60 °C/min, LS-0,5% e 10 °C/min, e LS-1,0% e 20 °C/min ($P > 0,05$), sendo que estas últimas interações apresentaram valores de VAP intermediários.

A interação entre GO-20% e 20 °C/min apresentou o maior valor de VSL em relação às interações entre LS-0,5% e 10, 20 e 60 °C/min, e LS-1,0% e 10 e 60 °C/min ($P < 0,05$), mas não diferiu das interações entre GO-20% e 10 e 60 °C/min, LS-2,0% e 10, 20 e 60 °C/min, e LS-1,0% e 20 °C/min ($P > 0,05$). Já ao comparar-se apenas as interações entre extensores à base de lecitina de soja e taxas de congelamento nós observamos que os valores do VSL foram maiores nas interações entre LS-2,0% e 10, 20 e 60 °C/min em relação às interações entre LS-0,5% e 20 °C/min, LS-1,0% e 10 e 60 °C/min ($P < 0,05$), mas não diferiram das interações entre LS-0,5% e 10 e 60 °C/min, e LS-1,0% e 20 °C/min ($P > 0,05$), sendo que estas últimas apresentaram valores de VSL intermediários.

Valores maiores de STR foram encontrados nas interações entre os extensores GO-20%, LS-0,5% e LS-2,0% e as taxas de 10, 20, 60 °C/min em relação à interação entre LS-1,0% e 60 °C/min ($P < 0,05$), mas não diferiram daqueles encontrados nas interações entre LS-1,0% e 10 e 20 °C/min ($P > 0,05$). Maiores valores de LIN foram encontrados nas interações entre GO-20% e 10 e 20 °C/min em relação a LS-0,5% e 10, 20 e 60 °C/min, e LS-1,0% e 10 °C/min ($P < 0,05$), mas não diferiram daqueles valores das interações entre GO-20% e 60 °C/min, LS-2,0% e 10, 20 e 60 °C/min, e LS-1,0% e 20 e 60 °C/min ($P > 0,05$).

Tabela 1. Análises estatísticas dos efeitos de extensor (Ex), taxa de congelação (TC) e da interação entre eles (Ex*TC) sobre parâmetros espermáticos no sêmen descongelado de carneiros.

Parâmetros espermáticos	Fatores								
	Ex			TC			Ex*TC		
	gl	F-valor	P-valor	gl	F-valor	P-valor	gl	F-valor	P-valor
Mot		44,84	0,0001 ***		15,63	0,0005 ***		4,18	0,0050 **
Vig		48,11	0,0007 ***		8,58	0,0010 ***		4,57	0,0030 **
MT		15,00	0,0001 ***		0,89	0,4200 ns		0,37	0,8800 ns
MP		13,25	0,0003 ***		0,28	0,7500 ns		0,80	0,5700 ns
VCL		7,47	0,0010 **		2,59	0,0970 ns		2,09	0,0940 ns
VAP		44,65	0,0001 ***		4,31	0,0200 *		4,39	0,0046 **
VSL		39,34	0,0001 ***		2,93	0,0742 ns		4,68	0,0030 **
LIN		21,49	0,0001 ***		0,74	0,4907 ns		2,62	0,0454 *
STR		15,44	0,0001 ***		21,47	0,0006 ***		6,31	0,0005 ***
ALH		2,53	0,0800 ns		0,59	0,5500 ns		0,61	0,7100 ns
BCF		11,49	0,0009 ***		2,72	0,0800 ns		1,91	0,1200 ns
WOB		30,95	0,0001 ***		2,74	0,0869 ns		0,98	0,4629 ns
RAP	3	15,37	0,0010 ***	2	0,84	0,4400 ns	6	0,92	0,4900 ns
MED		15,79	0,0001 **		0,08	0,9261 ns		0,98	0,4985 ns
LEN		8,98	0,0004 ***		0,26	0,7758 ns		1,62	0,1881 ns
EST		13,75	0,0001 ***		0,56	0,5811 ns		0,38	0,8825 ns
HOST		127,60	0,0004 ***		0,07	0,9200 ns		0,54	0,7600 ns
A ⁻ /PI ⁻		15,83	0,0001 ***		50,71	0,0001 ***		2,85	0,0331 *
A ⁺ /PI ⁻		4,38	0,0108 *		3,40	0,0530 ns		0,91	0,4244 ns
A ⁺ /PI ⁺		45,77	0,0001 ***		6,39	0,0065 **		0,49	0,8089 ns
A ⁻ /PI ⁺		25,89	0,0001 ***		0,36	0,6998 ns		0,45	0,8343 ns
Viab		26,52	0,0001 ***		13,29	0,0002 ***		0,91	0,5054 ns
F		57,06	0,0001 ***		0,92	0,4134 ns		7,56	0,0002 ***
B		0,33	0,8000 ns		0,39	0,6700 ns		1,21	0,3300 ns
AR		24,70	0,0001 ***		0,41	0,6660 ns		5,21	0,0018 **

Mot = motilidade massal; Vig = vigor; MT = motilidade total; MP = motilidade progressiva; VCL = velocidade curvilínea; VAP = velocidade do percurso médio; VSL = velocidade em linha reta; LIN = linearidade; STR = retilinearidade; ALH = amplitude do deslocamento lateral da cabeça; BCF = frequência de batimento flagelar cruzado; WOB = índice de oscilação ou wobble; espermatozoides rápidos (RAP), médios (MED), lentos (LEN) e estáticos (EST); HOST = teste hiposmótico; espermatozoides não-apoptóticos com membrana plasmática íntegra (A⁻/PI⁻), com apoptose inicial (A⁺/PI⁻); com apoptose tardia (A⁺/PI⁺), e em necrose (A⁻/PI⁺); Viab = espermatozoides viáveis; espermatozoides não-capacitados e sem reação acrossomal (F), capacitados (B) e com reação acrossomal (AR); gl = graus de liberdade. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ns = não significativo (P > 0,05).

c. *Integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides*

A integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides (HOST) foi fortemente afetada pelo fator extensor (P = 0,0004), já a taxa de congelação e a interação destes dois fatores não tiveram influência significativa (P > 0,05) sobre esta variável (Tabela

Tabela 2. Médias $\pm$ erros padrões dos parâmetros espermáticos no sêmen de carneiros submetidos à congelamento após diluição em diferentes extensores à base de gema de ovo (GO) e lecitina de soja (LS).

Parâmetros espermáticos	Extensores			
	GO-20 %	LS-0,5 %	LS-1,0 %	LS-2,0 %
Mot (%)	23,33 $\pm$ 1,17 a	1,77 $\pm$ 0,19 c	13,11 $\pm$ 1,92 b	23,33 $\pm$ 1,66 a
Vig (0-5)	2,55 $\pm$ 0,17 a	0,88 $\pm$ 0,11 c	1,66 $\pm$ 0,16 b	2,33 $\pm$ 0,16 a
MT (%)	30,27 $\pm$ 3,99 a	9,64 $\pm$ 1,37 b	13,75 $\pm$ 2,00 b	25,04 $\pm$ 2,22 a
MP (%)	13,01 $\pm$ 2,25 a	1,52 $\pm$ 0,36 b	3,03 $\pm$ 1,07 b	10,16 $\pm$ 1,66 a
VCL (μ m/s)	192,49 $\pm$ 2,53 a	148,32 $\pm$ 14,31 c	167,52 $\pm$ 9,99 bc	190,03 $\pm$ 2,53 ab
VAP (μ m/s)	147,06 $\pm$ 3,82 a	81,07 $\pm$ 8,03 b	77,47 $\pm$ 9,96 b	126,47 $\pm$ 3,57 a
VSL (μ m/s)	134,83 $\pm$ 3,42 a	72,53 $\pm$ 7,59 b	63,32 $\pm$ 9,98 b	119,14 $\pm$ 3,81 a
LIN (%)	71,01 $\pm$ 2,15 a	47,53 $\pm$ 1,61 b	47,34 $\pm$ 4,81 b	63,46 $\pm$ 2,07 a
STR (%)	91,77 $\pm$ 1,59 ab	86,15 $\pm$ 2,44 b	67,78 $\pm$ 9,06 c	93,85 $\pm$ 0,55 a
ALH (μ m)	2,73 $\pm$ 0,07 ab	0,72 $\pm$ 0,47 c	2,12 $\pm$ 0,24 bc	2,99 $\pm$ 0,15 a
BCF (Hz)	30,12 $\pm$ 1,37 a	19,64 $\pm$ 3,96 b	16,07 $\pm$ 3,25 b	31,67 $\pm$ 0,90 a
WOB (%)	76,98 $\pm$ 1,89 a	42,39 $\pm$ 8,09 b	34,99 $\pm$ 5,47 b	67,31 $\pm$ 1,88 a
RAP (%)	5,08 $\pm$ 1,05 a	0,32 $\pm$ 0,19 c	0,50 $\pm$ 0,25 bc	2,17 $\pm$ 0,71 ab
MED (%)	9,91 $\pm$ 1,42 a	1,42 $\pm$ 0,35 b	2,93 $\pm$ 0,87 b	8,70 $\pm$ 1,07 a
LEN (%)	15,30 $\pm$ 1,97 a	7,42 $\pm$ 1,07 b	10,33 $\pm$ 1,29 ab	14,85 $\pm$ 1,06 a
EST (%)	69,71 $\pm$ 4,00 b	90,84 $\pm$ 1,39 a	86,24 $\pm$ 2,02 a	74,28 $\pm$ 2,02 b
HOST (%)	14,16 $\pm$ 1,10 a	0,72 $\pm$ 0,12 d	2,00 $\pm$ 0,27 c	6,50 $\pm$ 0,87 b
A ⁻ /PI ⁻ (%)	15,87 $\pm$ 1,64 a	3,94 $\pm$ 0,75 c	5,39 $\pm$ 0,84 c	9,63 $\pm$ 0,93 b
A ⁺ /PI ⁻ (%)	6,50 $\pm$ 1,24 ab	7,49 $\pm$ 1,03 a	3,66 $\pm$ 0,52 b	7,38 $\pm$ 0,58 a
A ⁺ /PI ⁺ (%)	30,03 $\pm$ 5,40 c	80,25 $\pm$ 1,92 a	75,55 $\pm$ 2,50 a	67,46 $\pm$ 1,97 b
A ⁻ /PI ⁺ (%)	47,50 $\pm$ 5,74 a	8,31 $\pm$ 1,10 c	15,31 $\pm$ 1,97 b	15,50 $\pm$ 1,49 b
Viab (%)	22,37 $\pm$ 2,02 a	11,43 $\pm$ 1,47 c	9,06 $\pm$ 1,09 c	17,02 $\pm$ 1,36 b
F (%)	47,27 $\pm$ 3,71 a	20,98 $\pm$ 1,70 c	22,86 $\pm$ 1,88 c	35,99 $\pm$ 2,10 b
B (%)	25,13 $\pm$ 2,20 a	25,93 $\pm$ 3,12 a	28,23 $\pm$ 2,30 a	25,90 $\pm$ 2,59 a
AR (%)	27,60 $\pm$ 4,35 c	53,09 $\pm$ 3,11 a	48,91 $\pm$ 3,50 a	38,11 $\pm$ 2,90 b

Mot = motilidade massal; Vig = vigor; MT = motilidade total; MP = motilidade progressiva; VCL = velocidade curvilínea; VAP = velocidade do percurso médio; VSL = velocidade em linha reta; LIN = linearidade; STR = retilinearidade; ALH = amplitude do deslocamento lateral da cabeça; BCF = frequência de batimento flagelar cruzado; WOB = índice de oscilação ou wobble; espermatozoides rápidos (RAP), médios (MED), lentos (LEN) e estáticos (EST); HOST = teste hiposmótico; espermatozoides não-apoptóticas com membrana plasmática íntegra (A⁻/PI⁻), com apoptose inicial (A⁺/PI⁻); com apoptose tardia (A⁺/PI⁺), e em necrose (A⁻/PI⁺); Viab = espermatozoides viáveis; espermatozoides não-capacitados e sem reação acrossomal (F), capacitados (B) e com reação acrossomal (AR). ^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças entre extensores (P < 0,05).

1). Todos os extensores diferenciaram-se entre si (P < 0,05) quanto à porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática funcional apresentando médias de valores decrescentes progressivamente entre GO-20%, LS-2,0%, LS-1,0% e LS-0,5% (Tabela 2).

Tabela 3. Médias $\pm$ erros padrões dos parâmetros espermáticos no sêmen de carneiros submetidos a diferentes taxas de congelamento.

Parâmetros espermáticos	Taxas de congelamento		
	10 °C/min	20 °C/min	60 °C/min
Mot (%)	11,91 $\pm$ 2,56 b	17,66 $\pm$ 2,88 a	16,58 $\pm$ 3,05 a
Vig (0-5)	1,50 $\pm$ 0,15 b	2,08 $\pm$ 0,23 a	2,00 $\pm$ 0,27 a
MT (%)	18,62 $\pm$ 2,26 a	21,95 $\pm$ 3,99 a	18,45 $\pm$ 3,42 a
MP (%)	6,56 $\pm$ 1,57 a	7,96 $\pm$ 2,22 a	6,26 $\pm$ 1,93 a
VCL (μ m/s)	184,72 $\pm$ 8,98 a	168,75 $\pm$ 9,99 a	170,30 $\pm$ 8,19 a
VAP (μ m/s)	114,74 $\pm$ 8,35 a	111,81 $\pm$ 10,94 ab	97,51 $\pm$ 11,80 b
VSL (μ m/s)	101,59 $\pm$ 10,62 a	102,48 $\pm$ 10,35 a	88,29 $\pm$ 10,84 a
LIN (%)	55,95 $\pm$ 5,25 a	59,49 $\pm$ 3,37 a	56,55 $\pm$ 2,81 a
STR (%)	86,97 $\pm$ 5,12 b	90,86 $\pm$ 0,71 a	76,82 $\pm$ 6,48 c
ALH (μ m)	2,55 $\pm$ 0,29 a	2,73 $\pm$ 0,13 a	2,50 $\pm$ 0,30 a
BCF (Hz)	22,58 $\pm$ 3,48 a	27,49 $\pm$ 1,80 a	23,05 $\pm$ 3,34 a
WOB (%)	52,02 $\pm$ 7,85 a	62,78 $\pm$ 4,59 a	51,46 $\pm$ 6,86 a
RAP (%)	1,97 $\pm$ 0,62 a	2,59 $\pm$ 0,97 a	1,51 $\pm$ 0,71 a
MED (%)	5,13 $\pm$ 1,18 a	6,43 $\pm$ 1,80 a	5,04 $\pm$ 1,48 a
LEN (%)	13,69 $\pm$ 1,46 a	11,67 $\pm$ 1,92 a	11,02 $\pm$ 1,76 a
EST (%)	79,22 $\pm$ 2,15 a	79,43 $\pm$ 4,39 a	82,54 $\pm$ 3,61 a
HOST (%)	5,62 $\pm$ 1,43 a	6,33 $\pm$ 1,94 a	5,58 $\pm$ 1,67 a
A ⁻ /PI ⁻ (%)	6,21 $\pm$ 1,44 b	8,83 $\pm$ 1,03 ab	11,09 $\pm$ 2,05 a
A ⁺ /PI ⁻ (%)	4,69 $\pm$ 0,63 a	7,21 $\pm$ 0,93 a	6,87 $\pm$ 0,90 a
A ⁺ /PI ⁺ (%)	69,19 $\pm$ 6,26 a	62,70 $\pm$ 5,70 b	58,07 $\pm$ 7,23 b
A ⁻ /PI ⁺ (%)	19,84 $\pm$ 5,03 a	21,17 $\pm$ 5,04 a	23,95 $\pm$ 5,78 a
Viab (%)	10,90 $\pm$ 1,84 b	16,04 $\pm$ 1,66 a	17,96 $\pm$ 1,93 a
F (%)	30,08 $\pm$ 2,78 a	32,16 $\pm$ 3,36 a	31,61 $\pm$ 5,02 a
B (%)	26,72 $\pm$ 1,81 a	27,08 $\pm$ 2,42 a	27,69 $\pm$ 2,32 a
AR (%)	43,20 $\pm$ 2,37 a	40,76 $\pm$ 4,10 a	40,70 $\pm$ 5,53 a

Mot = motilidade massal; Vig = vigor; MT = motilidade total; MP = motilidade progressiva; VCL = velocidade curvilinear; VAP = velocidade do percurso médio; VSL = velocidade em linha reta; LIN = linearidade; STR = retilinearidade; ALH = amplitude do deslocamento lateral da cabeça; BCF = frequência de batimento flagelar cruzado; WOB = índice de oscilação ou wobble; espermatozoides rápidos (RAP), médios (MED), lentos (LEN) e estáticos (EST); HOST = teste hiposmótico; espermatozoides não-apoptóticas com membrana plasmática íntegra (A⁻/PI⁻), com apoptose inicial (A⁺/PI⁻); com apoptose tardia (A⁺/PI⁺), e em necrose (A⁻/PI⁺); Viab = espermatozoides viáveis; espermatozoides não-capacitados e sem reação acrossomal (F), capacitados (B) e com reação acrossomal (AR). ^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças entre taxas de congelamento ($P < 0,05$).

d. Viabilidade espermática

O fator extensor teve efeito significativo ($P < 0,05$) ou altamente significativo ($P < 0,0001$) sobre as percentagens dos tipos de espermatozoides e da viabilidade espermática determinadas pela citometria de fluxo (Tabela 1). O GO-20% apresentou percentagens maiores de espermatozoides não-apoptóticos com membrana plasmática íntegra (A⁻/PI⁻) e viáveis (A⁻/PI⁻ + A⁺/PI⁻) em relação aos extensores LS-0,5%, LS-1,0% e LS-2,0% ($P < 0,05$).

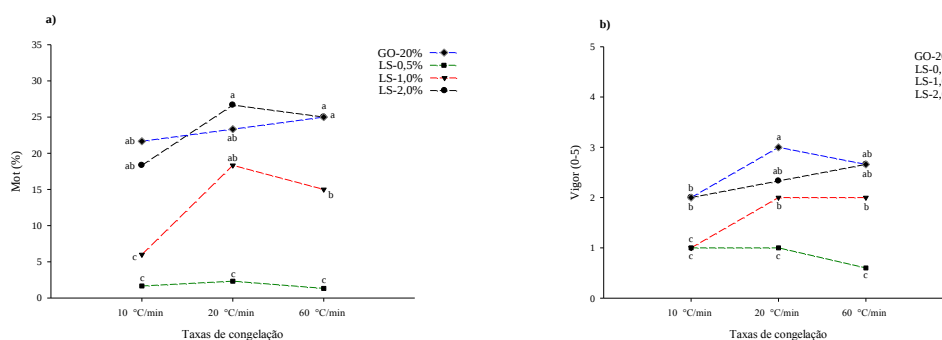


Figura 2. Efeitos das interações entre diferentes extensores à base de gema de ovo (GO) e lecitina de soja (LS) e taxas de congelamento sobre a motilidade massal (a) e vigor (b) dos espermatozoides no sêmen descongelado de carneiro. ^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre as interações ($P < 0,05$).

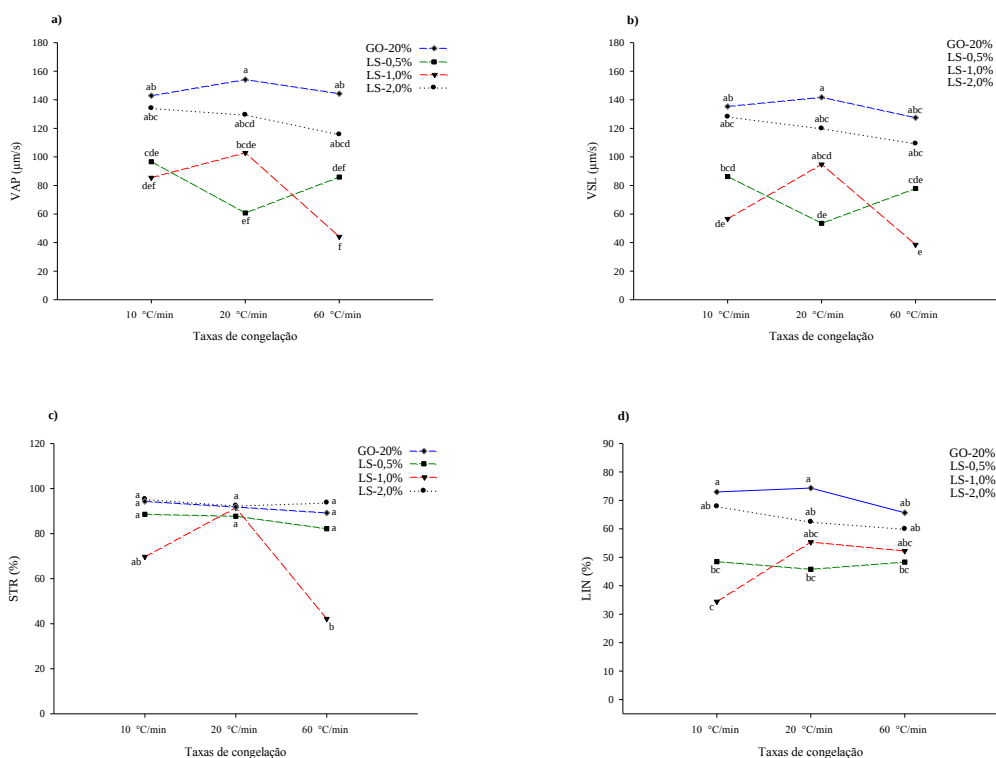


Figura 3. Efeitos das interações dos diferentes extensores à base de gema de ovo (GO) e lecitina de soja (LS) e taxas de congelamento sobre os parâmetros da cinética espermática computadorizada: velocidades do percurso médio (VAP) e em linha reta (VSL), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN). ^{a,b,c,d,e} Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre as interações ($P < 0,05$).

Comparando-se apenas os extensores à base de lecitina de soja observou-se que o LS-2,0% apresentou percentagens maiores de espermatozoides A⁺/PI e viáveis em relação ao LS-0,5% e LS-1,0% ($P < 0,05$), que não tiveram diferenças significativas entre si para estes parâmetros ($P > 0,05$). Os espermatozoides em início de apoptose (A⁺/PI) foram mais frequentes nos extensores LS-0,5% e LS-2,0% em relação ao LS-1,0% ($P < 0,05$). Entretanto, as frequências deste tipo espermático nos extensores à base de lecitina foram todas semelhantes ($P > 0,05$) ao GO-20% que se posicionou de forma intermediária entre os

extensores quanto a este parâmetro. Foram encontradas percentagens menores de espermatozoides com apoptose tardia (A^+/PI^+) no GO-20% em relação aos demais extensores ($P < 0,05$), já o LS-2,0% apresentou menor valor deste parâmetro em relação ao LS-0,5% e LS-1,0% ($P < 0,05$), sendo que estes dois últimos não diferiram entre si ($P > 0,05$) (Tabela 2).

A maior percentagem de espermatozoides necróticos (A^-/PI^+) foi encontrada no GO-20% que diferiu dos demais extensores ($P < 0,05$). O LS-0,5% foi o que apresentou menor percentagem de espermatozoides necróticos diferindo com todos os demais extensores ($P < 0,05$), enquanto o LS-2,0% e LS-1,0% não diferiram entre si na frequência deste tipo espermático ($P > 0,05$) (Tabela 2).

O fator taxa de congelação teve forte efeito ($P < 0,001$ a $P < 0,01$) sobre as frequências de alguns tipos de espermatozoides e da viabilidade espermática (Tabela 1). Como pode ser verificado na Tabela 3, maiores percentagens de espermatozoides A^-/PI^- e viáveis foram encontrados em 60 °C/min comparado a 10 °C/min ($P < 0,05$). A taxa de 20 °C/min não diferiu de 60 °C/min para ambos os parâmetros ($P > 0,05$) e foi semelhante ($P > 0,05$) e maior ($P < 0,05$) que 10 °C/min para a frequência de espermatozoides A^-/PI^- e viáveis, respectivamente. A maior percentagem de espermatozoides A^+/PI^+ foi obtida na taxa de congelação 10 °C/min diferindo significativamente de 20 °C/min e 60 °C/min ($P < 0,05$), sendo que estas duas últimas taxas de congelação não diferiram entre si ($P > 0,05$).

Em relação às análises feitas por citometria de fluxo, a interação entre extensor e taxa de congelação teve efeito ($P < 0,05$) apenas sobre a percentagem de espermatozoides A^-/PI^- (Tabela 3). Na Figura 4 observa-se que a interação entre GO-20% e 60 °C/min foi a que apresentou as maiores percentagens de espermatozoides A^-/PI^- diferindo com todas as demais interações ($P < 0,05$).

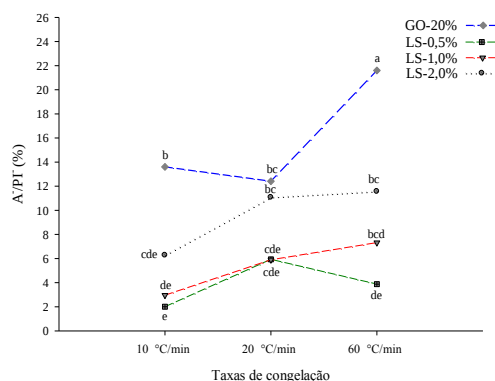


Figura 4. Efeitos das interações entre os diferentes extensores à base de gema de ovo (GO) e lecitina de soja (LS) e taxas de congelação sobre a percentagem de espermatozoides não-apoptóticos com membrana plasmática íntegra (A^-/PI^-). ^{a,b,c,d,e} Letras minúsculas diferentes indicam diferença ($P < 0,05$).

e. Capacitação e reação acrossomal espermáticas

Na Tabela 1 pode ser visto o resultado da análise estatística dos parâmetros que avaliaram a capacitação e reação acrossomal dos espermatozoides. O fator 1, representado pelo extensor, e a sua interação com o fator 2, representado pela taxa de congelação, tiveram forte efeito ($P < 0,001$ a $P < 0,01$) sobre a percentagem de espermatozoides classificados como não-capacitados (F) e com reação acrossomal (AR). Já a taxa de congelação não afetou nenhum parâmetro desta avaliação assim como os espermatozoides capacitados não foram afetados por nenhum dos fatores testados nem pela interação entre eles ($P > 0,05$). Como pode ser verificado na Tabela 2, as percentagens maiores de F e menores de AR foram encontradas no GO-20% ($P < 0,05$). Entre os extensores à base de lecitina encontrou-se percentagens

maiores de F e menores de AR no LS-2,0% que no LS-1,0% e LS-0,5% ($P < 0,05$), sendo que estes dois últimos extensores não diferiram entre si ($P > 0,05$) para nenhum destes parâmetros.

Como observa-se na Figura 5 a interação entre GO-20% e 60 °C/min foi a que apresentou a maior percentagem de espermatozoides classificados como F em relação a todas as demais ($P < 0,05$). Dentre as interações com extensores à base de lecitina de soja aquelas entre LS-2,0% e 10 e 20 °C/min apresentaram maior percentagem de espermatozoides classificados como F em relação às interações entre LS-0,5% e 10, 20 e 60 °C/min, e entre LS-1,0% e 20 e 60 °C/min ($P < 0,05$), mas não diferiram da interação entre LS-1,0% e 10 °C/min ($P > 0,05$). A interação entre o extensor GO-20% e a taxa de congelação 60 °C/min apresentou menores percentagens de espermatozoides classificados como AR em relação à interação entre GO-20% e 10 °C/min ($P < 0,05$), não diferindo, entretanto, com as interações entre GO-20% e 20 °C/min e entre LS-2,0% e 20 °C/min ($P > 0,05$). Dentre as interações com extensores à base de lecitina de soja aquelas entre LS-2,0% e 10 e 20 °C/min apresentaram menores valores de AR em relação à interação entre LS-0,5% e 60 °C/min ($P < 0,05$), mas não diferiram com as interações entre LS-0,5% e 10 e 20 °C/min, e entre LS-1,0% e 10, 20 e 60 °C/min ($P > 0,05$).

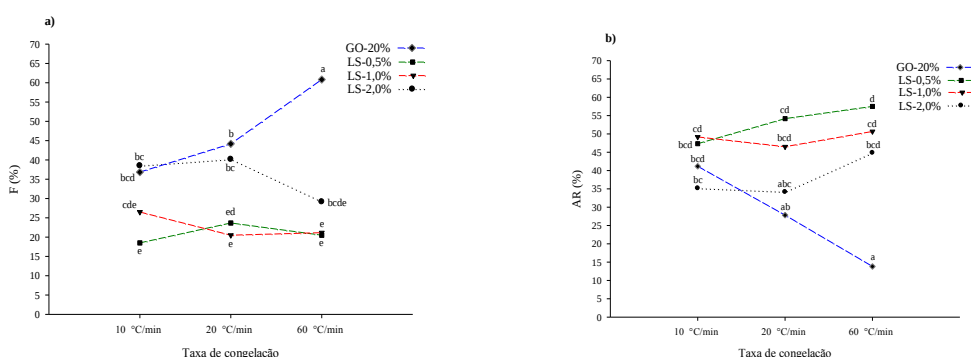


Figura 5. Efeitos das interações entre diferentes extensores à base de gema de ovo (GO) e lecitina de soja (LS) e taxas de congelação sobre as percentagens de espermatozoides não-capacitados (F) e com reação acrossomal (AR). ^{a,b,c,d,e} Letras minúsculas diferentes indicam diferença ($P < 0,05$).

5.4. Discussão

Nas análises subjetivas de motilidade massal e vigor espermático os extensores GO-20% e LS-2,0% e as taxas de congelação moderada de 20 °C/min e rápida de 60 °C/min apresentaram melhor desempenho. Também ao considerar-se apenas o extensor LS-1,0% observou-se que a motilidade massal e o vigor espermáticos foram maiores nas taxas de congelação de 60 °C/min e 20 °C/min em relação a de 10 °C/min.

Nós observamos que, de uma maneira geral, os extensores GO-20% e LS-2,0% apresentaram melhores parâmetros cinéticos espermáticos analisados pelo sistema computadorizado após a descongelação, com maiores percentagens de espermatozoides com motilidade total e progressiva, retilíneos, lineares e com velocidade de média a rápida como requerido na reprodução. No sêmen descongelado de carneiros da raça Zandi encontrou-se resultados similares ao nosso estudo quanto aos valores dos parâmetros cinéticos analisados pelo mesmo software (SCA[®]), quando foram usados os extensores gema de ovo a 20% e lecitina de soja a 2,0% [46]. A única diferença é que os autores obtiveram os melhores resultados na maioria dos parâmetros cinéticos dos espermatozoides com o extensor à base de lecitina de soja a uma concentração um pouco inferior a 1,5% [46].

Esta diferença entre os resultados do nosso trabalho e aquele de [46] pode ter ocorrido devido às diferenças nas concentrações de glicerol dos extensores e das taxas de congelação utilizadas entre os trabalhos, visto que tem sido demonstrado que a interação glicerol e taxas

de congelação tem influência sobre a cinética dos espermatozoides [47]. O sêmen da raça Zandi foi diluído com um extensor que continha maior concentração de glicerol (7%) quando comparado ao de nosso trabalho (5%), e foi congelado com uma taxa de congelação gerada a partir da exposição do sêmen a 5 cm acima do nível de nitrogênio, similar ao que foi feita na taxa de 20°C/min (4,5 cm) de nosso trabalho, mas diferindo com as taxas de 60°C/min (1,5 cm) e 10°C/min (7,5 cm).

Outros estudos com sêmen de carneiros das raças Zandi [42] e Zell [48] demonstraram que a lecitina de soja a 1,0% teve resultados similares ao da gema de ovo a 20% na composição de extensores, não apresentando diferenças significativas nas análises pelo SCA® da cinética dos espermatozoides após a descongelação. Adicionalmente, amostras de sêmen de carneiros da raça Mehraban diluídas em extensores à base de lecitina de soja a 1,0% e 1,5%, suplementados com ácido hialurônico, não apresentaram diferenças significativas entre si nos valores da cinética espermática analisada pelo SCA® após a descongelação [49].

Ainda contrariando parcialmente o que nós encontramos, no sêmen descongelando da raça Bakhtiari a motilidade total foi significativamente maior nas amostras diluídas nos extensores à base de lecitina de soja a 1,0% e gema de ovo a 20% em relação aos extensores lecitina de soja a 1,5% e gema de ovo a 15% [16]. Em outro trabalho com sêmen de carneiros da raça Bakhtiari, os autores não observaram diferenças na motilidade total dos espermatozoides após descongelação entre as amostras diluídas no extensor à base de lecitina de soja a 1,0% e aquelas diluídas no extensor comercial Bioxcell à base de proteína vegetal [50]. Adicionalmente o extensor à base de lecitina de soja a 1,0% no sêmen de touros [21] e homens [17] apresentou maior motilidade total quando comparado com extensores à base de gema de ovo a 20%.

Neste trabalho os extensores GO-20% e LS-2,0% apresentaram efeitos similares sobre a motilidade progressiva dos espermatozoides. Este mesmo parâmetro avaliado no sêmen descongelado da raça ovina Rahmani também foi semelhante entre os extensores à base de lecitina de soja a 3,5% e de gema de ovo a 15% [51].

O valor do VCL no sêmen de carneiros da raça Wr-zosówka após a descongelação foi maior quando foi utilizado o extensor à base de lecitina de soja a 1,5% comparado com outro à base de gema de ovo a 20% [28]. Já no estudo com sêmen descongelado de coelhos observou-se maiores valores da VCL e SRT e menores da VAP e do WOB no extensor à base de lecitina de soja a 1,5% em relação ao da gema de ovo a 18%, não diferindo na LIN [52]. Claro que devemos considerar que as diferenças entre os resultados obtidos no nosso trabalho em relação àqueles da literatura podem ter como fonte as diferenças de composição entre os extensores utilizados como base e nas diferenças genéticas entre raças e espécies utilizadas como modelo experimental.

A taxa de congelação não afetou a maioria dos parâmetros cinéticos dos espermatozoides analisados pelo SCA® os quais apresentaram valores médios altos. As exceções foram o VAP e SRT que foram diferentes entre as taxas de congelação lenta de 10 °C/min e rápida de 60 °C/min e foram, respectivamente, semelhantes e superiores na lenta em relação à média de 20 °C/min. Comportamento maior do VAP similar a nosso estudo na taxa lenta de 10 °C/min foi obtido no sêmen descongelado de touros com a taxa de congelação controlada de 15 °C/min (TK 4000®, Uberaba, Brazil) cujos valores foram superiores em relação ao obtida da taxa de congelação de 19 °C/min (3 cm acima de N₂L) [53], mas contrariando relativamente ao nosso trabalho já que o valor de VAP obtido na taxa média de 20 °C/min não teve diferença com as taxas lentas e rápidas.

No sêmen descongelado de galos a VAP dos espermatozoides não foi afetada pelas taxas de congelação, diferindo dos nossos resultados, mas a STR apresentou um comportamento similar onde foram obtidos maiores valores deste parâmetro na taxa de congelação lenta em relação à rápida que foram obtidas a 10 e 3 cm acima do nível de N₂L, respectivamente [25]. No sêmen descongelado de peixe da espécie *Prochilodus magdalenae* o STR também apresentou comportamento semelhante ao observado em nosso trabalho com

maiores médias na taxa de congelação lenta (8,2 °C/min de 4 °C a -80 °C) em relação à rápida (29,9 °C/min de 4 °C a -80 °C) [54]. Já em outro estudo, também com sêmen descongelado de peixe da espécie *Prochilodus lineatus*, o comportamento do STR diferiu de nosso trabalho, não apresentando diferenças entre as taxas de congelação de 15 °C/min e 35 °C/min [55].

A comparação com a literatura dos resultados da interação entre extensores à base de lecitina de soja e taxas de congelação não é possível de ser realizada já que este é o primeiro trabalho que estudou este tipo de interação, razão pela qual só é possível comparar resultados de outros autores que estudaram os fatores de forma isolada. Nas análises dos efeitos das interações entre os extensores e as taxas de congelação sobre os parâmetros VAP, VSL, STR, e LIN nós observamos que os extensores GO-20% e LS-2,0% apresentaram um comportamento similar quando submetido às diferentes taxas de congelação. O desempenho mais próximo entre GO-20% e LS-2,0% possivelmente tenha sido consequência das quantidades aproximadas de LDL que os dois extensores ofereceram às células espermáticas em relação àquelas oferecidas pelo LS-0,5% e LS-1,0%, que tiveram um comportamento irregular com comportamento quadrático, principalmente o LS-1,0% que apresentou valores menores de VAP, VSL e SRT na taxa de congelação de 60 °C/min em relação a de 20 °C/min.

Neste trabalho o extensor à base de gema de ovo a 20% apresentou uma maior integridade funcional da membrana plasmática (HOST) dos espermatozoides, sendo claramente superior em relação aos extensores à base de lecitina soja. No sêmen descongelado de cervos obtiveram-se maiores valores de HOST dos espermatozoides naquelas amostras que foram diluídas no extensor à base de gema de ovo a 20% em relação ao extensor a 5% [56]. As diferenças podem ser atribuídas a uma maior proteção na estabilidade da camada lipídica-glicocálix e das proteínas e lipídios da superfície da membrana plasmática dos espermatozoides pela ação da LDL, assim como pela sua quantidade oferecida pelo extensor à base de gema de ovo [56,57].

A membrana plasmática íntegra caracteriza-se pela manutenção da camada lipídica-glicocálix estável proporcionando imunoproteção aos espermatozoides no trato da fêmea e habilidades de fertilização pela interação dos lipídios e proteínas que a compõem [58]. Espermatozoides que apresentam externalização da fosfatidilserina na membrana plasmática, que é característica da célula danificada e com apoptose, são suscetíveis à fagocitose pelas células de defesa no trato da fêmea [59]. Tem sido demonstrado que os distúrbios sobre os espermatozoides de carneiros originados na congelação levam à perda de proteínas a exemplo da proteína mitocondrial trifuncional (PMT), receptor de polipeptídeo ativador de adenilato ciclase hipofisário tipo 1 (PAC₁) e a proteína de repetição de Anquirina, SAM contendo domínio zipper de leucina básica 1 (ASZ1) envolvidos no metabolismo da motilidade, capacitação, interação espermatozoides-oócitos e na fusão destes gametas [60].

Nossos resultados das médias de espermatozoides com membrana íntegra não-apoptóticos (A^{+/PI}) e viabilidade espermática mostraram que os extensores à base de lecitina de soja não conseguiram superar a capacidade do GO-20% de minimizar os danos da congelação, diferença que pode ser atribuída principalmente à ação da LDL presentes na GO [56,57]. Entretanto, dentre os extensores à base de lecitina de soja, percebeu-se uma superioridade da maior concentração (2,0%) em relação às menores (0,5 e 1,0%).

Diferentemente do que foi obtido no nosso trabalho, amostras de sêmen de carneiros da raça Zandi congeladas em extensores à base de gema de ovo a 20% e lecitina de soja a 2,0% não apresentaram diferenças nos valores médios de espermatozoides não-apoptóticos com membrana plasmática íntegra [46]. Outra divergência é que ambos extensores utilizados pelos autores apresentaram menores valores deste tipo espermático quando comparados aos extensores à base de lecitina de soja a 1,0 e 1,5 % do nosso trabalho. Adicionalmente, o extensor com 2,5% de lecitina de soja utilizado pelos autores não diferiu dos extensores com 1,0, 1,5 e 2,0%, mas foi superior àquele com gema de ovo a 20% do nosso trabalho [46]. Adicionalmente, na raça ovina Zell, o sêmen descongelado apresentou médias similares de espermatozoides com membrana plasmática íntegra nas amostras diluídas em extensores à

base de lecitina de soja a 1,0% e naquelas diluídas em extensor à base de gema de ovo a 20%, suplementados com diferentes níveis de coenzima Q10 [48] contrariando relativamente ao nosso trabalho, já que nós obtivemos maiores valores de este tipo de células espermática no extensor à base de gema de ovo a 20 % em relação aos encontrados nos extensores à base de lecitina de soja a 0,5, 1,0 e 2,0%.

Ao observar-se os efeitos das taxas de congelação de uma maneira geral, obtivemos melhora das percentagens de espermatozoides não-apoptóticos com membrana plasmática íntegra e da viabilidade nas taxas de congelação mais rápidas (20 e 60 °C/min) em relação a mais lenta (10 °C/min). Resultados similares foram obtidos com taxas de congelação rápidas, de 30 °C/min e 50 °C/min em carneiros e porcos [23], de 100 °C/min em ratas [24], de 40 °C/min e 70 °C/min aproximadamente obtidas a 3 e 1 cm do nível de nitrogênio líquido em galos [25], as quais apresentaram melhor efeito na preservação das características estruturais e na viabilidade dos espermatozoides em relação a taxas de congelação mais lentas. Em adição, ótimas taxas de congelação entre 15 a 60 °C/min [61] e 30 °C/min [23] foram reportadas em carneiros.

Espermatozoides de carneiros que mantêm a membrana plasmática íntegra depois da congelação não perdem a energia indispensável para os processos de fertilização na forma de seu conteúdo de ATP que permanece semelhante àquele de espermatozoides do sêmen *in natura* [62]. É necessário destacar que a combinação positiva entre espermatozoides com membrana plasmática íntegra e não-capacitados incrementa a probabilidade de se obter fertilidades altas *in vivo*, e pode ser usada como indicador da resistência e tempo de vida dos espermatozoides no trato da fêmea [63]. Espermatozoides da espécie ovina submetidos a taxas de congelação rápidas na faixa da temperatura crítica de -10 a -25 °C para a espécie [64] apresentaram maior fertilidade significativa *in vivo* e *in vitro* em relação aqueles que foram submetidos a taxas de congelação lentas, mostrando altas taxa de clivagem e produção de blastocistos manifestado na maior taxa de prenhez [61].

Para o sucesso da criopreservação com a manutenção da integridade e funcionalidade das células dos mamíferos, a exemplo dos espermatozoides, algumas condições devem ser atendidas. As células devem ser suspensas em aditivos de proteção com concentrações altas o suficiente para prevenir o chamado "efeito-solução" que pode ser provocado por uma taxa de congelação lenta ocasionando prejuízo com a perda da integridade da membrana plasmática. As células devem ser congeladas em taxas não muito altas para evitar a cristalização rápida a nível intracelular, o qual não permitiria a saída suficiente de água [65]. Calculou-se que a temperatura de cristalização nos espermatozoides está entre -20 °C e -40 °C [66] e que, especificamente para os carneiros, o equilíbrio osmótico estimado ocorre entre -20 °C e -30 °C, temperaturas em que as células não sofrem danos em nível intracelular [67].

Além da integridade estrutural da célula espermática [60] são requeridos espermatozoides funcionais não-capacitados em maior proporção nas amostras de sêmen para seu uso na reprodução assistida, a exemplo da inseminação artificial por possuírem maior longevidade, apresentando correlação positiva alta com a fertilidade [47,68].

Considerando-se apenas o efeito do extensor, observou-se médias mais altas de espermatozoides não-capacitados em primeiro lugar no GO-20% (47,27%) e em segundo lugar no LS-2,0% (35,94%), as quais foram superiores às encontradas no sêmen de carneiros da raça Corriedade congelado em extensores à base de leite e gema de ovo a 5% (26,30%) e no Bioexcell à base de lecitina de soja (28,50%) [47]. Estas médias de nosso trabalho também foram superiores àquelas encontradas no sêmen descongelado de carneiros da raça Santa Inês submetido ao mesmo extensor à base Glicina-gema de ovo-leite utilizado por nós sem adição de nenhum antioxidante (13,50%) ou mesmo com adição de catalase (14,30%) e trolox (13,40%) pelos autores [69].

A interação entre o extensor GO-20% e a taxa de congelação 60 °C/min apresentou a maior média de espermatozoides classificados como não-capacitados cujo valor foi semelhante ao encontrado no sêmen *in natura* de carneiros [43], assim como no sêmen

descongelado de touros [70]. A capacitação e a reação acrossomal dos espermatozoides são fenômenos naturais para a fertilização que naturalmente devem ocorrer no trato da fêmea [71]. Entretanto, a criopreservação do sêmen desencadeia e acelera estes processos de forma artificial sendo que estes fenômenos estão associados com a diminuição da longevidade e sobrevivência dos espermatozoides descongelados, reduzindo a sua capacidade de fertilização no trato da fêmea [72]. A criopreservação produz alteração estrutural na membrana plasmática dos espermatozoides com perdas de compostos como o colesterol [73] e proteínas de superfície que trazem consigo um aumento da permeabilidade da sua bicamada lipídica, incrementando o fluxo do cálcio (Ca^{2+}) dentro da célula que por sua vez ativa diversos processos bioquímicos chegando à polimerização e dispersão da F-actina e consequentemente na capacitação e reação acrossomal precoce dos espermatozoides [66]. Evidências têm mostrado maior proporção de espermatozoides capacitados e com reação acrossomal no sêmen descongelado de carneiros em comparação do sêmen *in natura* [74].

Nossos resultados demonstraram que as amostras de sêmen diluídas nos extensores à base de lecitina de soja na concentração de 0,5 e 1,0% e congeladas em qualquer das taxas de congelação estudadas apresentaram maiores quantidades de espermatozoides com prematura reação acrossomal, evidenciando maior efeito negativo quando comparados com a interação entre o extensor à base de gema de ovo a 20% e as taxas de congelação 60 °C/min, a qual não diferiu da interação entre o extensor à base de lecitina de soja a 2,0% e a taxa de congelação 20 °C/min para este tipo de célula espermática. Estudo realizado por [49] utilizou o extensor à base de lecitina de soja a 1,5% mas com acréscimo de ácido hialurônico como antioxidante ao sêmen de carneiros da raça Mehraban, que foi submetido a uma taxa de congelação moderada pela sua disposição a 5 cm do nível de N_2L . Os autores apresentaram médias similares de espermatozoides com reação acrossomal após descongelação quando comparadas àquelas das interações entre os extensores LS-2,0% e GO-20% e a taxa de congelação de 20 °C/min obtidas no nosso estudo, mas apresentando médias superiores à interação entre GO-20% e a taxa de 60 °C/min.

As divergências entre os nossos resultados e aqueles encontrados na literatura citadas acima, quanto aos efeitos dos extensores sobre a cinética espermática, viabilidade, capacitação e reação acrossomal dos espermatozoides, possivelmente sejam devido aos diversos fatores e suas interrelações envolvidas nos protocolos de criopreservação, a exemplo do fator raça (Zandi, Mehraban, Zell e Wr-zosówka), composição dos meios extensores (Tris sem/com adição de suplementos), concentrações espermáticas por dose (50, 300, 400 e 600 x 10^6 espermatozoides/mL), taxas de congelação (5 cm a cima de nitrogênio, -70 °C), glicerol (5%, 7%), entre outros fatores.

Cada extensor para congelação é composto por uma combinação e proporção de osmólitos penetrantes que estabilizam as proteínas intracelulares, reduzem a temperatura de congelação no qual o gelo intracelular se forma impedindo o impacto negativo sobre a estrutura dos espermatozoides. Além deles existem os osmólitos não penetrantes que atuam como tampões osmóticos para a proteção ao ingurgitamento da célula durante a adição e remoção de crioprotetores [75]. Ciente disso é que se recomenda que o efeito da adição de qualquer componente, a exemplo da lecitina de soja, seja testado para cada tipo de extensor e protocolo de criopreservação do sêmen, já que a sua interação com cada elemento específico que compõe a sua fórmula pode resultar em diferentes reações aos espermatozoides.

5.5. Conclusões

O presente estudo evidenciou o efeito protetor dos extensores à base de lecitina de soja a 2% e gema de ovo a 20% sobre a preservação da integridade da membrana plasmática, viabilidade e da cinética dos espermatozoides no sêmen descongelado de carneiros. As taxas de congelação rápidas de 60 °C/min e 20 °C/min apresentam o melhor efeito na preservação da estrutura da membrana plasmática e da maior viabilidade dos espermatozoides. O extensor

à base de gema ovo a 20% tem seu melhor desempenho quando o sêmen é submetido à velocidade de congelação de 60 °C/min. A concentração de 2% de lecitina de soja apresenta melhor desempenho nos extensores à base deste componente em substituição à gema de ovo independente da taxa de congelação utilizada para congelação do sêmen de carneiros. A interação que apresenta a melhor qualidade do sêmen congelado de carneiros é aquela entre o extensor à base de gema de ovo a 20% e a taxa de congelação de 60 °C/min por apresentar maiores percentuais de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e não-capacitados e menores com reação acrossomal após a descongelação.

5.6. Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq), da Fundação de Apoio à Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (Fapitec/SE) – Brasil e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – Brasil (CAPES – Código 001).

5.7. Referências

- [1] C.M.O. Medeiros, F. Forell, A.T.D. Oliveira, J.L. Rodrigues, Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?, *Theriogenology*. 57 (2002) 327–344. [https://doi.org/DOI: 10.1016/s0093-691x\(01\)00674-4](https://doi.org/DOI: 10.1016/s0093-691x(01)00674-4).
- [2] M. Ramón, M.D. Pérez-Guzmán, P. Jiménez-Rabadán, M.C. Estes, O. García-Álvarez, A. Maroto-Morales, L. Anel-López, A.J. Soler, M.R. Fernández-Santos, J.J. Garde, Sperm Cell Population Dynamics in Ram Semen during the Cryopreservation Process, *PLoS ONE*. 8 (2013) e59189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059189>.
- [3] S. Salamon, W.M.C. Maxwell, Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement, *Anim. Reprod. Sci.* 38 (1995) 1–36. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(94\)01328-J](https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)01328-J).
- [4] N. Keskin, C. Erdogan, M.N. Bucak, A.E. Ozturk, M. Bodu, P. Ili, N. Baspinar, S. Dursun, Cryopreservation Effects on Ram Sperm Ultrastructure, *Biopreservation and Biobanking*. 18 (2020) 441–448. <https://doi.org/10.1089/bio.2020.0056>.
- [5] R. Masoudi, A. Zare Shahneh, A. Towhidi, H. Kohram, A. Akbarisharif, M. Sharafi, Fertility response of artificial insemination methods in sheep with fresh and frozen-thawed semen, *Cryobiology*. 74 (2017) 77–80. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.11.012>.
- [6] A. Ntemka, I.A. Tsakmakidis, E. Kiossis, A. Milovanović, C.M. Boscós, Current status and advances in ram semen cryopreservation, *J Hellenic Vet Med Soc*. 69 (2018) 911. <https://doi.org/10.12681/jhvms.18014>.
- [7] J.E. Parks, D.V. Lynch, Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes, *Cryobiology*. 29 (1992) 255–266. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(92\)90024-V](https://doi.org/10.1016/0011-2240(92)90024-V).
- [8] S. Iamsaard, R. Vanichviriyakit, G. Hommalai, A. Saewu, N. Srakaew, B. Withyachumnarnkul, A. Basak, N. Tanphaichitr, Enzymatic activity of sperm proprotein convertase is important for mammalian fertilization, *J. Cell. Physiol*. 226 (2011) 2817–2826. <https://doi.org/10.1002/jcp.22626>.

- [9] S. Dey, C. Brothag, S. Vijayaraghavan, Signaling Enzymes Required for Sperm Maturation and Fertilization in Mammals, *Front. Cell Dev. Biol.* 7 (2019) 341. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00341>.
- [10] L. Simon, K. Murphy, M.B. Shamsi, L. Liu, B. Emery, K.I. Aston, J. Hotaling, D.T. Carrell, Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development, *Hum. Reprod.* 29 (2014) 2402–2412. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu228>.
- [11] V. Hinkovska-Galcheva, D. Petkova, K. Koumanov, Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation, *Cryobiology.* 26 (1989) 70–75. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(89\)90034-5](https://doi.org/10.1016/0011-2240(89)90034-5).
- [12] E. Marti, J.I. Marti, T. Muino-Blanco, J.A. Cebrian-Perez, Effect of the Cryopreservation Process on the Activity and Immunolocalization of Antioxidant Enzymes in Ram Spermatozoa, *J. Androl.* 29 (2008) 459–467. <https://doi.org/10.2164/jandrol.107.003459>.
- [13] M. Moussa, V. Martinet, A. Trimeche, D. Tainturier, M. Anton, Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen–thawed bull semen, *Theriogenology.* 57 (2002) 1695–1706. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00682-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00682-9).
- [14] S. Bousseau, J.P. Brillard, B. Marquant-Le Guienne, B. Guérin, A. Camus, M. Lechat, Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents, *Theriogenology.* 50 (1998) 699–706. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00175-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00175-7).
- [15] P. Perumal, Low density lipoprotein in cryopreservation of semen, *Asian Pac J Reprod.* 7 (2018) 103–116. <https://doi.org/10.4103/2305-0500.233571>.
- [16] M. Forouzanfar, M. Sharafi, S.M. Hosseini, S. Ostadhosseini, M. Hajian, L. Hosseini, P. Abedi, N. Nili, H.R. Rahmani, M.H. Nasr-Esfahani, In vitro comparison of egg yolk–based and soybean lecithin–based extenders for cryopreservation of ram semen, *Theriogenology.* 73 (2010) 480–487. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.005>.
- [17] M.L. Reed, P.C. Ezech, A. Hamic, D.J. Thompson, C.L. Caperton, Soy lecithin replaces egg yolk for cryopreservation of human sperm without adversely affecting postthaw motility, morphology, sperm DNA integrity, or sperm binding to hyaluronate, *Fertil. Steril.* 92 (2009) 1787–1790. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.05.026>.
- [18] J.A. Long, T.L. Conn, Use of phosphatidylcholine to improve the function of turkey semen stored at 4°C for 24 hours, *Poult. Sci. J.* 91 (2012) 1990–1996. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-02028>.
- [19] V.V. Nguyen, S. Ponchunchoovong, S. Kupittayanant, P. Kupittayanant, Effects of egg yolk and soybean lecithin on sperm quality determined by computer-assisted sperm analysis and confocal laser scanning microscope in chilled canine sperm, *Vet Med Sci.* 5 (2019) 345–360. <https://doi.org/10.1002/vms3.158>.
- [20] A.H. Vidal, A.M. Batista, E.C.B. da Silva, W.A. Gomes, M.A. Pelinca, S.V. Silva, M.M.P. Guerra, Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation, *Small Rumin. Res.* 109 (2013) 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.07.022>.

- [21] G.A. El-Sisy, W.S. El-Nattat, R.I. El-Sheshtawy, A.M. Abo El-Maaty, Substitution of egg yolk with different concentrations of soybean lecithin in tris-based extender during bulls' semen preservability, *Asian Pac. J. Reprod.* 5 (2016) 514–518. <https://doi.org/10.1016/j.apjr.2016.10.011>.
- [22] P.F. Watson, The causes of reduced fertility with cryopreserved semen, *Anim. Reprod. Sci.* 60 (2000) 481–492. [https://doi.org/DOI: 10.1016/s0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/DOI: 10.1016/s0378-4320(00)00099-3).
- [23] S. Kumar, J.D. Millar, P.F. Watson, The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines, *Cryobiology.* 46 (2003) 246–253. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00040-3](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00040-3).
- [24] O. Varisli, H. Scott, C. Agca, Y. Agca, The effects of cooling rates and type of freezing extenders on cryosurvival of rat sperm, *Cryobiology.* 67 (2013) 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.05.009>.
- [25] M. Madeddu, F. Mosca, A. Abdel Sayed, L. Zaniboni, M.G. Mangiagalli, E. Colombo, S. Cerolini, Effect of cooling rate on the survival of cryopreserved rooster sperm: Comparison of different distances in the vapor above the surface of the liquid nitrogen, *Anim. Reprod. Sci.* 171 (2016) 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.05.014>.
- [26] J. Dalal, A. Kumar, R. Dutt, G. Singh, R.K. Chandolia, Different Cooling Rates for Cryopreservation of Semen in Various Livestock Species: A Review, *IJCMAS.* 7 (2018) 1903–1911. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.708.219>.
- [27] A. Santiani, S. Evangelista, N. Sepúlveda, J. Risopatrón, J. Villegas, R. Sánchez, Addition of superoxide dismutase mimics during cooling process prevents oxidative stress and improves semen quality parameters in frozen/thawed ram spermatozoa, *Theriogenology.* 82 (2014) 884–889. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.07.002>.
- [28] P. Gogol, M. Bryła, M. Trzcińska, M. Bochenek, Polish Journal of Veterinary Sciences, *Pol. J. Vet. Sci.* 22 (2019) 177–179. <https://doi.org/10.24425/PJVS.2019.127084>.
- [29] C. Yildiz, N. Law, P. Ottaviani, K. Jarvi, C. McKerlie, Comparison of sperm quality and DNA integrity in mouse sperm exposed to various cooling velocities and osmotic stress, *Theriogenology.* 74 (2010) 1420–1430. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.014>.
- [30] A. Iraj, K. Hamid, N. Hamid, P. Mehdi, M. Hamid, Effect of controlled and uncontrolled cooling rate on motility parameters of cryopreserved ram spermatozoa, *Afr. J. Biotechnol.* 10 (2011) 8965–8969. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1076>.
- [31] M.H. Badii, J. Castillo, M. Rodríguez, A. Wong, P. Villalpando, Diseños experimentales e investigación científica = Experimental designs and scientific research, *UANL.* 4 (2007) 283–330.
- [32] D.C. Montgomery, Design and analysis of experiments, Eighth edition, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, N J, 2013.
- [33] W.J.M. Maas, I.A.M. de Graaf, E.D. Schoen, H.J. Koster, J.J.M. van de Sandt, J.P. Groten, Assessment of Some Critical Factors in the Freezing Technique for the Cryopreservation of Precision-Cut Rat Liver Slices, *Cryobiology.* 40 (2000) 250–263. <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2246>.

- [34] B.L. Metzger, P.A. Jarosz, S. Noureddine, The Effect of a High-Fat Diet and Exercise on the Expression of Genetic Obesity, *West J Nurs Res.* 22 (2000) 736–748. <https://doi.org/10.1177/01939450022044719>.
- [35] R. Shaw, M.F.W. Festing, I. Peers, L. Furlong, Use of Factorial Designs to Optimize Animal Experiments and Reduce Animal Use, *ILAR J.* 43 (2002) 223–232. <https://doi.org/10.1093/ilar.43.4.223>.
- [36] D. Scholtens, A. Miron, F. M. Merchant, A. Miller, P. L. Miron, J. Dirk Iglehart, R. Gentleman, Analyzing factorial designed microarray experiments, *J. Multivar. Anal.* 90 (2004) 19–43. <https://doi.org/10.1016/j.jmva.2004.02.004>.
- [37] C.I.M. Gonzales, E. OBA, S.D. BICUDO, Avaliação do sêmen ovino (*Ovis aries*) congelado em palhetas e “pellets” com diferentes meios diluidores., *CBRA.* 23 (1999) 280–281 *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 23, n. 3, p. 280-281.
- [38] CBRA, Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 3rd ed., Belo Horizonte, MG, 2013.
- [39] L. Rodello, Validação de sistema automatizado de refrigeração e congelação de sêmen, tese, Universidade Estadual Paulista, 2006. https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/98265/rodello_l_me_botfmvz.pdf?sequence=1
- [40] H.C. Azevedo, Integridade e funcionalidade dos espermatozóides ovinos submetidos à criopreservação após a incorporação de colesterol, desmosterol, ácido oléico-linoléico e alfa-lactoalbumina, (2006). <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/105970?locale-attribute=es>.
- [41] R.S. Jeyendran, H.H. Van der Ven, M. Perez-Pelaez, B.G. Crabo, L.J.D. Zaneveld, Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics, *Reproduction.* 70 (1984) 219–228. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0700219>.
- [42] R. Masoudi, M. Sharafi, A. Zareh Shahneh, A. Towhidi, H. Kohram, V. Esmaeili, A. Shahverdi, N.D. Davachi, Fertility and flow cytometry study of frozen-thawed sperm in cryopreservation medium supplemented with soybean lecithin, *Cryobiology.* 73 (2016) 69–72. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.05.010>.
- [43] L. Gillan, G. Evans, W.M.C. Maxwell, Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa, *Reprod. Fertil. Dev.* 9 (1997) 481–488. <https://doi.org/DOI:10.1071/r96046>.
- [44] A.D. Barth, R.J. Oko, Abnormal morphology of bovine spermatozoa, Iowa State University Press, USA, 1989.
- [45] J.O. Wobbrock, L. Findlater, D. Gergle, J.J. Higgins, The aligned rank transform for nonparametric factorial analyses using only anova procedures, in: *Proceedings of the SIGCHI Conference on Human Factors in Computing Systems*, ACM Press, Vancouver, BC, Canada, 2011: pp. 143–146. <https://doi.org/10.1145/1978942.1978963>.
- [46] M. Emamverdi, M. Zhandi, A. Zare Shahneh, M. Sharafi, A. Akbari-Sharif, Optimization of Ram Semen Cryopreservation Using a Chemically Defined Soybean Lecithin-Based Extender, *Reprod. Domest. Anim.* 48 (2013) 899–904. <https://doi.org/10.1111/rda.12183>.

- [47] J. Gil, M. Rodriguez-Irazoqui, N. Lundeheim, L. Söderquist, H. Rodríguez-Martínez, Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for cervical artificial insemination, *Theriogenology*. 59 (2003) 1157–1170. [https://doi.org/DOI: 10.1016/s0093-691x\(02\)01178-0](https://doi.org/DOI: 10.1016/s0093-691x(02)01178-0).
- [48] R. Masoudi, M. Sharafi, A.Z. Shahneh, Effects of CoQ10 on the quality of ram sperm during cryopreservation in plant and animal based extenders, *Anim. Reprod. Sci.* 208 (2019) 106103. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.06.015>.
- [49] A. Najafi, M. Najafi, Z. Zanganeh, M. Sharafi, F. Martinez-Pastor, H. Adeldust, Cryopreservation of Ram Semen in Extenders Containing Soybean Lecithin as Cryoprotectant and Hyaluronic Acid as Antioxidant, *Reprod Dom Anim.* 49 (2014) 934–940. <https://doi.org/10.1111/rda.12405>.
- [50] M. Sharafi, M. Forouzanfar, M. Hajian, S. Ostadhosseini, P. Abedi, N. Nili, In vitro comparison of soybean lecithin based-extender with commercially available extender for ram semen cryopreservation, *Int J Fertil Steril.* 3 (2009) 149–152. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2009.45788>.
- [51] E.I. Khalifa, M.A.M. Abdel-Hafez, Effect of Soybean Lecithin-Based Semen Extender on Freezability and Fertility of Rahmani Ram Spermatozoa, *EJSGS.* 9 (2014) 59–66. <https://doi.org/10.12816/0005054>.
- [52] G. Younan, A. Shehab El-Din, A. Abdel-Khalek, M. El-Sherbieny, A. Helmy, Soybean Lecithin as an Alternative to Egg Yolk in Tris-Based Extender of Cryopreserved Apri Rabbit Semen, *JAPP.* 12 (2021) 47–54. <https://doi.org/10.21608/jappmu.2021.149460>.
- [53] E.A.R. Dias, S.P. Campanholi, G.F. Rossi, C. de P. Freitas Dell'Aqua, J.A. Dell'Aqua, F.O. Papa, M.F. Zorzetto, C.C.P. de Paz, L.Z. Oliveira, M.E.Z. Mercadante, F.M. Monteiro, Evaluation of cooling and freezing systems of bovine semen, *Animal Reproduction Science.* 195 (2018) 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.05.012>.
- [54] J.G. Martínez, S. Pardo C, Effect of freezing and thawing rates on sperm motility in Bocachico *Prochilodus magdalenae* (Pisces, Characiformes), *Rev MVZ Córdoba.* (2013) 3295–3303. <https://doi.org/10.21897/rmvz.191>.
- [55] D.A. Paula, L.D.S. Murgas, T.F.D. Castro, I. Assis, R.V.R. Neto, S. Marcussi, Effects of cooling rates on the quality of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) sperm, *Reprod Dom Anim.* 0 (2019) 1–10. <https://doi.org/10.1111/rda.13459>.
- [56] J.J. Garde, A. del Olmo, A.J. Soler, G. Espeso, M. Gomendio, E.R.S. Roldan, Effect of egg yolk, cryoprotectant, and various sugars on semen cryopreservation in endangered Cuvier's gazelle (*Gazella cuvieri*), *Animal Reproduction Science.* 108 (2008) 384–401. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.09.010>.
- [57] P. Manjunath, A. Bergeron, J. Lefebvre, J. Fan, Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation, *Soc Reprod Fertil Suppl.* 65 (2007) 217–28.
- [58] J.E. Parks, J.K. Graham, Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes, *Theriogenology.* 38 (1992) 209–222. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90231-F](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90231-F).
- [59] M. Anzar, L. He, M.M. Buhr, T.G. Kroetsch, K.P. Pauls, Sperm Apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull Semen Detected by Flow Cytometry and Its Relationship with Fertility, *Biol. Reprod.* 66 (2002) 354–360. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.2.354>.

- [60] P. Peris-Frau, A. Martín-Maestro, M. Iniesta-Cuerda, I. Sánchez-Ajofrín, L. Mateos-Hernández, J.J. Garde, M. Villar, A.J. Soler, Freezing–Thawing Procedures Remodel the Proteome of Ram Sperm before and after In Vitro Capacitation, *IJMS*. 20 (2019) 4596. <https://doi.org/10.3390/ijms20184596>.
- [61] G.P. Byrne, P. Lonergan, M. Wade, P. Duffy, A. Donovan, J.P. Hanrahan, M.P. Boland, Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro, *Anim. Reprod. Sci.* 62 (2000) 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00121-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00121-4).
- [62] K. Müller, Stability of transbilayer phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment, *J Cell Sci.* 112 (1999) 11–20. <https://doi.org/10.1242/jcs.112.1.11>.
- [63] N. Mendoza, A. Casao, J. Domingo, F. Quintín, A. Laviña, E. Fantova, J.Á. Cebrián-Pérez, T. Muiño-Blanco, R. Pérez-Pe, Influence of Non-conventional Sperm Quality Parameters on Field Fertility in Ovine, *Front. Vet. Sci.* 8 (2021) 650572. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.650572>.
- [64] S. Salamon, W.M.C. Maxwell, Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination, *Anim. Reprod. Sci.* 37 (1995) 185–249. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(94\)01327-I](https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)01327-I).
- [65] J. Frim, P. Mazur, Interactions of cooling rate, warming rate, glycerol concentration, and dilution procedure on the viability of frozen-thawed human granulocytes, *Cryobiology*. 20 (1983) 657–676. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(83\)90070-6](https://doi.org/10.1016/0011-2240(83)90070-6).
- [66] P.F. Watson, Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function, *Reprod. Fertil. Dev.* 7 (1995) 871–891. <https://doi.org/DOI: 10.1071/rd9950871>.
- [67] M.R. Curry, J.D. Millar, P.F. Watson, Calculated Optimal Cooling Rates for Ram and Human Sperm Cryopreservation Fail to Conform with Empirical Observations1, *Biol. Reprod.* 51 (1994) 1014–1021. <https://doi.org/10.1095/biolreprod51.5.1014>.
- [68] J. Thundathil, J. Gil, A. Januskauskas, B. Larsson, L. Soderquist, R. Mapletoft, H. Rodriguez-Martinez, Relationship between the proportion of capacitated spermatozoa present in frozen-thawed semen and fertility with artificial insemination, *Int. J. Androl.* 22 (1999) 366–373. <https://doi.org/DOI: 10.1046/j.1365-2605.1999.00194.x>.
- [69] C.C. Sicherle, M.S. Maia, S.D. Bicudo, L. Rodello, H.C. Azevedo, Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox, *Small Rumin. Res.* 95 (2011) 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.10.011>.
- [70] A. Januskauskas, J. Gil, L. Söderquist, M.G.M. Hrd, M.Ch. Hrd, A. Johannisson, H. Rodriguez-Martinez, Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in sweden, *Theriogenology*. 52 (1999) 641–658. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00159-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00159-4).
- [71] L.R. Fraser, Sperm capacitation and the acrosome reaction, *Hum. Reprod.* 13 (1998) 9–19. https://doi.org/10.1093/humrep/13.suppl_1.9.
- [72] I.M. Khan, Z. Cao, H. Liu, A. Khan, S.U. Rahman, M.Z. Khan, A. Sathanawongs, Y. Zhang, Impact of Cryopreservation on Spermatozoa Freeze-Thawed Traits and Relevance

OMICS to Assess Sperm Cryo-Tolerance in Farm Animals, *Front. Vet. Sci.* 8 (2021) 609180. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.609180>.

[73] G. Kadirvel, S. Kumar, A. Kumaresan, P. Kathiravan, Capacitation status of fresh and frozen-thawed buffalo spermatozoa in relation to cholesterol level, membrane fluidity and intracellular calcium, *Anim. Reprod. Sci.* 116 (2009) 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.02.003>.

[74] L.J. Pérez, A. Valcárcel, M.A. de las Heras, D. Moses, H. Baldassarre, Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay, *Theriogenology*. 46 (1996) 131–140. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00148-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00148-3).

[75] H.M. Picton, S.S. Kim, R.G. Gosden, Cryopreservation of gonadal tissue and cells, *British Medical Bulletin*. 56 (2000) 603–615. <https://doi.org/10.1258/0007142001903418>.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Épocas do ano influenciam a qualidade de sêmen de carneiros, sendo afetadas negativamente em ambientes de estresse térmico alto, apresentando relação com índices bioclimáticos, os quais podem ser usados no manejo e monitoramento do estresse ambiental sobre os animais. Adicionalmente o estudo da interação de fatores envolvidos na criopreservação de sêmen ajuda a melhorar a capacidade de resistência dos espermatozoides após a descongelação, com a manutenção estrutural e fisiológica a exemplo da integridade, viabilidade e capacidade de fertilização, acompanhado de boa qualidade cinética dos espermatozoides. Estratégias consequentes podem ser alternativas para futuros estudos na melhoria da reprodução ovina.

7. ANEXOS

7.1 Preparo dos extensores à base de Gema de Ovo e Lecitina de Soja

Meio diluidor (Extensor) à base Glicina-Leite (GL) de Gonzales (1996)

Solução A	
▪ Glicina	1,475g
▪ Citrato de sódio.....	3,125g
▪ Água Mili Q.....	47,37 mL
Solução B	
▪ Frutose	3,157g
▪ Água Mili Q.....	47,37 mL
Solução Mãe	
▪ Solução A+B	94,75 mL
▪ Sulfato de Gentamicina (Gentrin 44 mg/mL-ourofino)	5,25 mL
Extensor Gema de Ovo a 20% (GO-20%)	
▪ Solução Mãe	15 mL
▪ Gema de Ovo	10 mL
▪ <i>Orvus Es Paste</i> (OEP).....	0,20 mL
▪ Leite desnatado (11% - 0,825g)	7,5 mL
▪ Glicerol.....	2,5 mL
▪ Água Mili Q.....	19,8 mL
Total	50 mL

Extensor Lecitina de Soja a 2,0% (LS-2,0%)

▪ Solução Mãe	15 mL
▪ Lecitina de Soja	1,08 g
▪ <i>Orvus Es Paste</i> (OEP).....	0,20 mL
▪ Leite desnatado (11% - 0,825g)	7,5 mL
▪ Glicerol.....	2,5 mL
▪ Água Mili Q.....	24,8 mL
Total	50 mL

Extensor Lecitina de Soja a 1,0% (LS-1,0%)

▪ Solução Mãe	15 mL
▪ Lecitina de Soja	0,54 g
▪ <i>Orvus Es Paste</i> (OEP).....	0,20 mL
▪ Leite desnatado (11% - 0,825g)	7,5 mL
▪ Glicerol.....	2,5 mL
▪ Água Mili Q.....	24,8 mL
Total	50 mL

Extensor Lecitina de Soja a 0,5% (LS-0,5%)

▪ Solução Mãe	15 mL
▪ Lecitina de Soja	0,27 g
▪ <i>Orvus Es Paste</i> (OEP).....	0,20 mL
▪ Leite desnatado (11% - 0,825g)	7,5 mL
▪ Glicerol.....	2,5 mL
▪ Água Mili Q.....	24,8 mL
Total	50 mL

Observações:

1. O leite desnatado, usado na fórmula do diluidor GGL, foi aquecido a 92-95 °C durante 10 minutos a fim de inativar os fatores tóxicos e frações proteicas (Evans e Maxwell, 1990)
2. Os antibióticos da fórmula original do diluidor de GGL de Gonzales (1996) foram substituídos por sulfato de gentamicina (Souza et al., 2006)

7.2 Preparo de soluções para as análises espermáticas pós-descongelção

Solução de X-Cell®

FÓRMULA DO X-Cell®

▪ Glucose Anidra.....	76,6 g
▪ Citrato de Sódio Bi-hidratado	14,3 g
▪ Bicarbonato de Sódio.....	2,6 g
▪ EDTA.....	8,6 g
▪ Cloreto de Potássio	2,5 g
▪ Sulfato de Gentamicina.....	0,4 g

SOLUÇÃO DE X-Cell®

▪ X-Cell22.....	43,4 g
▪ Água Mili Q (qsp)	1000 mL

Obs.: - pH e Osmolaridade dão em torno de 6,89 e 274 mOsm/Kg, respectivamente;
- Armazenar a 5 °C.

Solução Estoque para Clortetraciclina (CTC): Gillan et al. (1997)

▪ Tris.....	0,024 g
▪ NaCl.....	14,3 g
▪ L-Cisteína (Sigma-7352)	2,6 g
▪ Água de Mili-Q	8,6 g

Obs.: - Ajustar o pH 7,8;
- Filtrar em filtro ²⁶ de 0,22 µm e estocar a 4 °C.

Solução de Trabalho de CTC: Gillan et al. (1997)

▪ Solução Estoque de CTC.	1000 µL
▪ CTC (1mM - Sigma-C4881)	0,00075 g*

Obs.: - Preparar diariamente e estocar a 4 °C.

Solução de PBS: Barth & Oko (1989)

SOLUÇÃO ESTOQUE DE NaH₂PO₄

- NaH_2PO_4 (Sigma-S5011)..... 6,1256 g
- Água Mili Q 30 mL

SOLUÇÃO ESTOQUE DE Na_2HPO_4

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4^{24}$ 0,662 g
- Água Mili Q 70 mL

SOLUÇÃO FINAL DE PBS

- Solução Estoque de NaH_2PO_4 30 mL
- Solução Estoque de Na_2HPO_4 70 mL
- NaCl (JT-Baker-3624-19) 0,45 g

Obs.: - pH e osmolaridade próximos a 7,2 e 280 mOsm/kg, respectivamente;
- Armazenar a 5 °C.

Solução de Glutaraldeído a 0,2% (Barth & Oko, 1989)

- Solução de Glutaraldeído a 50% (Vetec – S0805) 0,4 mL
- PBS (qsp) 100 mL

Obs.: Armazenar a 5 °C.

7.3 Setup análise de sêmen- Sperm Class Analyzer (SCA[®] Microptics, S.L. Versão 6.5, Barcelona, Espanha)

Setup análise	
<i>Parâmetros para análises</i>	
Tamanho mínimo da célula espermática	30 μm
Tamanho máximo da célula espermática	70 μm
Estático	VCL <20 $\mu\text{m}/\text{segundo}$
Lento	VCL ≥ 20 a 100 < $\mu\text{m}/\text{segundo}$
Médio	VCL ≥ 100 a 200 < $\mu\text{m}/\text{segundo}$
Rápido	VCL ≥ 200 $\mu\text{m}/\text{segundo}$
Progressivos	STR > 80 %
<i>Captura e análises das amostras</i>	
Câmara	Basler modelo acA1300-200UC
Resolução	1,3 MP
Captura de imagem	203 frames/segundo
Seleção do campo	Manual
Temperatura de análises	37 °C