

CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS E CONGELABILIDADE DO SÊMEN DE CARNEIROS IDEAL-POLWARTH AO LONGO DO ANO¹

Maria Inês Lenz Souza
Sony Dimas Bicudo
Daniel Bartoli de Sousa
Alcides de Amorim Ramos

SOUZA², M.I.L.; BICUDO³, S.D.; SOUSA⁴, D.B.; RAMOS⁵, A.A. Características biológicas e congelabilidade do sêmen de carneiros Ideal-Polwath ao longo do ano. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 6(2): p. 111-118, 2003.

RESUMO: Com o objetivo de investigar a qualidade seminal ao longo do ano, bem como sua congelabilidade e manutenção da viabilidade *in vitro* pós-descongelamento, neste mesmo período, o sêmen de cinco carneiros Ideal-Polwath foi colhido, avaliado em suas características biológicas e congelado mensalmente, durante um ano, usando-se o diluente glicina-gema. Cerca de 30 dias após cada congelamento, submetem-se as amostras ao Teste de Termorresistência, avaliando-se a motilidade, o vigor e a morfologia das células espermáticas. Os resultados obtidos com sêmen fresco (pré-congelamento) e com sêmen congelado/descongelado foram analisados de acordo com as colheitas mensais e, também, agrupados em dois períodos: período I, inverno e outono secos, e período II, primavera e verão chuvosos, utilizando-se a análise de variância com quadrados mínimos e o Teste de Tukey. Os resultados não mostraram influência de meses do ano ou de épocas I e II sobre as características biológicas do sêmen fresco ou sua congelabilidade. Conclui-se que, na latitude de 22° 51' S, o sêmen de carneiros da raça Ideal-Polwath pode ser congelado em qualquer período do ano, com alta qualidade.

PALAVRAS-CHAVE: congelamento, estacionalidade, ovinos, sêmen

BIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND FREEZABILITY OF SEMEN FROM IDEAL-POLWARTH RAMS THROUGHOUT THE YEAR

SOUZA, M.I.L.; BICUDO, S.D.; SOUSA, D.B.; RAMOS, A.A. Biological characteristics and freezability of Ideal-Polwath rams throughout the year. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 6(2): p. 111-118, 2003.

ABSTRACT: The aim of this study was to investigate the semen quality throughout the year and its freezability and viability maintenance *in vitro* post-thaw. Semen from five Ideal-Polwath rams was collected, evaluated in their biological characteristics, and frozen for one year, using glycine-egg yolk extender. Around thirty days after freezing, the samples were submitted to Thermoresistance Test and evaluated for motility, status, and sperm morphology. Results obtained with fresh semen (pre-freezing) and with frozen/thawed semen were evaluated accordingly to monthly collections and grouped into two time periods: Time 1 - dry winter and autumn, and Time 2 - rainy spring and summer. This was performed with the Tukey Test and Analysis of Variance with minimum squares. The results did not show seasonal influence to months or periods 1 or 2 on biological features and semen freezability. The authors conclude that, in the latitude of 22° 51' S, Ideal-Polwath ram semen can be frozen throughout the year with high quality.

KEY-WORDS: freezing, ovine, seasonality, semen

CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS Y CONGELABILIDAD DEL SEMEN DE CARNEROS IDEAL-POLWARTH DURANTE EL AÑO

SOUZA, M.I.L.; BICUDO, S.D.; SOUSA, D.B.; RAMOS, A.A. Características biológicas y congelabilidad del semen de moruecos Ideal-Polwath durante el año. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 6(2): p. 111-118, 2003.

RESUMEN: Con el objetivo de investigar la calidad seminal a lo largo del año, así como su congelabilidad y mantención de la viabilidad *in vitro* después del congelamiento, en este mismo período, el semen de cinco carneros Ideal-Polwath fue colectado, evaluado en sus características biológicas, y congelado mensualmente, durante un año, usando el diluyente glicina-gema. Cerca de 30 días después de cada congelamiento, se sometieron las muestras al Test de Termoresistencia, evaluándose la motilidad, el vigor y la morfología espermáticas. Los resultados obtenidos con el semen fresco (pré-congelado) y con el semen congelado/descongelado se analizaron de acuerdo con las colectas mensales y, también, agrupados en dos períodos: período

¹ Financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – São Paulo – SP - Brasil

² Médica Veterinária, MSc., Dra., Pós-Doutoranda, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, UNESP, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, SP, Brasil. 18618-000, mlenz@zipmail.com.br, autor para correspondência.

³ Médico Veterinário, MSc., Dr., Professor Adjunto, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP.

⁴ Médico Veterinário, MSc., Doutorando, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP.

⁵ Engenheiro Agrônomo, MSc., Dr., Professor Titular, Departamento de Produção e Exploração Animal, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP.

I, invierno y otoño secos, y el período II, primavera y verano lluviosos, utilizando análisis de varianza con cuadrados mínimos y el Test de Tukey. Los resultados no mostraron influencia para meses o para épocas I y II sobre las características biológicas del semen fresco o sobre su congelabilidad. Podemos concluir que, en la latitud de 22° 51' S, el semen de carneros de la raza Ideal-Polwarth puede ser congelado en cualquier período del año, con alta calidad.

PALABRAS-CLAVE: congelabilidad, ovinos, estacionalidad, semen

Introdução

A regulação natural dos fenômenos fisiológicos relacionados à reprodução animal parte de sua adaptação às condições climáticas inerentes ao meio ambiente em que vivem. Em áreas subtropicais, as variações estacionais promovem dois picos nas características seminais de pequenos ruminantes, um na primavera, e outro no outono (MIES FILHO, 1984; EVANS e MAXWELL, 1987; BORQUE e SAGÜÉS, 1993; KARAGIANNIDIS *et al.*, 2000), mantendo as funções testiculares em níveis basais (BREMNER e KRETZER, 1984). Apesar dos ovinos serem considerados animais de atividade reprodutiva estacional, BORQUE e SAGÜÉS (1993) estabeleceram que há grandes variações devidas à influência fotoperiódica e outros fatores, em machos e fêmeas Manchega. Nesta mesma raça, GARDE *et al.* (1993) citaram que a produção de sêmen e a sua qualidade são afetadas pelas estações, com repercussões diretas nos resultados da inseminação artificial. VALENCIA *et al.* (1979) no México, com animais nativos, e GASTEL *et al.* (1995) no Uruguai, com machos Corriedale, não encontraram variações nas características do sêmen de carneiros ao longo do ano. A qualidade dos espermatozoides de ovinos de vários cruzamentos de corte e de lã, estudados por TUTIDA (1997) no Paraná/Brasil foi melhor no verão e na primavera do que no outono e no inverno. Estudando o sêmen de carneiros Ideal ao longo do ano, na latitude 22°51' S, BICUDO (1999) observou a manutenção da atividade reprodutiva destes machos por todo o período estudado, ainda que valores maiores tenham sido verificados nos meses de verão e outono. Carneiros Chios e Frisian avaliados por KARAGIANNIDIS *et al.* (2000), na Grécia, produziram sêmen de melhor qualidade durante o outono, e de pior durante a primavera. Contudo, a magnitude dos efeitos estacionais não foi suficiente para prevenir que os carneiros Chios e Frisian fossem usados para cobertura ao longo do ano. Por outro lado, carneiros das raças Barki e Awassi, considerados pouco estacionais no Egito, foram estudados por TAHA, ABDEL-GAWAD & AYOUB (2000), e ficou evidente a manutenção de sua produção de sêmen ao longo do ano, porém com variações mensais na qualidade deste, que foi melhor no verão. Os autores atribuem este fato à aclimação das raças às condições locais de temperaturas elevadas, resultando em continuada espermatogênese. Raças de ovinos diferem consideravelmente na magnitude das respostas de fotoperíodos estacionais e experimentais. EL-ALAMY, FOOTE & HARE (2001) afirmaram que parte das respostas pode ser devida a um efeito direto da duração do dia aumentada ou diminuída, e parte a um ciclo circannual, o qual dirige um ritmo endógeno algo independente do fotoperíodo. A sobrevivência e a motilidade das células espermáticas após os processos de congelamento/descongelamento depende da manutenção de sua integridade estrutural durante estes processos, o que é influenciado pela taxa de transferência de calor entre o espermatozoide e seu ambiente imediato (MATHUR, JOSHI & RAWAT, 1995; HOLT, 2000; SALAMON & MAXWELL, 2000; WATSON, 2000). Isto

está diretamente relacionado à qualidade do espermatozoide ao início da criopreservação, dependendo do momento do ano (FISER & FAIRFULL, 1986; ALEU, 1992) afetando, principalmente, as membranas acrossomais (QUINN, CHOW & WHITE, 1980; QUINTÍN *et al.*, 1999; HOLT, 2000; SALAMON & MAXWELL, 2000). Na Austrália, o sêmen de carneiros Merino Australiano pode ser congelado durante o ano todo, ao contrário das outras raças que mostram períodos de diferentes qualidades seminais (EVANS & MAXWELL, 1987). O sêmen congelado por ZLATAREV *et al.* (1996) no inverno e primavera proporcionou taxas de fertilidade mais baixas do que aquele congelado no verão e outono, em três anos de observação. De forma semelhante, GARDE *et al.* (1993) observaram este mesmo modelo de fertilidade no sêmen de carneiros Manchega congelado no verão e outono, refletindo-se em um maior percentual de doses congeláveis nestes momentos do ano, em relação ao inverno e primavera.

Quanto à morfologia espermática, MAESO *et al.* (1986) encontraram que o percentual de anormalidades, de carneiros Karakul, em uma latitude de 38°46' N, em um ano de avaliação, foi mais alto durante o período em que os dias foram mais longos. MATTOS, GÜNZEL & NEVES (1984), estudando a influência estacional no sêmen de carneiros Merino Alemão tipo carne, concluíram que o aumento no período luminoso e na temperatura causa um decréscimo no volume, na concentração do sêmen e na motilidade espermáticas, e um aumento no percentual de anormalidades destas células.

Considerando-se as diferentes situações experimentais e respostas animais verificadas na literatura, o presente estudo avaliou a qualidade do sêmen de carneiros Ideal-Polwarth ao longo do ano, e sua congelabilidade e manutenção da viabilidade *in vitro* pós-descongelamento, na latitude 22° 51' S, em Botucatu, SP, Brasil.

Material e Métodos

Cinco carneiros Ideal-Polwarth, com idades entre 4 e 5 anos, previamente submetidos a exames clínicos geral e especial, e comprovadamente aptos sanitária e reprodutivamente, foram mantidos em latitude de 22°51' S e longitude de 48°26' W, na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, em Botucatu, SP, Brasil, em regime de semi-confinamento, sob luminosidade natural, com manejo alimentar em pastagem natural complementada pela administração de 0,5 kg/cabeça/dia de ração concentrada (14% de proteína bruta), e disponibilidade *ad libitum* de mistura mineral e água. A alimentação manteve-se constante ao longo de todo o período experimental, tanto em volumoso, quanto em concentrado. O manejo sanitário quanto a ecto e endoparasitas e a avaliação clínica dos animais foram constantemente monitorados.

O experimento realizou-se de junho de 1995 a maio de 1996, em condições naturais de temperatura, precipitação pluviométrica, umidade relativa e radiação solar, as quais foram monitoradas pelo Departamento de Ciências Ambientais da Faculdade de Agronomia, localizada na Fazenda

Experimental do Lageado, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

Colheu-se, mensalmente, por 12 meses, o sêmen do primeiro ejaculado diário de cada um dos cinco carneiros, usando-se uma vagina artificial modelo curto. Colocava-se o ejaculado colhido em banho-maria a 30°C para a avaliação de suas características biológicas "in natura": volume (em mililitros), motilidade (em percentual), vigor (escala de 0-5), concentração (em número de espermatozoides/mm³, contados em hematocítmetro) e morfologia espermáticas, conforme EVANS & MAXWELL (1987). Para a análise da morfologia espermática, o esfregaço de sêmen foi corado segundo o método de Karras modificado (PAPA *et al.*, 1989) e avaliado ao microscópio óptico quanto à morfologia das células espermáticas, de acordo com a classificação proposta por BLOM (1973). Amostras que apresentassem os requerimentos mínimos descritos para a criopreservação (EVANS & MAXWELL, 1987), respectivamente volume de 0,5 mL, motilidade de 65%, vigor 4, concentração de 3,0x10⁶ espermatozoides/mm³, morfologia com, no máximo, 10% de defeitos maiores e 20% de defeitos menores; foram diluídas em meio glicina-gema (BICUDO, PAPA & TAVARES, 1993).

Para o congelamento, as amostras de sêmen foram diluídas de acordo com a relação volume x concentração x motilidade espermáticas, de modo que a concentração espermática final por dose fosse de 50 milhões de espermatozoides viáveis. A diluição realizou-se em banho-maria a 30°C, em duas etapas de adição do meio; inicialmente, adicionou-se a fração I do diluente (porção sem glicerol) e, imediatamente após, a fração II (porção com glicerol), ambas sob homogeneização lenta. Uma vez diluídas, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL, lacradas com álcool polivinílico, colocadas dentro de invólucros plásticos (30x20x20 cm) insuflados com ar e mantidas em geladeira a 5°C durante 90 minutos (tempo de equilíbrio), em posição horizontal, sobre grades metálicas. Durante os primeiros 60 minutos de resfriamento, os invólucros plásticos permaneceram fechados, enquanto nos 30 minutos finais os mesmos foram abertos. Após este período, as palhetas foram congeladas em vapor de nitrogênio líquido (-79°C) por 20 minutos, em grades metálicas colocadas a 4 cm acima do nível do líquido, em caixa de isopor (30x18x30 cm) e, então, armazenadas em um botijão de nitrogênio líquido a -196°C (GONZALEZ, 1996).

Cerca de 30 dias após o congelamento, descongelaram-se as amostras em água a 38°C por 20 segundos, mantendo-as nesta temperatura por três horas (Teste de Termorresistência conforme FONSECA, VALE FILHO & MIES FILHO, 1992), sendo avaliadas a partir do momento inicial (momento 0 horas), que ocorreu 5 minutos após o descongelamento, seguido de três avaliações a cada 60 minutos (momentos 1 hora, 2 horas e 3 horas), verificando-se a motilidade, o vigor e a morfologia espermáticas (defeitos de acrossoma, células decapitadas e alterações de cauda) em coloração glicerinada de Karras (PAPA *et al.*, 1988), tendo como padrões mínimos de 30% de motilidade progressiva, vigor 3 e total de alterações espermáticas de 30%.

Os resultados obtidos com sêmen fresco (pré-congelamento) e com sêmen congelado/descongelado (Teste de Termorresistência) foram estatisticamente avaliados de

acordo com os meses de colheita e, também, agrupados em dois períodos: Período I – inverno e outono secos, meses de março a agosto, e Período II – primavera e verão chuvosos, meses de setembro a fevereiro. Estes dados estudaram-se pela análise da variância com quadrados mínimos e teste de Tukey a 5% de significância, tendo como modelo o animal e o efeito de meses.

Resultados

As características biológicas do sêmen fresco quanto a volume, motilidade, vigor, concentração e patologias espermáticas (Tabela 1) demonstraram, ao longo dos 12 meses, resultados sempre superiores aos valores mínimos definidos como padrões, sejam eles: volume de 0,5 mL, motilidade de 65%, vigor 4, concentração de 3,0x10⁶ espermatozoides/mm³, morfologia com 10% de defeitos maiores e 20% de defeitos menores (EVANS e MAXWELL, 1987). Ainda assim apresentaram, inicialmente, na análise da variância, alterações significativas entre os meses (p<0,01) de forma diversa, ao longo do ano. O volume seminal manteve-se constante ao longo do ano. A motilidade espermática apresentou-se similar na maioria dos meses, elevando-se um pouco em junho, fevereiro e março, e diminuindo em janeiro, ainda que sem significância estatística. O vigor da célula espermática foi significativamente mais alto nos meses de fevereiro, maio e dezembro (p<0,05), mais baixo em outubro e agosto, ainda que sem diferença (p>0,05), mantendo-se constante nos demais, acompanhando o comportamento da motilidade progressiva. Já a concentração de espermatozoides foi mais alta (p<0,05) no mês de junho, quando comparada aos meses de outubro, maio, dezembro, agosto, julho e setembro, que apresentaram valores significativamente mais baixos (p<0,05), e valores intermediários nos meses restantes, de acordo com o teste de Tukey (Tabela 1). Com relação ao total de células anormais, houve semelhança nos valores obtidos ao longo dos 12 meses. Avaliando-se separadamente as anormalidades espermáticas, os defeitos maiores foram significativamente mais altos (p<0,05) em agosto e mais baixos em março, enquanto os defeitos menores assemelharam-se entre os 12 meses (Tabela 1). Contudo, estes resultados não permitiram definir-se um momento exato de melhor ou pior qualidade seminal. Utilizando-se o teste de Tukey para verificar as possíveis diferenças da análise de variância com maior precisão, as características seminais ao longo dos meses comportaram-se como variáveis independentes, uma vez que não sofreram com a mesma intensidade os efeitos dos meses. Considerando-se que o sêmen é um conjunto de características, não foi possível a comprovação de períodos de melhor ou pior qualidade.

Agrupando-se os meses em dois diferentes períodos ou épocas (I – outono/inverno e II – primavera/verão), mais marcantes nesta latitude e condições climáticas, as características seminais permaneceram constantes ao longo do ano, independentemente do fotoperíodo (Tabela 2). A única característica seminal que variou entre as épocas foi o total de defeitos maiores (p<0,01), a qual também variou entre os animais (p<0,05), demonstrando a influência marcante do indivíduo sobre esta característica.

Tabela 1 - Valores médios das características do sêmen fresco de carneiros Ideal-Polwarth, em Botucatu, SP, Brasil, durante 12 meses (junho/95 a maio/96; n = 5)

Meses	Volume (mL)	Mot.* (%)	Vigor (0-5)	Concentr.** (10 ⁶ /mm ³)	Defeitos	
					maiores (%)	menores (%)
JUN	1,10	89,0 ^a	4,8 ^{ab}	3,826 ^a	3,0 ^{cd}	13,8
JUL	1,12	86,0 ^{ab}	4,2 ^{ab}	3,264 ^b	9,6 ^{abc}	7,4
AGO	1,12	77,0 ^{bc}	4,0 ^b	3,294 ^b	10,8 ^a	4,8
SET	0,96	86,0 ^{ab}	4,4 ^{ab}	3,168 ^b	9,8 ^{abc}	5,8
OUT	1,04	86,0 ^{ab}	4,0 ^b	3,372 ^b	10,2 ^{ab}	7,8
NOV	1,04	86,0 ^{ab}	4,6 ^{ab}	3,442 ^{ab}	3,6 ^{cd}	8,8
DEZ	0,96	88,0 ^a	5,0 ^a	3,350 ^b	5,6 ^{abcd}	16,4
JAN	1,04	74,0 ^c	4,6 ^{ab}	3,542 ^{ab}	3,8 ^{bcd}	13,8
FEV	1,00	87,0 ^a	5,0 ^a	3,446 ^{ab}	4,6 ^{abcd}	11,8
MAR	1,00	87,0 ^a	4,8 ^{ab}	3,462 ^{ab}	2,6 ^d	18,8
ABR	0,96	80,0 ^{abc}	4,2 ^{ab}	3,398 ^{ab}	5,6 ^{abcd}	20,2
MAI	0,96	86,0 ^{ab}	5,0 ^a	3,370 ^b	8,6 ^{abcd}	18,6
média	1,02	84,33	4,55	3,41	6,48	12,33
EP	0,78	4,19	0,39	0,20	3,12	8,38

Letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatísticas pelo Teste de Tukey (p<0,05); EP= erro padrão. * Mot. = motilidade; **Concentr. = concentração.

Tabela 2 - Valores médios das características seminais de carneiros Ideal-Polwarth em duas estações do ano, inverno e outono secos (época I; n=30) e primavera e verão chuvosos (época II; n=30) e suas médias durante o ano todo (n=60)

VARIÁVEL	ÉPOCA I		ÉPOCA II		GERAL	
	(média	EP)	(média	EP)	(média	EP)
VOLUME (mL)	1,04	0,02	1,01	0,02	1,02	0,78
MOTILIDADE (%)	84,00	1,13	84,66	1,13	84,33	4,19
VIGOR (0-5)	4,43	0,09	4,67	0,09	4,55	0,39
CONCENTRAÇÃO (x 10 ⁶ /mm ³)	3,39	0,04	3,43	0,04	3,41	0,20
DEFEITOS MAIORES (%)	7,90	0,73**	5,07	0,73	6,48	3,12
DEFEITOS MENORES (%)	11,77	1,72	12,90	1,72	12,33	8,38
TOTAL ANORMALIDADES (%)	19,73	1,62	17,97	1,62	18,85	8,35

**p<0,01; EP = erro padrão

Estudando-se a análise da variância do sêmen congelado/descongelado, avaliado em Teste de Termorresistência, considerando-se os diferentes meses do ano, não houve diferença significativa entre nenhuma das características em relação aos animais, exceto para defeitos de acrossoma nos momentos 0 (p<0,05) e 1 hora (p<0,001). Por outro lado, para os diferentes meses do ano, a análise da variância mostrou uma ampla variação entre as características seminais, ao longo dos 12 meses, nos vários momentos do Teste de Termorresistência (Tabela 3): motilidade em 0 e 1 hora

(p<0,05); vigor em 0, 1, 2, e 3 horas (p<0,0001); número total de espermatozoides normais em 1, 2, e 3 horas (p<0,0001); defeitos de acrossoma em 0, 1, 2, e 3 horas (p<0,0001); e defeitos de cauda em 1, 2, e 3 horas (p<0,0001). A análise dos dois períodos do ano não evidenciou variação significativa em nenhum deles (Tabela 3). O número total de células normais não variou durante os meses (p>0,05), em contraste com o número total de células com defeitos de acrossoma, que diferiu em todos os momentos (p<0,01) e o número total de células com defeitos de cauda que variou em 1, 2, e 3 horas (p<0,01).

Tabela 3 - Valores médios das características do sêmen de carneiros Ideal-Polwarth, congelado/descongelado, avaliado pelo Teste de Termorresistência em quatro momentos (0, 1, 2 e 3 horas), mensalmente, durante um ano (n =5)

VARIÁVEIS	MOMENTOS (médias anuais)									
	PRÉ-CONG.		0h		1h		2h		3h	
	(média	EP)	(média	EP)	(média	EP)	(média	EP)	(média	EP)
MOTILIDADE (%)	84,33	5,93	71,92	14,20	66,67	14,75	57,75	15,25	45,92	17,84
VIGOR (0-5)	4,55	0,50	4,92	0,28	4,78	0,45	4,47	0,62	4,12	0,76
NORMAIS (%)	80,98	9,72	84,58	9,16	85,63	8,88	84,63	8,93	84,72	9,16
DEFEITOS DE ACROSSOMA (%)	3,02	1,57	3,73	2,12	4,73	2,58	4,22	2,36*	4,18	2,38*
DECAPITADOS (%)	2,68	1,67	2,58	4,86	2,28	3,76	2,13	3,24	1,57	2,09
DEFEITOS DE CAUDA (%)	8,42	6,24	9,12	7,43	7,35	6,71	9,00	7,00	9,60	7,90

*p<0,05 nas linhas; PRÉ-CONG. = pré-congelamento; EP = erro padrão

No entanto, ao utilizar-se o teste de Tukey para testar as diferenças obtidas na análise da variância, estas variações mostraram-se aleatórias ao longo do ano, sem definição de um momento de melhor ou pior qualidade do sêmen. A motilidade apresentou-se semelhante entre os meses em todos os momentos do Teste de Termorresistência ($p>0,05$),

enquanto o vigor espermático revelou-se mais baixo no mês de março e similar nos demais meses em três momentos (0, 1 e 2 horas); no momento 3 horas, foi maior em outubro e setembro e menor em março, abril e julho (Tabela 4). A motilidade e o vigor, como esperado, declinaram linearmente durante as três horas de incubação (Figura 1) mas, ainda assim, sem haver diferença estatística entre elas.

Tabela 4 - Valores médios das características do sêmen (motilidade - % e vigor – escala de 0-5) de carneiros Ideal-Polwarth, congelado/descongelado ao longo de 12 meses, com relação ao Teste de Termorresistência a 37°C em 4 momentos (0, 1, 2, 3 horas; n = 5)

Meses	Momentos							
	0h		1h		2h		3h	
	Mot.	Vigor	Mot.	Vigor	Mot.	Vigor	Mot.	Vigor
JUN	66,0	5,0 ^a	59,0	4,8 ^{ab}	57,0	4,8 ^a	40,0	3,8 ^{ab}
JUL	62,0	5,0 ^a	58,0	4,8 ^{ab}	54,0	4,6 ^{ab}	36,0	3,4 ^b
AGO	63,0	5,0 ^a	60,0	5,0 ^a	49,0	4,8 ^a	36,0	4,6 ^{ab}
SET	72,0	5,0 ^a	69,0	5,0 ^a	65,0	5,0 ^a	55,0	5,0 ^a
OUT	85,0	5,0 ^a	81,0	5,0 ^a	71,0	5,0 ^a	61,0	5,0 ^a
NOV	62,0	5,0 ^a	57,0	5,0 ^a	49,0	5,0 ^a	34,0	4,4 ^{ab}
DEZ	76,0	5,0 ^a	65,0	5,0 ^a	54,0	4,2 ^{ab}	45,0	3,8 ^{ab}
JAN	85,0	5,0 ^a	79,0	5,0 ^a	62,0	4,2 ^{ab}	53,0	4,2 ^{ab}
FEV	76,0	5,0 ^a	67,0	4,6 ^{ab}	54,0	4,2 ^{ab}	46,0	4,0 ^{ab}
MAR	62,0	4,4 ^b	59,0	4,0 ^{ab}	51,0	3,6 ^b	40,0	3,6 ^b
ABR	81,0	4,8 ^{ab}	75,0	4,6 ^{ab}	63,0	4,0 ^{ab}	49,0	3,6 ^b
MAI	73,0	4,8 ^{ab}	71,1	4,6 ^{ab}	64,0	4,2 ^{ab}	56,0	4,0 ^{ab}
média	71,9	4,9	66,7	4,8	57,7	4,5	45,9	4,1
DP	14,2	0,3	14,7	0,4	15,2	0,6	17,8	0,8

Letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatísticas pelo Teste de Tukey ($p<0,05$); DP = desvio padrão. Mot. = motilidade.

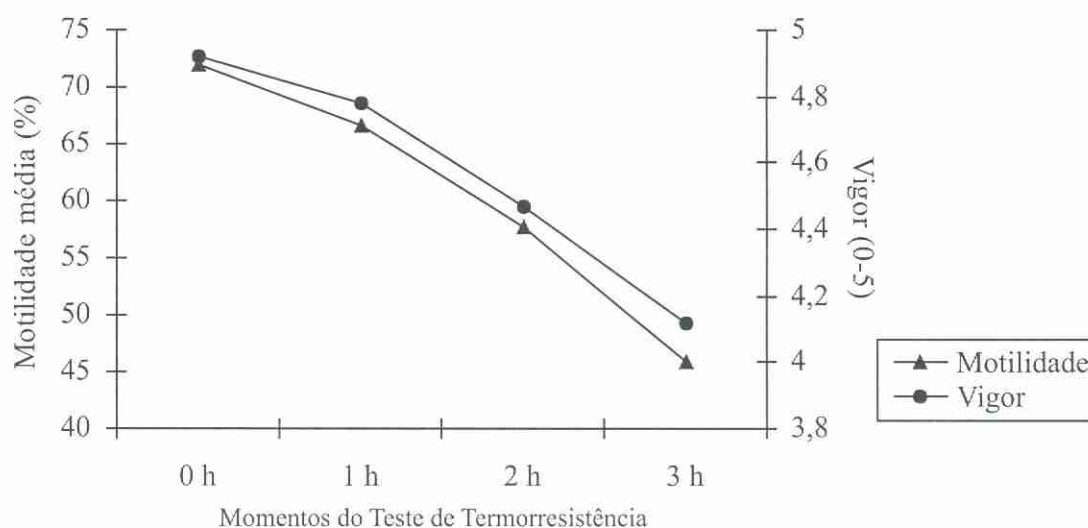


Figura 1 - Valores médios da motilidade (%) e do vigor (escala de 0-5) espermáticos pós-descongelamento do sêmen de carneiros Ideal-Polwarth, congelado ao longo de 12 meses, com relação ao Teste de Termorresistência (momentos 0, 1, 2, 3 horas).

O número de células normais demonstrou ser semelhante entre os meses no momento 0 horas, oscilando nos demais momentos ao longo dos diferentes meses. Os defeitos de acrossoma e de cauda e as células decapitadas também variaram aleatoriamente durante o ano e em todos os momentos sem, no entanto, permitirem o estabelecimento de um ritmo circanual em suas variações.

Discussão

As alterações significativas entre os meses para as características biológicas do sêmen fresco (volume, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermáticas) diferiram ao longo do ano, de forma semelhante aos achados de MIES FILHO (1984), EVANS e MAXWELL (1987), BORQUE & SAGÜÉS (1993), GARDE *et al.* (1993), ZLATAREV *et al.* (1996),

e KARAGIANNIDIS *et al.* (2000), mas evidenciando, ainda, a manutenção da função testicular mostrada por BREMNER & KRETZER (1984), BICUDO (1999) e TAHA, ABDEL-GAWAD & AYOUB (2000), e garantindo a utilização destes animais em processos de manejo reprodutivo (KARAGIANNIDIS *et al.*, 2000). A análise das variações mensais entre as características do sêmen não permitiu a identificação de um ou mais meses com melhor ou pior qualidade dos ejaculados, devido à variabilidade destas características ao longo dos 12 meses avaliados. Não foi possível detectar-se a razão para as variações demonstradas pela análise da variância destas características, de forma similar aos resultados de VALENCIA *et al.* (1979) no México, em cuja latitude as variações fotoperiódicas são menos intensas, e também por GASTEL *et al.* (1995) no Uruguai, onde o efeito da latitude é mais intenso, com certas flutuações estacionais nas características seminais, as quais também não foram significativas. Isto, provavelmente, relaciona-se ao fato de que, como justificam EL-ALAMY, FOOTE & HARE (2001), parte das respostas pode ser devida a um efeito direto da luminosidade diária (aumentada ou diminuída) e, parte, a um ciclo circanual, o qual comanda um ritmo endógeno não totalmente ligado ao fotoperíodo. Outro fator importante a considerar-se na resposta fotoperiódica é a característica intrínseca e individual dos animais, neste ritmo endógeno de sensibilidade à luz.

Durante os meses que compreendem a estação considerada de menor atividade reprodutiva (primavera e verão), apesar das citações de que haveria um decréscimo na eficiência da espermatogênese e na produção diária de espermatozoides (MIES FILHO, 1984; WATSON, 2000), a qualidade e a quantidade seminais mantiveram-se nos mesmos níveis, como já haviam verificado GASTEL *et al.* (1995).

As características seminais foram constantes através do ano, independentemente do fotoperíodo, mesmo quando agruparam-se os meses em dois períodos (I e II), mais marcantes nesta latitude, corroborando com os dados de GASTEL *et al.* (1995), com machos Corriedale no Uruguai e de BICUDO (1999) em animais Ideal em São Paulo. Por outro lado, discordam daqueles resultados de MATTOS, GÜNZEL & NEVES (1984), ao utilizarem carneiros Merino Alemão tipo carne, e de GARDE *et al.* (1993) com carneiros Manchega na Espanha, os quais encontraram uma redução no volume, na concentração e na motilidade seminais com o fotoperíodo crescente em diferentes latitudes. Ainda discordantes aos resultados do presente trabalho, estão os achados de TUTIDA (1997) no Paraná, que obteve sêmen com melhores resultados no verão, de KARAGIANNIDIS *et al.* (2000) na Grécia, com o melhor sêmen no outono, e de TAHA, ABDEL-GAWAD e AYOUB (2000) no Egito, em que o sêmen teve melhor qualidade no verão, demonstrando adaptação às altas temperaturas locais. MAESO *et al.* (1986), com carneiros Karakul, e MATTOS, GÜNZEL & NEVES (1984) com machos Merino Alemão tipo carne mostraram que o aumento no fotoperíodo leva a uma elevação no percentual de anormalidades espermáticas, aqui demonstrada nos resultados dos defeitos maiores, que variaram entre os meses e os animais, indicando uma grande influência individual nesta característica ao longo do período de estudo. LINCOLN, LINCOLN & McNEILLY (1990) já afirmavam que os carneiros oriundos de raças equatoriais, como a Merino (envolvida na origem da raça Ideal-Polwarth), têm um ciclo estacional menos

definido na atividade testicular e no comportamento reprodutivo, em que a influência do fotoperíodo é sobrepujada pela modificação estacional da nutrição ou de outros fatores, até mesmo individuais. Outros autores (VALENCIA *et al.*, 1979; BORQUE & SAGÜÉS, 1993) também corroboram as afirmações. A raça Ideal-Polwarth, proveniente do cruzamento entre as raças Merino e Lincoln, conserva, provavelmente, esta característica de origem, atuando no seu ritmo endógeno de sensibilidade à luz, o qual sofre, também, o efeito da refratariedade, com uma fase sensível à luz e outra em que esta sensibilidade é baixa (LINCOLN, LINCOLN & McNEILLY, 1990). EVANS & MAXWELL (1987) também verificaram esta pouca influência fotoperiódica da raça Merino, congelando sêmen de carneiros desta raça durante todo o ano, sem alterações marcantes.

Como verificado pelos resultados de vários experimentos (QUINN, CHOW & WHITE, 1980; FISER & FAIRFULL, 1986; ALEU, 1992; QUINTÍN *et al.*, 1999; HOLT, 2000; SALAMON & MAXWELL, 2000; WATSON, 2000) as membranas do acrossoma são as mais afetadas pela criopreservação, e isto também pode ser observado no Teste de Termorresistência, em que a única característica do sêmen congelado/descongelado afetada foi o percentual de defeitos de acrossoma, indicando claramente a sensibilidade desta membrana aos processos criobiológicos. FISER & FAIRFULL (1986) também mencionaram que a duração do período de luz do dia afeta a qualidade do sêmen fresco mais do que sua congelabilidade. A avaliação de ambos os períodos do ano não mostrou variação significativa de nenhuma das características, discordando de BORQUE & SAGÜÉS (1993) e GARDE *et al.* (1993) ao utilizarem carneiros Manchega. Como esperado, a motilidade e o vigor declinaram linearmente durante as três horas de incubação, mas não mostraram diferenças estatísticas significativas.

Nesta latitude de 22°51'S, não foi possível separar, para carneiros Ideal-Polwarth, entre os meses do ano, aqueles mais ou menos favoráveis para as características seminais e sua capacidade de resistir aos procedimentos de congelamento/descongelamento e termorresistência, como definido na literatura em diferentes latitudes (MATTOS, GÜNZEL & NEVES, 1984; EVANS & MAXWELL, 1987; GARDE *et al.*, 1993; ZLATAREV *et al.*, 1996; KARAGIANNIDIS *et al.*, 2000). Isto porque os animais produziram ejaculados de excelente qualidade ao longo de todo o ano, com as células espermáticas resistindo satisfatoriamente aos procedimentos de criopreservação e termorresistência, proporcionando um material seminal apto à utilização no manejo reprodutivo.

Conclusões

Estes resultados levam a concluir que, nas condições locais de latitude de 22°51'S, em Botucatu - SP - Brasil, carneiros Ideal-Polwarth apresentam sêmen de boa qualidade ao longo do ano, o que permite o congelamento do mesmo com resultados pós-descongelamento satisfatórios após análises *in vitro*.

Referências

ALEU, J.R. Variaciones estacionales de la congelabilidad del semen caprino. In: JORNADAS INTERNACIONALES DE REPRODUCCIÓN ANIMAL E INSEMINACIÓN ARTIFICIAL, 6, Salamanca, 1992. *Libro de comunicaciones...* Salamanca: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1992. p.336-41, 1992.

- BICUDO, S.D. *Estudo da estacionalidade reprodutiva em carneiros Ideal: níveis séricos de testosterona, androstenediona, triiodotironina, tiroxina; biometria testicular; avaliação das características do sêmen e de parâmetros indicativos de adaptação ao clima.* Botucatu, 1999. 107f. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- BICUDO, S.D., PAPA, F.O., TAVARES, C.V.N. Glicina-Gema: proposta de um novo diluidor para congelamento de sêmen bovino. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 5, Santarem, 1993. *Anais...* Santarem: Sociedade Portuguesa de Reprodução Animal, 1993, p. 171-179.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nodical Veterinaria Medical*, Berlin, v.25, n.1, mar. p.383-91, 1973.
- BORQUE, C.I.M., SAGÜÉS, A.N. Influencia de la estacion del año en las concentraciones de testosterona plasmática y en la composición bioquímica del eyaculado en moruecos de raza Manchega. In: JORNADAS SOBRE PRODUCCION ANIMAL, 5, Zaragoza, *Anais...* Zaragoza: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentacion, v.2, 1993, p. 468-469.
- BREMNER, W.J., KRETSER, D.M. A study of the reproductive performance of mature Romney and Merino rams throughout the year. In: LINDSAY, D.R., PEARCE, D.T. *Reproduction in Sheep*. Cambridge: Cambridge University, 1984. p.16-9.
- EL-ALAMY, M.A., FOOTE, R.H., HARE, E. Sperm output and hormone concentrations in finn and dorset rams exposed to long- and short-day lighting. *Theriogenology*, New York, v.56, n.5, p.839-854, sep. 2001.
- EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. *Salamon's artificial insemination of sheep and goats*. Sydney: Butterworths, 1987.
- FISER, P.S., FAIRFULL, R.W. The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Criobiology*, York, v.23, n.6, p.518-524, aug. 1986.
- FONSECA, V.O., VALE FILHO, V.R., MIES FILHO, A. *Procedimentos para o exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. Belo Horizonte, 1992. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 79p.
- GARDE, J., ARTIGA, C.G., GUZMÁN, D.M.P., AGUADO, M.J., ANGULO, C., MONTORO, V., VÁSQUEZ, I. Influencia de las variaciones estacionales de la calidad seminal sobre el rendimiento de la técnica de congelacion en el semen de morueco da raza Manchega: Resultados preliminares. In: JORNADAS SOBRE PRODUCCION ANIMAL, 5, Zaragoza, *Anais...* Zaragoza: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentacion, v.2, 1993, p. 465-467.
- GASTEL, T., BIELLI, A., PÉREZ, R., LOPEZ, A., CASTRILLEJO, A., TAGLE, R., FRANCO, J., LABORDE, D., FORSBERG, M., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Seasonal variations in testicular morphology in Uruguayan Corriedale rams. *Animal Reproduction Science*, New York, v. 40, n.1/2, p.59-75, oct. 1995.
- GONZALEZ, C.I.M. *Avaliação "in vitro" e "in vivo" de sêmen ovinos (Ovis aries) congelado em palhetas e "pellets" com diferentes diluidores.* Botucatu, 1996. 135f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, New York, v.62, n.1/3, p.3-22, aug. 2000.
- KARAGIANNIDIS, A., VARSAKELI, S., ALEXOPOULOS, C., AMARANTIDIS, I. Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Frisian rams in Greece. *Small Ruminant Research*, Lennoxville, v.37, n.1/2, p.125-130, jul. 2000.
- LINCOLN, G.A., LINCOLN, C.E., McNEILLY, A.S. Seasonal cycles in the blood plasma concentration of FSH, inhibin and testosterone, and testicular size in rams of wild, feral and domesticated breeds of sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, v.88, n.5, p.623-33, sep. 1990.
- MAESO, E.V., ABASCAL, C.G., LASALA, J.R.P., CANTERO, C.C. Evolucion estacional del diametro testicular en el ovino Karakul: repercusion sobre el comportamiento copulatorio y características seminales. In: JORNADAS CIENTIFICAS DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE OVINOTECNIA Y CAPRINOTECNIA, 11, Palencia. *Actas...* Palencia: Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, 1986, p. 132-149.
- MATHUR, A.K., JOSHI, A., RAWAT, P.S. Effect of volumes of thawing medium on post-thaw motility of ram spermatozoa. *Indian Journal Animal Science*, New Delhi, v.63, n.4, p.426-427, jul. 1995.
- MATTOS, R.C., GÜNZEL, A.R., NEVES, J.P. Influências sazonais sobre o sêmen de carneiros da raça Merino Alemão tipo carne, dando especial ênfase à patologia de acrossoma. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.8, n.1, p.47-56, mar. 1984.
- MIES FILHO, A. Fatores climáticos em reprodução ovina. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 5, 1983, Belo Horizonte. *Anais...* Campinas: Fundação Cargill, 1984. p.37-44.
- PAPA, F.O., BICUDO, S.D., MOREIRA, A.F., CAMPOS FILHO, E.P. Método de coloração espermática na avaliação de sêmen descongelado. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.41, supl.1, p.228, aug. 1989.
- PAPA, F.O., BICUDO, S.D., ALVARENGA, M.A., RAMIRES, P.R.N., CARVALHO, I.M., LOPES, M.D. Coloração espermática segundo KARRAS, modificada pelo emprego do Barbatimão (*Stryphinodendrum barbatimam*). *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária*, Belo Horizonte, v. 40, n.2, p. 115-23, may. 1988.
- QUINN, P., CHOW, P.Y.W., WHITE, I.G. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, v.60, n.3, p.403-407, apr. 1980.
- QUINTÍN, F.J., SEVILLA, E., VIJIL, E. PASTOR, F. Efecto del tipo de diluyente de congelacion sobre las características seminales ovinas. *ITEA*, Zaragoza, v.20, n.2, p.618-620, mar. 1999.
- SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, New York, v.62, n.1/3, p.77-111, aug. 2000.
- TAHA, T.A., ABDEL-GAWAD, E.I., AYOUB, M.A. Monthly variations in some reproductive parameters of Barki and Awassi ram throughout 1 year under subtropical conditions. 1. Semen characteristics and hormonal levels. *Animal Science*, Neston, v.71, n.2, p.317-324, oct. 2000.
- TUTIDA, L. *Influência das estações do ano na temperatura retal, frequência respiratória e características seminais de carneiros.* Maringá, 1997, 67f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá.
- VALENCIA, J., BARRÓN, G., FERNANDEZ-BACA, S. Variaciones estacionales del semen de carnero en Mexico. *Veterinaria México*, Ciudad del Mexico, v.10, n.3, p.15-16, may. 1979.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, New York, v.60/61, special issue, p.481-492, jul. 2000.

ZLATAREV, S.T., MITEVA, K., KICHEVA, M., PIRONCHEVA, G. The influence of season on some biological properties of ram spermatozoa and on the possibilities to prognosticate their fertility rate. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 13, Sydney. *Proceedings...* Sydney: ICAR, 1996, v. 2, p. P1-3.

Recebido para publicação em 23/09/2002.

Received for publication on 23 September 2002.

Recibido para publicación en 23/09/2002.

Aceito para publicação em 10/12/2002.

Accepted for publication on 10 December 2002.

Acepto para publicación en 10/12/2002.