



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA**

YAGO CAVALCANTE ACIOLY

**Experiências na área da biotecnologia da reprodução animal no Núcleo
Integrado de Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará**

**FORTALEZA
2016**

YAGO CAVALCANTE ACIOLY

Experiências na área da biotecnologia da reprodução animal no Núcleo Integrado de Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará

Relatório apresentado à
Coordenação do Curso de Zootecnia do
Centro de Ciências Agrárias da
Universidade Federal do Ceará, como parte
das exigências da disciplina Estágio
Curricular Obrigatório.

Orientadores:

Profa. Dra. Carla Renata Figueiredo
Gadelha

Prof. Dra. Lúcia Daniel Machado
da Silva

FORTALEZA
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

A155e Acioly, Yago Cavalcante.

Experiências na área da biotecnologia da reprodução animal no Núcleo Integrado de Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará / Yago Cavalcante Acioly. – 2016.
40 f.. il.

Relatório (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Curso de Zootecnia, Fortaleza, 2016.

Orientação: Profa. Dra. Carla Renata Figueiredo Gadelha.

1. Reprodução animal. 2. Glicerol. 3. Motilidade total. I. Título.

CDD 636.08

YAGO CAVALCANTE ACIOLY

EXPERIÊNCIAS NA ÁREA DA BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO ANIMAL NO
NÚCLEO INTEGRADO DE BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO
CEARÁ

Relatório apresentado à Coordenação do Curso de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como parte das exigências da disciplina Estágio Curricular Obrigatório.

Aprovada em: 20/01/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Carla Renata Figueiredo Gadelha (Orientadora pedagógica)
Universidade Federal do Ceará

Prof.^a Dra. Ana Cláudia Nascimento Campos (Conselheira)
Universidade Federal do Ceará

Dr. Mauricio Fraga van Tilburg (Conselheiro)
Universidade Estadual do Ceará

Dedico a minha família que acreditou em mim, que me ajudou e me incentivou a alcançar meus objetivos, são eles: meus pais (José Acioly Neto e Ângela Maria Cavalcante Alexandre Acioly) e meu irmão (Yvens Cavalcante Acioly).

“O ser humano vivência a si mesmo, seus pensamentos como algo separado do resto do universo - numa espécie de ilusão de ótica de sua consciência. E essa ilusão é uma espécie de prisão que nos restringe a nossos desejos pessoais, conceitos e ao afeto por pessoas mais próximas. Nossa principal tarefa é a de nos livrarmos dessa prisão, ampliando o nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Ninguém conseguirá alcançar completamente esse objetivo, mas lutar pela sua realização já é por si só parte de nossa liberação e o alicerce de nossa segurança interior.” (Albert Einstein).

RESUMO

Em baixas temperaturas o uso de diluentes é essencial para a preservação dos espermatozoides. No entanto, a concentração de alguns diluentes ou até mesmo a forma de serem inseridos juntos ao sêmen podem ter seu poder crioprotetor reduzido. Com o intuito de avaliar a qualidade do sêmen de ovino com TRIS-gema de ovo-glicerol, foram utilizados os ejaculados de 3 reprodutores ovinos. Foi ainda comparado à qualidade do sêmen fresco e descongelado com outro tratamento em *Two step*. Foram utilizados três reprodutores ovinos. O sêmen foi separado em duas alíquotas iguais e diluídas nos tratamentos *One step* (T1) e *Two step* (T2), em seguida avaliados, e posteriormente submetidos a uma curva de refrigeração. No tratamento T2, após a curva, era realizada a glicerolização, sendo aplicada TRIS + 20% de gema de ovo + 14% glicerol dividida em 3 frações com intervalos de 10min cada. As amostras eram envasadas e congeladas, a temperatura de aproximadamente -196°C. Após 15 minutos foram descongeladas e feita a última avaliação. As variáveis foram submetidas ao teste T pareado de comparação de pares de médias. O nível de significância estatística foi estabelecido em $P < 0,05$. Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão. Demonstrou-se que a congelação em *One Step* manteve os parâmetros de qualidade seminal, quanto à motilidade total e a motilidade progressiva, comparada a congelação em *Two step*, nas avaliações do sêmen fresco e descongelado. Em conclusão, nossos resultados demonstraram que a congelação em *One step* pode ser efetuada no lugar da congelação em *Two step* quando consideramos somente a motilidade total e motilidade progressiva dos espermatozoides.

Palavras-chave: Glicerol, motilidade total, motilidade progressiva, congelamento.

LISTA DE SIGLAS E SIMBOLOS

UFC	Universidade Federal do Ceará
NIB	Núcleo Integrado de Biotecnologia
FAVET	Faculdade de Veterinária
LRC	Laboratório de Reprodução de Carnívoros
LTSCO	Laboratório de Tecnologia do Sêmen de Caprinos e Ovinos
LBRP	Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Peixes
HISTOVESP	Laboratório de Histologia de Efeitos Causados por Veneno de Serpentes e Plantas
GL	Glicerol
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
mL	Mililitro
mm ³	Milímetro cúbico
cm ³	Centímetro cúbico
pH	Potencial Hidrogeniônico
TG	TRIS-Gema
LG	Leite-Gema
TGL	TRIS-Gema-Leite
DMSO	Dimetil-Sulfóxido
EG	Dimetil-Formamida, o Etilenoglicol
PRHO	Propanodiol
N ₂	Nitrogênio líquido
μL	Microlitro
FA	TRIS + 20% de gema de ovo
FB	TRIS + 20% de gema de ovo + 14% glicerol

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Média e desvio padrão do percentual de motilidade total e progressiva de sêmen ovino fresco e descongelado diluídos nos tratamentos T1 e T234

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Valores preconizados pelo CBRA (1998) para análise do sêmen ovino..

.....21

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Passo a passo da técnica de flutuação em gatos domésticos	15
FIGURA 2 - Epidídimo de gato doméstico após dissecação	16
FIGURA 3 - Revisão da aula de endocrinologia no quadro	16
FIGURA 4 - Limpeza e despescas do tanque de tabaquis na UFC	17
FIGURA 5 - Coleta de caprino utilizando a vagina artificial	18
FIGURA 6 - Hiperplasia prostática epitelial	18
FIGURA 7 - Mostrando os componentes do TRIS diluidor	29
FIGURA 8 - Gema de ovo usada no diluidor	29
FIGURA 9 - Glicerol sendo introduzido no diluidor	30
FIGURA 10 - Vagina artificial	31
FIGURA 11 - Caixa térmica com as amostras para a refrigeração	32

SUMÁRIO

I. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO	16
II. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES	17
1. RECUPERAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EPIDÍDIMARIOS	17
2. AULAS DE FISIOLOGIA E REPRODUÇÃO ANIMAL	18
3. DESPESCA DOS TAMBAQUIS	19
4. COLETAS E ANÁLISES DE SÊMEN DE OVINOS E CAPRINOS	19
5. ANÁLISE DE LÂMINAS DE PROSTATAS CANINAS	20
III. CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO EM <i>ONE STEP</i>	21
1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1. O SÊMEN OVINO	23
2.2. AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA CONVENCIONAL	23
2.2.1. Volume.....	24
2.2.2. Turbilhonamento.....	24
2.2.3. Motilidade espermática.....	24
2.2.4. Concentração espermática.....	25
2.2.5. Viabilidade	25
2.2.6. Morfologia	25
2.3. DILUENTES SEMINAIS.....	25
2.3.1. TRIS (Tris-hidroximetil-aminometano).....	26
2.3.2. Gema de ovo	26
2.3.3. Glicerol.....	27
2.4. REFRIGERAÇÃO SEMINAL	27
2.5. CONGELAÇÃO SEMINAL	28

2.6.	DESCONGELAMENTO SEMINAL.....	28
3.	OBJETIVO	30
3.1.	GERAL.....	30
3.2.	ESPECÍFICO.....	30
4.	MATERIAS E MÉTODOS	31
4.1.	LOCAL DO EXPERIMENTO.....	31
4.2.	PREPARAÇÃO DOS DILUENTES.....	31
4.3.	COLETAS, AVALIAÇÃO E REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN OVINO 32	
4.4.	ENVAZE, CONGELAMENTO DO SÊMEN E DESCONGELAMENTO.....	34
4.5.	AVALIAÇÃO SEMINAL.....	34
4.6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6.	CONCLUSÃO.....	37

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, no qual em tudo me guia e em tudo confio a Ele para estar à frente da minha vida, me dando força para conquistar meus objetivos.

Aos meus Pais, José Acioly Neto e Ângela Maria Cavalcante Alexandre Acioly, que me apoiaram, financiaram e me ajudaram em tudo na minha caminhada até esse dia, sou grato a eles em tudo.

Meu irmão Yvens Cavalcante Acioly, que mesmo sendo mais novo, me dava conselhos em nossas conversas.

À Alessandra Gonçalves de Almeida que esteve comigo em todas as horas, sendo como nos chamamos uma ótima “duplinha”, amiga e companheira tanto nas horas felizes como nas mais complicadas ela estava lá comigo.

À Universidade Federal do Ceará pela oportunidade de estudar em uma das melhores Universidades do País.

À zootecnia curso que aprendi a amar e respeitar cada dia mais e aos professores do curso, que nos ensinaram da melhor maneira possível para nosso aprendizado. Em especial a Professora Carla Renata Figueiredo Gadelha que me orientou nessa reta final do meu curso.

A coordenadora do curso Andrea Pinto.

A coordenação e secretaria do curso de Zootecnia e seus funcionários.

Ao laboratório de Fisiologia Animal, no qual trabalhei e tive diversas experiências e aprendi muito.

Ao Leandro Leonardo Moreira, que me acompanhou desde o começo da nossa graduação e nos tornamos grandes amigos, que sempre esteve comigo seja na farra ou nos momentos de desespero universitário, em muito te agradeço Leo.

Aos meus amigos de turma que juntos nos tornamos uma turma unida e forte, que podemos até ter diferenças, mas sempre unidos para alcançar nossos objetivos. Que sempre seremos os “Zooadentos” compostos por quem ainda está na Zootecnia e por alguns que trilharam outros caminhos Barbara Brasileiro, Samila Freitas, Amanda da Rocha, Melina Braga, Caroline Landim, Diana Lucas, Larissa Camacho, Eloisa Mendes, Bruno Pinheiro, João Filho, Ingrid Barbosa.

Rafael Ramalho por sempre me ajudar em formatações de trabalhos, inclusive nesse trabalho de conclusão de curso, pelas saídas, conversas sobre a vida e eternas caronas.

Thiago Victor por auxílio muito importante em minha vida acadêmica e por me apresentar a reprodução animal, por acreditar no meu potencial.

Aos amigos que tive a oportunidade de conhecer dentro da Zootecnia, Nathan Lobo, que muito me ajudou sempre com mais experiência no curso, me auxiliou em muito.

Weiber Figueiredo que foi uma pessoa bastante importante para a minha permanência no curso.

Ao Centro Acadêmico Quatro de Dezembro que me ensinaram muito sobre a política no curso de zootecnia.

Ao grupo NEASPet, no qual participei, que é um grupo onde se preza a disseminação do conhecimento e me cativou desde o primeiro momento.

Ao Núcleo Integrado de Biotecnologia, em que passei um curto tempo, mas foi um tempo bem usado com conhecimento e troca de experiências.

A Professora Lúcia Daniel, por me aceitar em seu laboratório e a todos do Laboratório de Reprodução de Carnívoros (LRC), em especial aos alunos Felipe Magalhaes, Bianca Caldini, Carmen Vladia, Júlia Moraes e Breno Pinheiro que me ajudaram e me ensinaram a rotina do LRC.

A Henna Roberta, uma pessoa maravilhosa que tive a oportunidade de conhecer que muito me ajudou no período de estágio e teve muita paciência comigo.

A Bruna Farias e a todos do Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino (LTSCO). Que foram imprescindíveis para a realização do meu experimento no período de estágio, me acompanhando nos longos dias de coletas e congelamentos.

I. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O estágio supervisionado de conclusão do curso de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará (UFC) foi realizado no Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) pertencente à Faculdade de Veterinária (FAVET), da Universidade Estadual do Ceará, no período de agosto a novembro de 2015, tendo como orientadora técnica a professora Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva.

O NIB é composto por três laboratórios, o Laboratório de Reprodução de Carnívoros (LRC), o Laboratório de Tecnologia do Sêmen de Caprinos e Ovinos (LTSCO) e o Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Peixes (LBRP).

O núcleo possui infraestrutura para atender a pesquisas na área de reprodução animal, composto por: sala de cirurgia, no qual são realizadas castrações para experimentos; sala de ultrassonografia, sendo os serviços de exames de imagem disponibilizados para a comunidade, como também usados para avaliações em experimentos; sala de estudos com computadores, permitindo o acesso à internet; banheiros, tanto masculino quanto feminino; laboratório integrado, no qual era dividido entre os três laboratórios; almoxarifados para armazenamento de materiais, cada laboratório com o próprio almoxarifado; sala de pesagem de reagentes; sala do CASA, no qual armazena um computador com um programa de análises de sêmen computadorizada, CASA (*Sperm Class AnalyzerTM*, Microptics, S.L. Version 3.2.0, Barcelona, Spain) e botijões de nitrogênio; e sala de limpeza de materiais, com pias, estufa e autoclave, para limpeza e descontaminação dos materiais utilizados em experimento. Na área externa um espaço com tanques e duas piscinas para os peixes, um gatil e oito baias que comportavam os ovinos e caprinos de forma individual.

II. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

Durante o período de estágio supervisionado obrigatório acompanhei a rotina diária do Núcleo Integrado de Biotecnologia, participando de experimentos, reuniões e discussões dos laboratórios, vivenciando o aprendizado em diferentes áreas da reprodução.

1. RECUPERAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS

A recuperação de espermatozoides epididimários de gatos domésticos foi realizada durante experimento de iniciação científica da aluna Bianca Nunes Caldini, do LRC, através da técnica de flutuação (Figura 1). A recuperação de espermatozoides epididimários por flutuação consiste na realização da orquiectomia do animal, obtendo o complexo testículo-epidídimo, isolamento do epidídimo, infiltração do diluidor no epidídimo no intuito de que os espermatozoides migrem para o meio de diluição e facilite sua recuperação, fragmentação do epidídimo e recuperação dos espermatozoides.

Figura 1: Passo a passo da técnica de flutuação em gatos domésticos

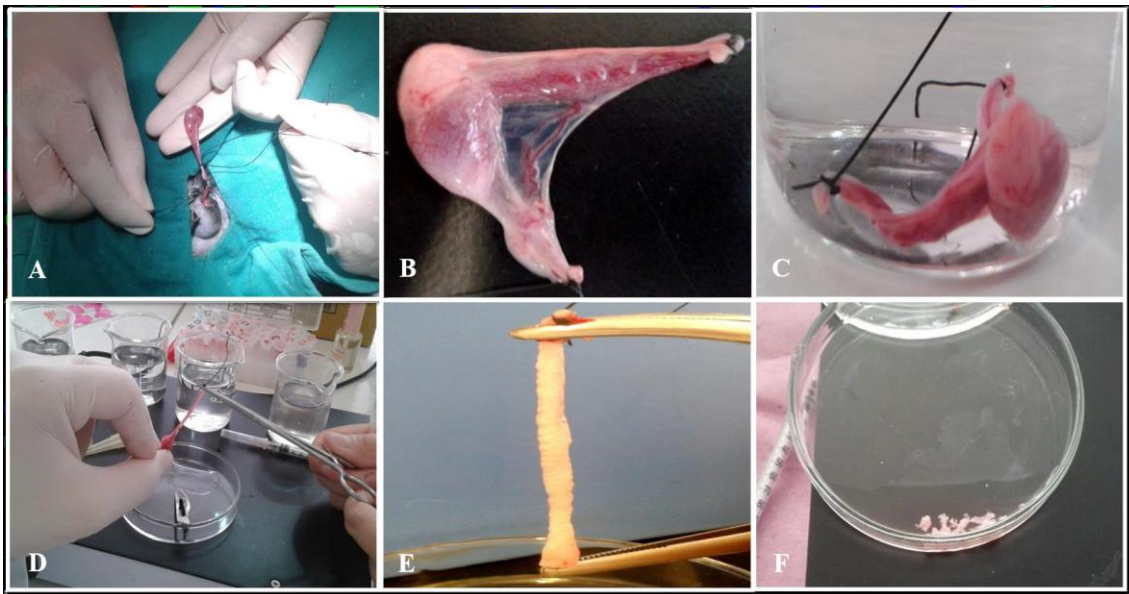
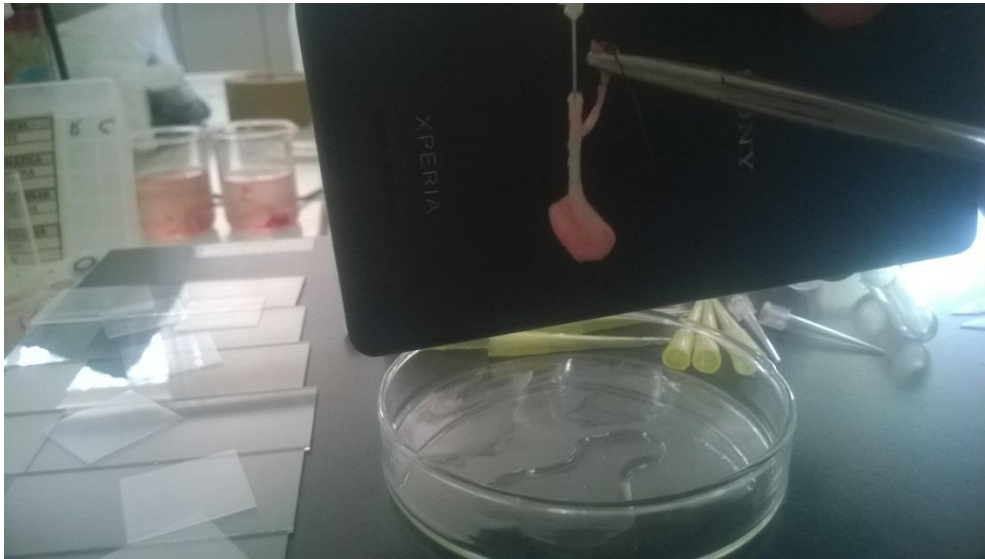


Figura x – Recuperação de espermatozoides de gatos domésticos através da técnica da flutuação. A: orquiectomia em gato doméstico; B: complexo testículo-epidídimo; C: lavagem do complexo testículo-epidídimo em solução salina a 0,9%; D: dissecação do epidídimo em placa de Petri; E: epidídimo dissecado; F: epidídimo fragmentado em contato com o diluidor.

Fonte: David Baruc (2015)

Figura 2: Epidídimo de gato doméstico após dissecação

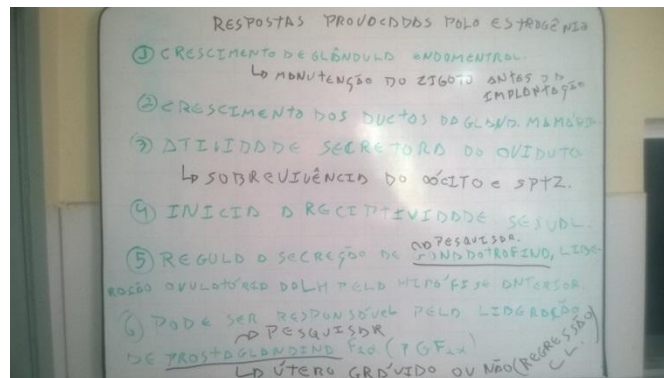


Fonte: Arquivo pessoal (2015)

2. AULAS DE FISIOLOGIA E REPRODUÇÃO ANIMAL

A professora Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva promoveu aulas de fisiologia e de reprodução de cães e gatos, ministradas pelos seus orientados da pós-graduação. Particpei da aula de endocrinologia de cães e gatos ministrada pela prof^a Dra. Ticiano Franco Pereira da Silva (Figura 3) e da aula de reprodução de gatos ministrada pela Dra. Mirley Barbosa Souza. Também participei de uma aula de Cinotecnia, no qual o assunto era: “treinamento de cães-guia” com a turma de Medicina Veterinária, ministrada pela prof^a Dra. Ticiano Franco.

Figura 3: Revisão da aula de endocrinologia no quadro



Fonte: Arquivo pessoal (2015)

3. DESPESCA DOS TAMBAQUIS

Foi realizada uma despesca e lavagem de tanque de tambaquis na Universidade Federal do Ceará (UFC) (Figura 4), com a orientação da professora Dra. Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley orientadora do LBRP.

Figura 4: Limpeza e despesca do tanque de tambaquis na UFC



Fonte:

Arquivo pessoal (2015)

4. COLETAS E ANÁLISES DE SÊMEN DE OVINOS E CAPRINOS

No LTSCO, local no qual foi realizado o experimento “Criopreservação de sêmen ovino em *One step*”, foram realizadas coletas do sêmen de caprinos e ovinos, com auxílio de vagina artificial, análise macroscópica (volume, cor e aspecto) e

microscópica (turbilhonamento, vigor, viabilidade, motilidade total e progressiva) do sêmen, refrigeração e congelamento do sêmen de ovinos. (figura 5)

Figura 5: Coleta de caprino utilizando a vagina artificial

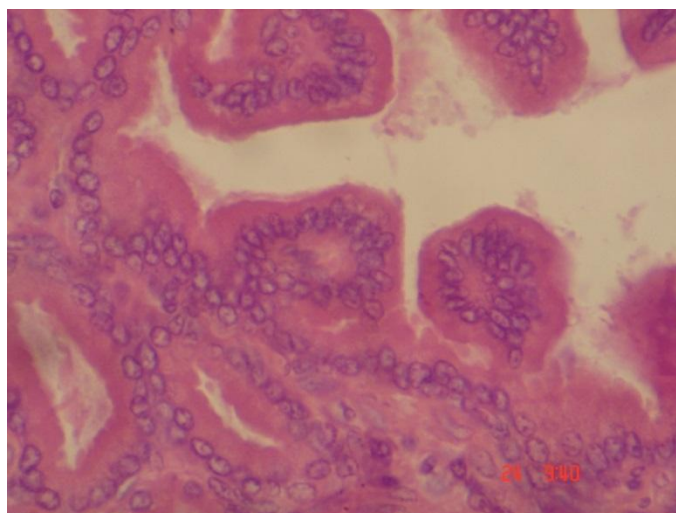


Fonte: Arquivo pessoal (2015)

5. ANALISE DE LÂMINAS DE PROSTATAS CANINAS

Foram realizadas análises das lâminas de próstata canina, elaborada pela professora Carla Renata Figueiredo Gadelha (Figura 6), com auxílio da professora Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista do Laboratório de Histologia de Efeitos Causados por Veneno de Serpentes e Plantas (HISTOVESP), no qual foram feitas as identificações das alterações histológicas do tecido prostático canino.

Figura 6: Hiperplasia prostática epitelial



III. CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO EM *ONE STEP*

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento, aprimoramento e uso de biotecnologias aplicadas à reprodução animal são, atualmente, indispensáveis para o aumento da eficiência reprodutiva dos rebanhos (VISINTIN *et al.*, 2008), além de poderem preservar o material genético de uma dada espécie, evitando, por exemplo, um possível desaparecimento da mesma.

Uma biotécnica bastante estudada é a congelação do sêmen animal. O advento do sêmen congelado trouxe uma nova dimensão para a inseminação artificial, possibilitando, de forma maximizada, o melhoramento genético dos rebanhos, pela capacidade de aumentar a progênie por macho e em diversos lugares simultaneamente (LEBOEUF *et al.*, 1998).

Nos últimos 50 anos, desde o primeiro relato mundial de congelação do sêmen ovino (ARAÚJO, 1955), os investimentos nessa tecnologia têm sido grandiosos, porém a solução ideal para o uso do sêmen congelado nessa espécie ainda não foi obtida e nem se popularizou com resultados reproduzíveis (MORAES, 2003).

Os baixos índices de fertilidade das fêmeas inseminadas com sêmen congelado podem ser melhorados com os avanços positivos alcançados na técnica de inseminação artificial e, principalmente, com as melhorias que ainda podem ser implementadas nos protocolos e diluidores de preservação de sêmen (AISEN *et al.*, 2005; CSEH *et al.*, 2012).

Em geral, o diluidor de congelação adequado deve ter uma pressão osmótica compatível com a do sêmen; balanço apropriado de elementos minerais; combinação equilibrada de nutrientes para o fornecimento de energia e manutenção da motilidade espermática; neutralização de produtos tóxicos produzidos pelos espermatozoides e equilíbrio do pH do meio; proteção contra mudanças de temperatura, especialmente contra o frio; estabilização dos sistemas enzimáticos e integridade das membranas

conferida por macromoléculas que as estabilizarão e minimizarão o extravasamento de íons e enzimas (AMANN & PICKET, 1987).

Agentes crioprotetores são essenciais para a criopreservação de quase todos os sistemas biológicos (FAHY, 1986). Esses agentes devem ser adicionados aos diluidores seminais para possibilitarem a sobrevivência dos espermatozoides durante o processo de congelação e descongelação (AMANN & PICKET, 1987). Entre os crioprotetores espermáticos penetrantes, o glicerol (GL) é o mais utilizado, desde a demonstração da sua eficácia (SMITH & POLGE *et al.*, 1950), reduzindo a temperatura de congelação do meio intracelular (HAMMERSTEDT *et al.*, 1990), prevenindo a formação de cristais de gelo. Também aumenta o volume de canais de solventes descongelados e dilui as altas concentrações de sais (SQUIRES *et al.*, 1999). Apesar de o GL ser o mais utilizado, já foram percebidos efeitos deletérios no sêmen que incluem estresse osmótico, mudanças na organização, fluidez e permeabilidade da membrana plasmática, assim como desorganização da sua composição lipídica (WATSON, 1995). Devido a esses efeitos negativos, alguns estudos têm dado preferência à adição do GL somente após o resfriamento do sêmen à temperatura de 4°C (FISER & FAIRFULL, 1989).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O SÊMEN OVINO

O sêmen é composto por duas frações distintas: o plasma seminal e os espermatozoides, que nos ovinos correspondem a cerca de 30% do volume total, e pode ser utilizado nas biotécnicas da reprodução, *in natura*, resfriado ou congelado (GONÇALVES *et al.*, 2008). A qualidade seminal está relacionada à avaliação das características quantitativas e qualitativas (IBRAHIM, 1997).

2.2. AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA CONVENCIONAL

Os exames andrológicos são realizados segundo os critérios preconizados pelo Manual de Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Os ejaculados dos animais são submetidos à avaliação física e morfológica, utilizando os seguintes parâmetros: turbilhonamento, motilidade espermática retilínea progressiva (0-100%), vigor espermático (0-5) e concentração espermática (milhões espermatozoides/mL) (CBRA, 2013).

Quadro 1 - Valores preconizados pelo CBRA (2013) para análise do sêmen ovino

Características	Valores
Volume (vagina artificial)	0,5 – 3 ml
Cor	branca ou amarelo-marfim
Odor	“sui generis”
Movimento de massa	≥ 3
Motilidade espermática	≥ 80%
Vigor	≥ 3
Concentração espermática	1 – 3 x 10 ⁹ /ml
Nº total de espermatozoides/ ejaculado	3 – 5 x 10 ⁹
Espermatozoides morfológicamente normais	≥ 80%

Fonte: CBRA (2013)

2.2.1. Volume

O volume do ejaculado de um ovino pode ser variável. O clima, a idade do animal ou até mesmo os equipamentos utilizados para a coleta do sêmen podem alterar o volume, além da repetitividade de coletas em um espaço curto de tempo. O volume do ejaculado pode variar de 0,5-2,0 mL em carneiros adultos e de 0,5-0,7 mL em ovinos jovens (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

2.2.2. Turbilhonamento

É o tipo de movimento resultante da interação entre o movimento individual e a concentração espermática; os espermatozoides se deslocam com movimentos vigorosos formando ondas. Pessoas com visão acurada podem observar o movimento das ondas através do tubo de coleta, mas uma avaliação precisa só pode ser realizada com o uso de microscópio (SILVA, 2010).

2.2.3. Motilidade espermática

A motilidade espermática é estimada de forma subjetiva, sendo analisada sob microscopia óptica, com uma gota do sêmen entre lâmina e lamínula, estimando-se sua porcentagem visualmente. No entanto, é a técnica mais utilizada na rotina laboratorial e continua tendo grande valor, principalmente para diferenciar sêmen de baixa e alta qualidade (ARRUDA *et al.*, 2011).

A motilidade total do sêmen é o resultado do número em porcentagem de espermatozoides moveis e progressivos mais o numero de espermatozoides moveis não progressivos.

A motilidade progressiva trata do número de espermatozoides móveis ativamente e com direção linear, em porcentagem, independentemente da velocidade (CONTROLLAB, 2012).

A motilidade não progressiva refere-se ao número de espermatozoides móveis não progressivos, ou seja, nadam em pequenos círculos (CONTROLLAB, 2012).

2.2.4. Concentração espermática

A concentração espermática tem bastante importância sobre a concepção das ovelhas (LIMA, 2008). A concentração espermática representa o número de espermatozoide por milímetro cúbico (mm^3) ou centímetro cúbico (cm^3), podendo ser mensurada com o auxílio do hemocitômetro ou Câmara de Neubauer (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

2.2.5. Viabilidade

A viabilidade espermática é outra variável importante para se obter maiores taxas de fertilização (CHANDLER *et al.*, 1988). A viabilidade espermática é avaliada através da técnica de coloração, (DOTT E FOSTER, 1972) onde os espermatozoides que possuem integridade de membrana, não são corados (viáveis) e os que não possuem, permitem a entrada do corante no citoplasma (não viáveis). Dentre os corantes utilizados podemos citar, além da eosina nigrosina, o azul de tripan, o Giemsa e o azul de bromofenol (CHEMINEAU *et al.*, 1991; DERIVAUX, 1980).

2.2.6. Morfologia

De forma geral, as características morfológicas espermáticas são analisadas usualmente utilizando-se esfregaços corados (corantes: Wright, Rosa de Bengala, Giemsa e eosina-nigrosina, Karras e outros). Como o espermatozoide é uma célula translúcida sua visualização sob microscopia óptica comum não é muito nítida para avaliação do contorno celular, por isso, quando se dispõe somente de microscopia óptica comum deve-se fazer uso da técnica de esfregaço corado (JOHNSON *et al.*, 1997). Após a lâmina ser confeccionada faz-se a contagem das anormalidades, caso seja alta, ou muito da mesma anormalidade, pode reduzir a fertilidade (HOWARD E PACE, 1988).

2.3. DILUENTES SEMINAIS

Os diluentes devem proporcionar nutrientes como fonte de energia, o tamponamento de pH e também o aumento do volume do ejaculado, a fim de obter múltiplas doses para inseminar (AISEN, 2008). Um diluidor apropriado, em geral deve apresentar as seguintes características: ser atóxico para os espermatozoides, ser de baixo custo e fácil de preparar, ter pressão osmótica compatível, balanço mineral apropriado, combinação ajustada de nutrientes, capacidade de neutralizar produtos tóxicos originados do metabolismo espermático, proteger contra os danos causados por ação das mudanças de temperatura, bem como proporcionar a estabilidade dos sistemas enzimáticos e a integridade da membrana plasmática (PICKET E AMANN, 1987).

2.3.1. TRIS (Tris-hidroximetil-aminometano)

Um dos principais componente dos diluentes de sêmen ovino utilizados rotineiramente, que atua como tampão iônico bipolar em pH entre 7,0 e 9,0. Ele é uma substância solúvel em água, disponível comercialmente em um alto grau de pureza na forma de cristais (CHOE *et al.*, 2006; DORADO *et al.*, 2007).

Rodrigues (1997) reportou que o TRIS não apenas apresenta atividade tamponante, mas também atua na redução do metabolismo da Frutose pela célula espermática, contribuindo assim para a preservação de sua energia. O TRIS tem sido o meio mais comumente utilizado na criopreservação de espermatozoides ovinos (SALAMON, 2000; MAXWELL, 1996).

2.3.2. Gema de ovo

A gema de ovo, assim como leite, é considerada um crioprotetor externo e segundo Azeredo *et al.* (2001) associado com o TRIS, o TRIS-Gema de ovo, produz altas taxas de fertilidade pós-descongelação. É importante salientar que a Gema de Ovo também tem propriedades termoprotetoras, protegendo a membrana plasmática e restaurando os fosfolipídios perdidos durante o choque térmico oriundo da mudança de temperatura que ocorre durante o resfriamento inicial do sêmen. Acredita-se que essa proteção possa ser devido à presença de uma lipoproteína chamada Fosfatidilcolina. Durante o choque térmico, estas lipoproteínas interagem com a estrutura lipídica da membrana plasmática das células espermáticas e propiciam a proteção (BOUCHARD *et*

al., 1990). É importante também salientar que devem ser adicionados inibidores do crescimento microbiano, quando a gema de ovo é associada ao TRIS.

As adições de Frutose, de Lactose e da própria Gema do Ovo têm a função de nutrir os espermatozoides (SALVIANO E SOUZA, 2008). O efeito dos diluentes, TRIS-Gema (TG), Leite-Gema (LG) e TRIS-Gema-Leite (TGL) sobre a diluição e a criopreservação de sêmen ovino, sendo assim observado que o diluente TG mostrou motilidade progressiva (46,5%) superior aos diluentes LG (26,1%) e TGL (32,1%) após a descongelação (Carvalho *et al.*, 2008). Apesar de seus efeitos benéficos, a Gema de Ovo apresenta um inconveniente, que é a possibilidade de transmissão de doenças (SILVA *et al.*, 2002).

2.3.3. Glicerol

O glicerol (GL), assim como o Dimetil-Sulfóxido (DMSO), Dimetil-Formamida, o Etilenoglicol (EG), o Propanodiol (PRHO), são considerados crioprotetores intracelulares, por serem pequenas moléculas que penetram facilmente nas membranas celulares (KULESHOVA *et al.*, 1999; HOLT, 2000). O agente crioprotetor mais utilizado é o GL, sua proteção se deve às propriedades coligativas e a união com as moléculas de água. O período de equilíbrio que ocorre durante o resfriamento permite que o GL penetre na célula e estabeleça um equilíbrio entre as concentrações intra e extracelulares (SALAMON; MAXWELL, 2000).

Entretanto, seu efeito tóxico tem sido relatado para o sêmen equino, bovino e ovino, conforme a concentração (ALVARENGA *et al.*, 2000). Na prática, diversos crioprotetores vêm sendo adaptados e estudados para um melhor resultado (DOBRINSKY, 2002).

2.4. REFRIGERAÇÃO SEMINAL

A refrigeração do sêmen ovino diluído é utilizada como principal método de armazenamento, sendo caracterizada pela redução da temperatura que originalmente encontra-se em torno de 37°C para temperaturas próximas a zero grau Celsius. Nesse período o espermatozoide sofre inibição reversível de seu metabolismo (CÂMARA & GUERRA, 2011). Para promover essa queda na temperatura, pode-se utilizar equipamentos convencionais (refrigerador, garrafas térmicas ou caixas isotérmicas com gelo), ou ainda, equipamentos automatizados. No uso de caixas isotérmicas com gelo ou

água gelada, as palhetas devem ser protegidas com algodão hidrofóbico para evitar o choque térmico devido ao contato direto com o gelo (CORANDIN, 2011), O algodão hidrofóbico também tem a função de vedar a palheta, para que evite da água entrar em contato com o sêmen e assim matar os espermatozoides.

A refrigeração do sêmen, de 30°C a 0°C realizada de forma abrupta, pode ocasionar um estresse letal a algumas células, caracterizado como choque térmico (WATSON, 2000). Uma queda de temperatura lenta também promove tensão na membrana celular (WATSON, 2000), assim para evitar os dois extremos deve-se a curva de refrigeração ser padronizada e monitorada.

Vários métodos podem ser utilizados para promover essa queda de temperatura, sejam eles automáticos ou manuais, a curva de queda da temperatura deve ser promovida de maneira constante e homogênea, evitando variações bruscas que culminam em choque térmico e redução da viabilidade espermática (WATSON, 2000; MEDEIROS *et al.*, 2002).

2.5. CONGELAÇÃO SEMINAL

A suspensão no vapor de nitrogênio líquido, com posterior imersão no líquido para o congelamento do sêmen, nesse caso, o que determina a velocidade da queda da temperatura é à distância com o nitrogênio líquido e o tamanho das palhetas (LEBOEUF *et al.*, 2000). A curva de queda de temperatura ideal para o congelamento é uma parábola, conseguida com uma distância de 4-6 centímetros entre as palhetas e o nitrogênio líquido (SALAMON & MAXWELL 2000). A temperatura entre -5°C e -50°C é definida como um ponto crítico, pois nessa temperatura a taxa de congelamento determina se a célula permanece em equilíbrio com seu meio extracelular ou torna progressivamente super congelada, elevando a possibilidade de desidratação e formação de gelo intracelular (KUMAR *et al.*, 2003).

2.6. DESCONGELAMENTO SEMINAL

A fim de melhorar os índices de fertilidade, vários sistemas de descongelamento foram elucidados. O descongelamento em altas temperaturas (60-75°C) é semelhante a 38-42°C, quanto à motilidade, integridade de acrossoma e fertilidade dos

espermatozoides (SALAMON & MAXWELL, 2000). Porém, segundo LEBOEUF et al. (2000), a fase de aquecimento é tão importante para a sobrevivência dos espermatozoides quanto o processo de congelamento, os espermatozoides que sobreviveram à temperatura de -196°C são submetidos ao aquecimento e atravessam novamente a zona crítica de -15°C a -60°C (SALAMON & MAXWELL, 2000).

Um método simples e comumente utilizado para o descongelamento de sêmen é utilizando água em banho maria na temperatura de 37°C , de 20 a 30 segundos (ÇOYAN et al., 2011; MOUSTACAS et al., 2011).

3. OBJETIVO

3.1. GERAL

Avaliar a influencia do diluidor TRIS-gema de ovo-glicerol, na qualidade do sêmen ovino congelado, a partir da diluição inicial em *One step*.

3.2. ESPECÍFICO

- Avaliar o percentual de motilidade total e progressiva do sêmen ovino congelado com glicerol em *One step*;
- Comparar o sêmen ovino fresco que será submetido a congelação em *One step* (T1) com sêmen ovino fresco que será submetido a congelação em *Two step* (T2);
- Comparar o sêmen ovino descongelado que terá sido submetido a congelação em *One step* (T1) com sêmen ovino descongelado que terá sido submetido a congelação em *Two step* (T2);

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1. LOCAL DO EXPERIMENTO

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino (LTSCO) / Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da Faculdade de Veterinária (FAVET) da Universidade Estadual do Ceará (UECE), localizado na cidade de Fortaleza (3° 43' 02'' de latitude Sul e 38° 32' 35'' de longitude Oeste), estado do Ceará. O clima da região, de acordo com a classificação de Koppen, é AW, quente e úmido, com médias térmicas variando entre 26 a 27°C, máximas de 30°C e mínimas de 19°C.

4.2. PREPARAÇÃO DOS DILUENTES

A todos os diluentes foram adicionados à água destilada e o antibiótico (gentamicina, Gentatec® Agro Veterinária). Foram formulados utilizando-se o diluente a base de TRIS (TRIS + Ácido Cítrico + Frutose), gema de ovo e o glicerol, obtendo-se os seguintes tratamentos (Figura 7, 8 e 9)

Figura 7: Mostrando os componentes do TRIS diluidor



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 8: Gema de ovo usada no diluidor



Fonte: Arquivo pessoal (2015)

Figura 9: Glicerol sendo introduzido no diluidor



Fonte: Arquivo pessoal (2015)

- Tratamento 1 (T1 – *One step*): TRIS + 20% de gema de ovo + 7% glicerol
- Tratamento 2 (T2 – *Two step*): FA: TRIS + 20% de gema de ovo e FB: TRIS + 20% de gema de ovo + 14% glicerol.

4.3. COLETAS, AVALIAÇÃO E REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN OVINO

Foram utilizados três reprodutores ovinos, sendo dois animais da raça Dorper e um da raça Santa Inês, de fertilidade comprovada e idade variando de 2 a 5

anos. Os animais pertencem ao LTSCO, que são mantidos sob manejo intensivo, sendo alimentados com feno de Tifton (*Cynodon sp.*) e concentrado comercial com 18% de proteína bruta, além de sal mineral e água *ad libitum*.

Foram realizadas seis coletas, o sêmen foi coletado com o auxílio de uma vagina artificial específica para ruminantes (Figura 10) e na presença de uma fêmea induzida ao estro.

Figura 10: Vagina artificial

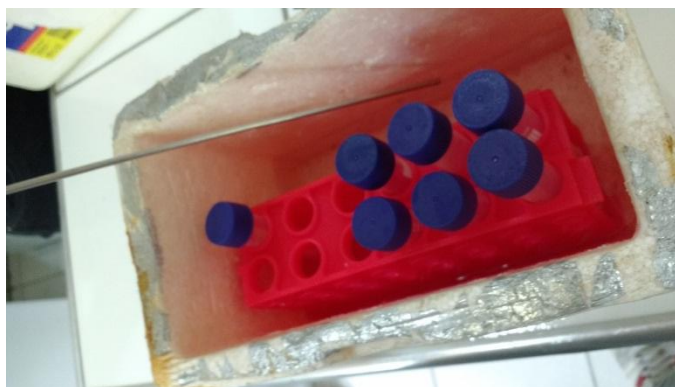


Fonte: Arquivo pessoal (2015)

As amostras foram avaliadas macroscopicamente quanto ao volume, aspecto e cor, em seguida mantidas em banho-maria a 37°C para as avaliações microscópicas do turbilhonamento, vigor e do percentual de motilidade total e progressiva. Após as avaliações, o sêmen aprovado, foi dividido em duas alíquotas iguais diluídas nos tratamentos mostrados acima, obtendo-se a concentração final de 400×10^6 espermatozoides/mL, em seguida, as amostras foram reavaliadas, agora com o diluidor, e posteriormente submetidas a uma curva de refrigeração de 90 minutos, com um decréscimo de 0,35°C/min em caixa térmica, sendo o término dessa refrigeração quando a temperatura chegasse a 4°C (Figura 11). Após a curva de refrigeração as amostras foram acondicionadas em um refrigerador previamente estabilizado em 4°C por 2h. Nas

amostras do T2, após a curva de refrigeração, foi realizada a glicerolização, sendo aplicada a FB dividida em 3 frações com intervalos de 10min cada.

Figura 11: Caixa térmica com as amostras para a refrigeração



Fonte: Arquivo pessoal (2015)

4.4. ENVASE, CONGELAMENTO DO SÊMEN E DESCONGELAMENTO

Após a refrigeração, as amostras foram envasadas em palhetas de espessura de 0,5mm, e colocadas em uma rampa de congelação à 4cm de altura do nitrogênio líquido (N_2), acondicionado dentro de um isopor. As palhetas ficaram por 15min no vapor de N_2 e depois foram submersas no nitrogênio líquido, com temperatura de aproximadamente $-196^{\circ}C$.

O descongelamento das amostras foi realizado em duplicatas, onde as palhetas eram mantidas em banho-maria a $37^{\circ}C$ por 30 segundos, em seguida rediluídas em tris-base acondicionados em tubos eppendorfs, mantidas em repouso por 5 minutos, e posteriormente avaliadas.

4.5. AVALIAÇÃO SEMINAL

As amostras foram avaliadas após a diluição nos tratamentos (fresco) e após descongelação.

Os parâmetros de motilidade total e progressiva do sêmen foram analisados de forma subjetiva utilizando o microscópio ótico binocular com aumento de 40 vezes. Para a análise, alíquotas de $10\mu L$ do sêmen diluído foram rediluídas em tris-base

mantidos em banho-maria (37°C) e colocadas em lâminas de microscopia e cobertas com lamínulas, ambas preaquecidas a 37°C.

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Systat 12 for Windows, 2007. As variáveis foram submetidas ao teste T pareado de comparação de pares de médias. O nível de significância estatística foi estabelecido em $P < 0,05$. Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, o sêmen foi diluído nos tratamentos T1 e T2, refrigerado até a temperatura de 4°C, congelado com a temperatura de -196°C, descongelado, tornando a temperatura de 37°C e avaliado o percentual dos parâmetros de motilidade total e motilidade progressiva. Os resultados demonstraram que a congelação em *One Step* manteve os parâmetros de qualidade seminal, quanto à motilidade total e a motilidade progressiva, comparada a congelação em *Two step*, nas avaliações do sêmen fresco e descongelado (tabela 1).

Tabela 1 – Média e desvio padrão do percentual de motilidade total (MT) e progressiva (MP) de sêmen ovino fresco e descongelado diluídos nos tratamentos T1 e T2

Tempo	Tratamento	MT (%)	MP (%)
Fresco	T1	90 ± 0	86 ± 0,05
	T2	89 ± 2	86 ± 0,05
Descongelado	T1	44 ± 8	36 ± 0,09
	T2	40 ± 9	34 ± 0,08

T1: *One step* e T2: *Two step*

A motilidade espermática é uma importante característica seminal para avaliar o potencial de fertilidade de espermatozoides. Vários estudos sugerem evidências entre os parâmetros de motilidade e a fertilidade (KJAESTAD *et al.*, 1993; BAILEY *et al.*, 1994; STÅLHAMMAR *et al.*, 1994 e JANUSKAUSKAS *et al.*, 2003).

Os resultados da motilidade tanto a fresco quanto descongelado foram considerados satisfatórios quando comparados aos de Monreal *et al.* (2012), que usou dois tipos de diluentes, sendo um com a base de TRIS.

A motilidade em T1 e T2 superiores a 40% atendem aos padrões de julgamento de sêmen de doadores, segundo o CBRA (1998), para uma possível inseminação artificial.

O glicerol como crioprotetor é o mais empregado em congelação de sêmen em diferentes tipos de espécies (SILVA *et al.*, 2003), mesmo já sendo comprovada sua toxicidade quando em altas concentrações por diversos autores. Entretanto esse estudo mostrou que a utilização de 7% de glicerol para crioproteção acrescido a gema de ovo e tris apresentaram resultados bastante satisfatórios quando comparadas com os resultados de motilidade total e progressiva pós-congelação no trabalho de Ferreira (2008).

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados demonstraram que a congelação em *One step* manteve a qualidade dos parâmetros de motilidade total e progressiva do sêmen semelhante à congelação em *Two step*.

Com base nos resultados obtidos, sugere-se que a realização da congelação em *One step* pode ser uma alternativa aplicada como protocolo de congelação para sêmen ovino. No entanto, sugere-se a realização de experimentos futuros com mais análises do sêmen.

REFERENCIAS

- AISEN, E.G. Reprodução ovina e caprina. São Paulo: MedVet. 1. ed., v. 1., p.203, 2008.
- AISEN, E.G.; QUINTANA, M.; MEDINA, V.; MORELLO, H.; VENTURINO, A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology*, v.50, n.3 , p.239-249, 2005.
- ALVARENGA, M. A.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MOREIRA, R. M.; CESARINO, M. M. Acrossomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems, *Jornal Equino Veterinário* v. 32, n°6, p.541-545, 2000.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principle of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science*, v.7, n.3, p.145-174, 1987.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles od cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Practice*, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.
- ARAÚJO, P. G. Inseminação intrauterina em ovinos de corte com sêmen congelado. Emprego da via transperitonial por laparoscopia. *Boletim Inseminação Artificial*, v.7, p.5-10, 1955.
- ARRUDA, R. P.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.; JAIMES, J. D.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.145-151, abr./jun. 2011.
- AZERÊDO, G. A.; et al. Evaluation of plasma membrane integrity of frozentawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small Ruminant Research*, v. 41, p. 257-263, 2001.

AZERÊDO, G. A.; et al. Evaluation of plasma membrane integrity of frozentawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small Ruminant Research*, v. 41, p. 257-263, 2001.

BITTENCOUR, R. F.; OBA, E.; RIBEIRO FILHO, A. de L.; AZEVEDO, M. C. H. C.; BICUDO, S. D. Avanços na criopreservação do sêmen ovino: diluidores e crioprotetores. *Cienc. anim. bras.*, Goiânia, v.14, n.4, p. 522-536, out./dez. 2013.

CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. 2ª Edição. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49 p.

CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2013.

CHANDLER, J. E.; PAINTER, C. L.; ADKINSON, R. W.; MEMON, M. A.; HOYT, P. G. Semen quality characteristics of dairy goats. *Journal Dairy Science*, v. 71, p. 1638-1646, 1988.

CHEMINEAU, P.; COGNIE, Y.; GUERIN, Y.; ORGEUR, P.; VALLET, J. C. Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goats. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy , 223p, 1991.

CHOE, C. Y.; Influence of seasons, extenders, slow and rapid freezing on seminal characters in Korean native bucks. *Reproduction Domestic Animal*, v.41, p.55-60, 2006.

CORANDIM, E. M. Sêmen refrigerado e congelado para inseminação artificial em ovinos. Universidade Federal De Goiás, 2011.

ÇOYAN, K.; BASPINAR, N.; BUCAK, M. N.; AKALIN, P. P. Effects of cysteine and ergothioneine on post-thawed Merino ram sperm and biochemical parameters. *Cryobiology*, San Diego, v. 63, p. 1-6, 2011.

CSEH, S.; FAIGL, V.; AMIRIDIS, G. S. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*, v.130, p.187-192, 2012.

DERIVAUX, J. Reprodução dos Animais Domésticos. Zaragoza: Acribia, 1980. In: EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Zaragoza: Acribia, 192p.

DORADO J., Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two based extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology*, v.68, p.168-177, 2007a.

DOTI, H. M.; FOSTER, G. C. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential "lifedead" stain. *Journal Reproduction and Fertility*, v. 29, p. 443-445, 1972.

FAHY, G. M. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology*, v 23, n.1, p.1-13, 1986.

FERREIRA, H. N. Efeito da exposição aos crioprotetores glicerol e metilformamida sobre a viabilidade e fertilidade do sêmen equino. Universidade Estadual Paulista, 2008.

FISER, P. S.; FAIRFULL, R. W. The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiol.* 26:64-69. 1989.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2. Ed. Cap. 5. Sao Paulo: Roca, p.83- 103. 2008.

GUIMARÃES, A. A. Avaliação de diferentes diluentes na criopreservação de sêmen ovino (*Ovis aries*). Universidade Federal Rural da Amazônia, 2010.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Reprodução Animal. 7ª Edição. São Paulo: Manole, 2004

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, v.11, n.1., p.73-88, 1990.

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

IBRAHIM, S. Seasonal variations in semen quality of local and crossbred rams raised in United Arab Emirates. *Anim. Reprod. Sci.*, v.49, p.161-167, 1997.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation to sperm viability, chromatin structure and field fertility. *Theriogenology*.v.60, p.743-758, 2003.

JOHNSON, W. The significance to bull fertility of morphologically abnormal sperm. *Vet Clin North Am*, v.13, p.255-270, 1997.

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, p. 246-253, 2003.

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

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

LIMA, F. R. G.; ARAÚJO, A. A. de; SANTOS, D. O; FACÓ, O.;CATUNDA, A. G. V.; LIMA, I. C. S.; LINARD, M. A. B. Efeito da concentração espermática sobre sêmen congelado de carneiros da raça Santa Inês. Universidade Federal do Ceará, 2008.

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

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

MORAES, J. C. F. Perspectivas da utilização do sêmen congelado em programas de reprodução assistida em ovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, n.4, p.613-619, 2003.

MOUSTACAS, V. S.; CRUZ, B. C.; VARAGO, F. C.; MIRANDA, D. A.; LAGE, P. G.; HENRY, M. Extenders containing dimethylformamide associated or not with glycerol are ineffective for ovine sperm cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, Berlin, v. 46, p. 924-925, 2011.

ROCHA, M. V.; MARTINS, L. F.; BOSCARATO, A. G.; FERNANDES, V.; RODRIGUES, D. P. Avaliação andrológica de touros jovens da raça nelore submetidos à imunocastração. *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.19; p. 2014.

SALAMON, S.; et al „Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.77-111, 2000.

SALVIANO, M. B.; SOUZA, J.A.T. Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.32, n.3, p.159-167, 2008.

SILVA, A. R.; R.C.S. Cardoso; L.D.M. Silva. Effect of Tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. *The Veterinary Journal*, v.164, p.244-246, 2002.

SILVA, M.; SILVA, M. da. Tecnologia do sêmen e inseminação artificial em caprinos e ovinos, Natal: EMPARN, 2010. XXp.; v.13, il.

SMITH, A. H.; POLGE, C. Survival of spermatozoa at low temperatures. *Nature*, v.166, p.668-671, 1950.

SOBRINHO, J. M. F.; BRANCO, M. A. C.; SOUSA JÚNIOR, A.; NASCIMENTO, I. M. R.; MOTA, L. H. C. M.; CARVALHO, Y. N. T.; FERREIRA, S. B.; COSTA, D. N. M.; MORAES JÚNIOR, F. J.; SOUZA, J. A. T. Características do sêmen de carneiros Dorper, Santa Inês e Sem Padrão Racial Definido, pré e pós-congelação, nos períodos chuvoso e seco. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, n.4, p.969-976, 2014.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; VANDERWALL, D. K.; Mc CUE, P. M.; BRUEMMER, J. Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: Colorado State University. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Bulletin. N.9, p.80, 1999.

VISINTIN, J. A.; MELLO, M. R. B.; MILAZZOTTO, M. P.; ASSUMPCÃO, M. E. O. D. Biotecnologia da reprodução animal: clonagem e transgenia animal. Ciência Veterinária nos Trópicos, Recife-PE, v. 11, supl. 1, p. 139-144, abr. 2008.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Reproduction Fertility Development, v.7, n.4, p.871-91, 1995.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reproduction Science, Amsterdam, v. 60-61, p. 481-492, 2000.