

## MÉTODOS RUDIMENTARES PARA RESFRIAMENTO DE SÊMEN DE OVINOS

### RUDIMENTARY METHODS FOR COOLING SPERM OF SHEEP

Thainara Meneguelli<sup>1</sup>, Izadora Zanetti Monico<sup>1</sup>, Renato Travassos Beltrame<sup>2</sup>, Nilson Nunes Moraes Junior<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Medicina Veterinária do Centro Universitário do Espírito Santo (UNESC), <sup>2</sup>Médico Veterinário, Doutor em Ciência Animal pela Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), professor do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário do Espírito Santo (UNESC), Colatina, ES – Brasil; <sup>3</sup>Curso de Agronomia, Instituto Federal do Espírito Santo - IFES, Colatina, ES, Brasil.

#### RESUMO

A ovinocultura tem sido considerada como uma alternativa interessante para o desenvolvimento social, tendo em vista a alta adaptabilidade e fonte proteica de alimento a populações carentes. A Inseminação artificial intensifica o melhoramento genético e viabiliza a obtenção de material genético de reprodutores de outras regiões ou países, permitindo que o produtor multiplique os genótipos dentro do rebanho. Independente da espécie, o estudo dos métodos pelo qual o resfriamento e a criopreservação seminal podem ser realizados ainda necessita ser explorado com intuito de proporcionar melhorias nas taxas de prenhez a campo. O objetivo deste trabalho foi comparar a viabilidade de sêmen ovino, submetido a diferentes formas de refrigeração: 1) recipiente plástico embebido de álcool absoluto; 2) uso de plástico bolha. Para realização do experimento, ejaculados de dois machos foram obtidos pelo método da vagina artificial. Após cada colheita, os ejaculados foram mantidos em banho-maria a 36 °C e, em seguida, submetidos às avaliações macroscópicas. A amostra de sêmen foi diluída e o envase mecânico realizado em palhetas francesas de 0,25 mL. A temperatura e curva de resfriamento foram ajustadas para 0,25 °C/ minuto, resfriando-se até a temperatura de 5 °C, em geladeira comercial, até o tempo de estabilização, sendo então aquecidas a 37 °C para avaliação. Não houve diferenças para as variáveis comparando-se os métodos avaliados neste experimento (resfriamento das palhetas de sêmen envoltas no plástico bolha x dentro de mamadeira contendo álcool absoluto).

**Palavras-chave:** Sêmen, criopreservação, sêmen congelado, Inseminação, espermatozoide, ovinos, sêmen refrigerado.

#### ABSTRACT

Sheep breeding has been considered as an interesting alternative for social development in view of the high adaptability and protein source of food to poor populations. Artificial insemination enhances the genetic improvement and makes it possible to obtain genetic material from breeders from other regions or countries, allowing the producer to multiply the genotypes within the herd. Regardless of the

species the study of the methods by which cooling and seminal cryopreservation can be performed still needs to be explored in order to provide improvements in the rates of pregnancy to field. The objective of this Project was to compare the viability of sheep semen, submitted to different forms of refrigeration (plastic container soaked with absolute alcohol x use of bubble wrap). For the experiment, the ejaculates were obtained by the method of the artificial vagina of two males. After each harvest, the ejaculates were kept in a water bath at 36°C and then subjected to macroscopic evaluations. The sêmen sample was diluted and the mechanical packaging in French vatsof 0.25 mL. At the end of the package the vanes were submitted to cooling by two treatments: 1) wrapped in bubble wrap; 2) comercial plastic container filled with absolute alcohol. The temperature and cooling curve were adjusted to 0.25 °C / minute by cooling to 5 °C in a comercial refrigerator until the stabilization time, then being heated to 37 °C and evaluated.

**Keywords:** Semen, cryopreservation, frozen semen, insemination, sperm, sheep, refrigerated semen.

## INTRODUÇÃO

O sêmen de carneiros, da mesma maneira que nas demais espécies, pode ser utilizado para inseminação artificial na forma fresca, refrigerado ou congelado (ROJERO *et al.*, 2009).

As taxas de prenhez por inseminação artificial com sêmen fresco são bastante aceitáveis, porém, a curta sobrevivência dos espermatozoides (sptz), e o número limitado de doses que podem ser adquiridas de um carneiro restringem bruscamente o uso de um determinado reprodutor. Assim, a opção de resfriamento e congelamento vem sendo bastante estudada, tendo, como principal objetivo e vantagem, a possibilidade de existir um maior distanciamento espacial e temporal entre o momento da colheita e a inseminação artificial. Apesar disso, a qualidade do esperma após congelamento-descongelamento é um fator crucial que pode afetar os resultados da fertilidade após a IA (MASOUDI *et al.*, 2016).

A fertilidade obtida com o método transcervical depende da penetração no canal cervical. Essa técnica é mais eficaz quando a deposição de sêmen é mais profunda do que 4 cm no colo do útero (CASALI *et al.*, 2017). Entre a inseminação cervical e a intra-uterina, a deposição intra-uterina ainda é mais utilizada devida a baixa taxa de prenhez pela inseminação cervical (SALAMON e MAXWELL, 1995). Casali *et al.*, (2017) demonstram que maior taxa de prenhez, usando IATF, foi obtida quando o sêmen foi colocado dentro do útero, em ovelhas Corriedale, através de laparoscopia. Embora a inseminação artificial transcervical seja mais eficiente que o

método vaginal quando o sêmen congelado-descongelado é utilizado, sua eficiência não é tão alta em comparação ao método laparoscópico (MASOUDI *et al.*, 2016).

No que se refere ao armazenamento do sêmen ovino em estado líquido, o principal método consiste em submetê-lo a temperaturas reduzidas, promovendo inibição reversível do metabolismo das células, mediante específicas curvas de processamento, diluente e taxa de diluição. As maiores alterações observadas são a integridade morfológica, diminuição da motilidade e eventos estimulados pelo acúmulo de produtos do metabolismo, que levam à diminuição do transporte e sobrevivência dos sptz no trato genital feminino (SALAMON e MAXWELL, 2000; AISEN *et al.*, 2005).

Em situações exclusivas, o uso de sêmen refrigerado a 5 °C pode ser empregado até três dias após a colheita e processamento, entretanto, há redução radical na taxa de prenhez, devido a qualidade (O'HARA *et al.*, 2010).

Em alguns estudos, observou-se que a refrigeração do sêmen, antes da inseminação artificial cervical, fez com que a migração através da cérvix e a proporção dos sptz móveis com deslocamento linear em direção a junção útero-tubárica, bem como transito no lúmen da tuba uterina, fosse reduzida (DRUART *et al.*, 2009).

O processamento do sêmen, que inclui diluição, incubação, resfriamento, congelamento e reaquecimento, leva a uma drástica redução da viabilidade espermática em virtude de alterações ultraestruturas, bioquímicas e funcionais (WATSON *et al.*, 2000).

Para resfriamento e criopreservação do sêmen de ovino podem ser utilizados diversos tempos de redução de temperatura e equilíbrio, sendo, tais tempos, delimitados pelo intervalo entre a adição de diluente utilizado e o resfriamento e posterior congelamento de células espermáticas. Esse período permite um equilíbrio osmótico mais interessante após a interação da célula espermática com o crioprotetor, também sendo muito importante nos momentos de colheita e processamento do sêmen a campo, o cuidado principalmente quanto ao tempo necessário para conclusão dos procedimentos pré-criopreservação (FOOTE e KAPROTH, 2002).

A curva de resfriamento e o tempo de equilíbrio (tempo no qual o sptz permanece à temperatura de 4-5 °C antes do congelamento) são considerados os

principais entraves do processo de criopreservação seminal. A decisão acerca do uso de curvas de resfriamento rápidas (queda maior que 1 °C por minuto), ou lentas (queda menor que 0,5 °C por minuto), atreladas ao tempo de equilíbrio, configuram possíveis respostas em relação a alterações morfológicas e funcionais do sptz, em decorrência de mudanças irreversíveis na atividade metabólica da membrana plasmática desta estrutura.

Embora os diluentes, tipo de resfriamento e a taxa de queda de temperatura sejam amplamente descritos na literatura, as metodologias pelas quais o processo de resfriamento é realizado englobam o uso de máquinas automatizadas que permitem controle eficiente do processo. Alternativamente, os usos de uma série de artifícios rudimentares, de menor custo, apresentam resultados duvidosos ou, mesmo, ainda não foram descritos na literatura. Podem ser citados nesse processo o uso de recipiente plástico envolto por álcool absoluto (FÜRST, 2002), (OLIVEIRA, 2013) e ainda o uso de plástico bolha para envolver as palhetas de sêmen durante o período resfriamento. Este último processo não foi encontrado na literatura consultada, existindo dúvida acerca da manutenção da viabilidade seminal.

Diante do descrito acima, o objetivo deste trabalho, foi avaliar a viabilidade e integridade de sptz ovinos, submetidos a diferentes formas de refrigeração, seja utilizando-se recipiente plástico embebido de álcool absoluto ou uso de plástico bolha.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais do Centro Universitário do Espírito Santo (UNESC), sob o parecer de número 277575/2017. Previamente ao início das colheitas de sêmen destinadas a resfriamento, os animais foram submetidos a um período de adaptação e condicionamento à monta em vagina artificial, e a exames clínico-andrológicos.

Os ejaculados foram obtidos pelo método da vagina artificial de modelo curto (MIES FILHO, 1987) (figura 1A), utilizando uma fêmea como manequim (figura 1B), dois machos (Santa Inês - figura 1C - e Dorper - figura 1D), perfazendo 15 coletas.



Figura 1, A: vagina artificial de modelo curto; B: utilização de uma fêmea como manequim; C: reprodutor da raça Santa Inês; D: Reprodutor da raça Dorper.  
Fonte: O autor

A vagina artificial foi aquecida em temperatura média de 40°C, tendo como revestimento uma mucosa de borracha. Um tubo coletor de vidro graduado foi encaixado na vagina em sua extremidade mais fina. Esse mesmo tubo foi revestido externamente com papel alumínio, para evitar mudanças bruscas na temperatura do sêmen pelo meio ambiente e também a incidência de raios solares. Em seguida, após a colheita do sêmen, as amostras foram analisadas e processadas.

Após cada colheita, os ejaculados foram mantidos em banho-maria a 36 °C e, em seguida, submetidos às avaliações macroscópicas (volume (mL), aspecto (aquoso, leitoso e cremoso) e cor, e microscópicas (turbilhão (0 a 5), motilidade (0-100%), vigor (0-5) e concentração (nº spz/ml) (CBRA, 2013), em lâminas e lamínulas dispostas em placa aquecedora e preaquecidas a 37°. Somente foram utilizados os ejaculados com volume  $\geq 0.75$  ml e que tinham concentração espermática superior a 2.5 bilhões de spz/ml e 70% de motilidade.

Foram feitas avaliações de motilidade e vigor em microscopia de campo claro. Após a determinação da concentração espermática foi realizado o cálculo do rendimento do número de doses do ejaculado, assim como os volumes totais, necessários para proceder-se à diluição, levando em consideração que cada dose do sêmen deveria possuir uma concentração de  $100 \times 10^6$  spz. Após o cálculo do

volume final, o sêmen *in natura* foi diluído no meio, Botu-Bov<sup>®</sup> (BiotechLtda - Botucatu/SP). Em seguida, foi realizado o envase mecânico em palhetas francesas de 0,25 mL, que foram lacradas com álcool polivinílico. Durante as etapas de diluição e envase do sêmen, as amostras e os meios diluentes foram mantidos em banho-maria a 36 °C.

Ao término do envase as palhetas foram submetidas ao resfriamento por dois tratamentos: 1) enroladas em plástico bolha (figura 2A); 2) recipiente plástico comercial preenchido por álcool absoluto (figura 2B). A temperatura da curva de resfriamento foi ajustada para decréscimo a 0,25 °C/ minuto resfriando-se até a temperatura de 5 °C, em geladeira comercial. Decorrido o período de estabilização, as palhetas foram preaquecidas a 37 °C e, em seguida, observadas no microscópico óptico para avaliação das variáveis previamente observadas.

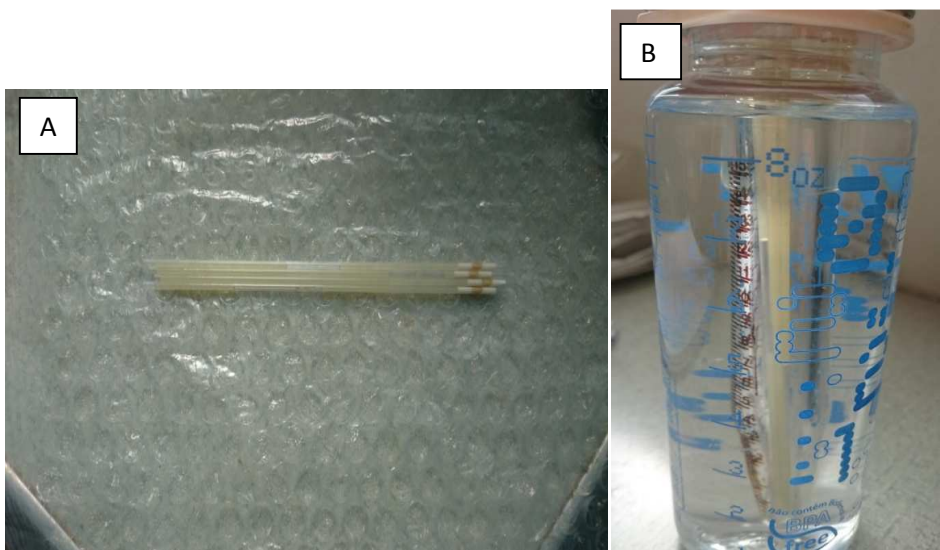


Figura 2 - A: Palhetas e plástico bolha abaixo; B: Recipiente plástico comercial (mamadeira), preenchido por álcool absoluto, com as palhetas já em seu interior.  
Fonte: O autor

Para evidenciar possíveis diferenças entre os tratamentos, os dados obtidos para as características estudadas foram submetidos ao teste de normalidade. Posteriormente, variáveis paramétricas foram submetidas à análise de variância (ANOVA). Variáveis não paramétricas foram avaliadas pelo teste de Kruskal Wallis, considerando-se 5% de probabilidade. As análises foram todas realizadas por meio do programa estatístico SAS University Edition 2017.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença para as variáveis comparando-se os métodos avaliados neste experimento (resfriamento das palhetas de sêmen envoltas no plástico bolha x dentro de mamadeira contendo álcool absoluto).

Amostras viáveis foram produzidas com a utilização dos métodos descritos. A tabela abaixo (tabela 1) demonstra os resultados derivados do processo de coleta de sêmen a fresco e resfriamento pelos métodos do plástico bolha e mamadeira contendo álcool absoluto no seu interior.

Tabela 1: Análises obtidas de sêmen ovino fresco e após refrigeração e posterior aquecimento em banho-maria a 37 °C.

	Nº Observações	Tratamento 1 (in natura)	Tratamento 2 (Bolha)	Tratamento 3 (Mamadeira)
<b>Concentração (10<sup>6</sup>/ml)</b>	15	7730	-	-
<b>Turbilhão (1 - 5)</b>	15	4	-	-
<b>Motilidade (0 – 100%)</b>	43	82 ± 4,14 <sup>A</sup>	71±8,6 <sup>B</sup>	74±5,13 <sup>B</sup>
<b>Vigor (0 – 5)</b>	43	3,8±0,41 <sup>A</sup>	3,14±0,66 <sup>B</sup>	3,28±0,61 <sup>B</sup>
<b>DME (0 – 20%)</b>	43	1,86±2,87	1,5±1,99	1,71±2,30
<b>DMA (0 – 10%)</b>	43	5,06±1,90	4,64±1,69	4,35± 1,82

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si (P<0,05) pelo teste SNK.

Legenda: ME - Defeitos menores; DMA - Defeitos maiores.

Fonte: O autor

A média do volume dos ejaculados foi de 1,4 ml. A coloração variou do tom amarelo a amarelo-marfim, e odor “sui generis”. Normalmente o sêmen ovino tem uma coloração mais amarelada e consistência mais densa, isso é indicativo de uma maior concentração espermática (HAFEZ, 2004).

O armazenamento do sêmen ovino, em estado líquido, consiste em submetê-lo a temperaturas reduzidas, o que causa uma inibição reversível do metabolismo das células, sendo que, independente da temperatura de armazenamento, diluente e taxa de diluição, há uma maior redução na qualidade do sêmen, combinado a maior tempo de incubação. Assim, decréscimos na motilidade e vigor são inerentes à técnica.

O'Hara *et al.* (2010) incubaram o sêmen a °C e observaram que a viabilidade permaneceu relativamente constante, enquanto o sêmen incubado a 15°C teve resultado negativo significativo na motilidade espermática e viabilidade,

independente do diluente utilizado, sendo que ambas as amostras foram refrigeradas por até 72 horas.

Alguns trabalhos (PAULENZ *et al.* (2002)), também alcançaram resultados próximos ao compararem as temperaturas de 5 °C e 20 °C para preservação da efetividade do sêmen ovino em diluentes distintos. Notou-se que a temperatura interagiu com o diluente somente na motilidade espermática, não mostrando desigualdade quanto à integridade de membrana e de acrossoma, do mesmo modo que no teste hiposmótico e na capacitação. Todavia, todos os parâmetros abrangeram perda no decorrer do período de incubação, independente do diluente ou temperatura utilizada, verificando-se efeito prejudicial menor após elaboração do sêmen a 5 °C, em relação à temperatura de 20 °C. Os resultados argumentados comprovam com as informações de Menchaca *et al.* (2005), que, após IA cervical em tempo fixo com contemplação de estro, interpretaram que a utilização do sêmen ovino refrigerado durante 12 horas alcançou resultado equivalente ao obtido com sêmen fresco; contudo, após 24 horas de refrigeração, houve redução significativa na taxa de prenhez.

Embora alguns autores exibam que o processo de resfriamento de espermatozoides armazenados a 5 °C não ocasiona diminuição significativa na taxa de motilidade e nem na taxa de fertilização. Já outros, dizem que o congelamento dos espermatozoides leva à diminuição da permeabilidade da membrana plasmática, prejudica o metabolismo e altera gradientes iônicos (DELBARCO-TRILLO E ROLDAN, 2014). Fang *et al.*, (2016) demonstraram que o processo de congelamento reduz significativamente a fluidez, o potencial e a permeabilidade da membrana plasmática dos espermatozoides. Neste trabalho foi observado um declínio na motilidade espermática, indo de acordo com os resultados encontrados por outros autores.

Fang *et al.*, (2016) sugerem que mudanças na composição e distribuição dos fosfolípidios congelados por muito tempo pode ser responsável pela maior perda de funções dos espermatozoides.

No trabalho de Oliveira *et al.* (2007), eles constataram que a motilidade foi reduzindo conforme o tempo de armazenamento foi aumentando, independentemente de serem diluídos ou não. Quanto aos resultados após o resfriamento, foram obtidos distintos valores de motilidade, referentes ao diluente



utilizado e tempo de armazenamento. Em amostras diluídas em BTS® foram observadas motilidade espermática acima de 80% por um período de até três dias, não havendo diferença entre os períodos de resfriamento. Mesmo sendo este trabalho realizado em outra espécie, indica que as características de sêmen resfriado são avaliadas pelos mesmos critérios, levando em conta materiais e métodos utilizados para análise e processamento do mesmo.

A proporção de diluição do sêmen ovino condicionado sob refrigeração também é capaz de intervir na propriedade espermática. Posterior à manutenção do sêmen ovino a 4 °C perdurando oito dias, Kasimanickam *et al.* (2007) descreveram que a concentração de 50 milhões de spz/ml sucedeu em um índice maior de fragmentação de DNA após quatro dias de resfriamento, redução do percentual de células com alto potencial de membrana mitocondrial a começar do primeiro dia, com membrana intacta a partir do sexto dia de refrigeração e com motilidade progressiva a contar o primeiro dia, quando comparada à concentração de 200 milhões de spz/ml. Entretanto, a maior concentração espermática estabeleceu pequena interferência nos parâmetros da cinética, como VCL, ALH, STR e LIN, sem intervir nos parâmetros de VAP, VSL.

Outros autores (SALAMON e MAXWELL, 2000; AISEN *et al.*, 2005) afirmam que as maiores alterações decorrentes das metodologias de resfriamento e criopreservação observadas são a integridade morfológica, eventos estimulados pelo acúmulo de produtos do metabolismo, diminuição da motilidade, e, uma das mais prejudiciais, alteração no ROS que leva à diminuição do transporte e sobrevivência dos espermatozoides no trato genital feminino. Embora análises mais robustas não tenham sido realizadas, acredita-se que reduções nos parâmetros de motilidade encontrados neste trabalho devam-se a estes fatores. Estes podem ser minimizados, mas não abolidos.

A diferença constatada de motilidade, vigor, DME e DM entre os tratamentos avaliados (*in natura* x resfriamento - envolvido em plástico bolha e mamadeira contendo álcool absoluto), são decorrentes do processo de preservação, que consiste em reduzir a temperatura do sêmen.

O resfriamento de sêmen, especialmente no estado congelado, causa, na maioria das vezes, danos bioquímicos, funcionais, e ultra estruturais aos espermatozoides, conseqüentemente, há redução da viabilidade, dificultando o

transporte no trato reprodutivo feminino, resultando em prejuízos à fertilidade (LEBOEUF *et al.*, 2000).

A diferença de valores de motilidade, vigor, DME e DM, obtidos entre distintos métodos de resfriamento (plástico bolha x mamadeira contendo álcool absoluto), como observado na tabela 1, não foi de importância significativa, de forma que não houve a redução da viabilidade do sêmen em nenhum de ambos tratamentos. Todas as características dos espermatozoides tiveram seus valores mantidos dentro do aceitável para permitir seu transporte no trato reprodutivo feminino e posterior fertilização.

Os ejaculados submetidos aos métodos de resfriamento e posterior avaliação, repetidas vezes, foram considerados viáveis para inseminação artificial. A motilidade espermática no método do plástico bolha foi de 71%, enquanto na mamadeira foi de 74%, sendo que, seguindo a referência, o ideal é que seja igual ou acima de 60%. O vigor avaliado no plástico bolha foi de 3,14, enquanto na mamadeira 3,28, sendo que na referência utilizada preconiza-se um vigor igual ou maior que 3. Já os defeitos maiores devem ser 10% ou menos, sendo que foram detectados no método do plástico bolha apenas 4,64%, e no método da mamadeira 4,35% (Referências do Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 2013).

Não houve diferença significativa entre os métodos avaliados neste experimento (resfriamento das palhetas de sêmen envoltas no plástico bolha x dentro de mamadeira contendo álcool absoluto). Não foi observada vantagem no uso de um desses métodos em relação às outras formas de resfriamento de sêmen mais frequentemente utilizadas para esse fim.

No entanto, se faz necessária a realização de mais estudos e novos experimentos, com a utilização de maior número de testes, utilizando exames e técnicas mais acurados da viabilidade espermática, como também, buscar realizar a conclusão da preservação do sêmen, no caso, a criopreservação em si, já que neste trabalho só foi possível realizá-la em duas coletas, para verificar a fidedignidade da viabilidade do sêmen ovino após o processo de resfriamento, congelamento e descongelamento.

## CONCLUSÃO

Não foram observadas diferenças na viabilidade e integridade de espermatozoides ovinos, submetidos à refrigeração por meio do plástico bolha ou mamadeira contendo álcool 70%.

## AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi desenvolvido com o apoio e patrocínio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), por meio de bolsa de estudo de Iniciação Científica, e parceria com o Instituto Federal do Espírito Santo (IFES) Campus Itapina, que cederam os animais, espaço e microscópio para coleta e posterior processamento das amostras.

## REFERÊNCIAS

- AITKEN, R. J. The humanspermatozoa: a cellin crisis. **J Rreprod Fertil**, v.115, p.1-7, 1999.
- AITIKENS, R.; BENNETS. L. Reactive Oxygen Species: Friend Or Foe. In: DE JONGE, C.; BARRAT, C. **The sperm cell**: Production, maturation, fertilization, regeneration. Cambridge, Uk: Cambridge University Press, 2006. p.170-192.
- AISEN, E.; QUINTANA, M.; MEDINA, V.; MORELLO, H.; VENTURINO, A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa a cryopreserved with threalose – Based hypertonic extenders. **Cryobiology**, v.50, p.239-249, 2005.
- BAKER, M.; AITKEN, R. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. **Mol Cell Endocrinol**, v.216, p.47-54, 2004.
- BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C.; SILVA MAIA, M. S.; SOUSA, D. B.; RODELLO, L. Aspectos peculiares da inseminação artificial em ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, (Supl 1): p. 127-130, 2005.
- BITTENCOURT, R. F, *et al.* Avanços na criopreservação do sêmen ovino i: diluidores e crioprotetores. **Cienc. Anim. Bras.**, Goiania, v.14, n.4, out./dez. 2013, 523p.
- BEARDEN, J.; FUQUAY, J.; WILLARD, S. **Applied animal reproduction**. 6.ed. Upper Saddle River: Pearson-Prentice Hall, 2004. 427p.

CAMPUZANO, M. M.; SOLEILHAVOUPB, C.; TSIKISB, G.; MARTINEZ-PASTORA, F.; GRAAFF, S.P.; DRUART, X. Motility of liquid stored ram spermatozoa is altered by dilution rate independent of seminal plasma concentration. **Animal Reproduction Science**, v. 162, p. 31–36, 2015.

CARVALHO, F. P.; QUIRINO, C. R.; CARVALHO, C. S. P. *et al.* Características seminais de ovinos da raça santa Inês na região norte do estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira De Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.26, n.2, p.67-69 2002.

CASALI, R; PINCZAK, A; CUADRO, F; GUILLEN-MUÑOZ, J. M; MEZZALIRA, A; MENCHACA, A. Semen deposition by cervical, transcervical and intrauterine route for fixed-time artificial insemination (FTAI) in the ewe. **Theriogenology**, p.30-35, 2017.

CARVALHO, G. R; FÜRST, M. C. O.; RUAS, J. R. M.; BORGES, A. M.; MAFILLI, V. Efeito do resfriamento do sêmen equino sobre sua congelabilidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.5, p. 599-607, 2005.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte, 2013. 49p.

CHEMINEAU, P.; CAGNIÉ, Y.; GUÉRIN, Y.; ORGEUR, P.; VALLET, J-C. **Training manual on artificial insemination in sheep and goats**. Rome: Fao, 1991. 222p. (Fao Animal Production And Health, N.83).

CSEHA, S.; FAIGLA, V.; AMIRIDISB, G. S. Sêmen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v. 130, p. 187–192, 2012.

CUMMINS, J. M.; JEQUIERAM, KAN R. Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics, and oxidative stress. **Mol Reprod Dev**, v.37, p.345-362, 1994.

Câmara, D. R.; Guerra, M. M. P. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.35, n.1, p.33-40, jan./mar. 2011. Disponível em [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br).

DELBARCO-TRILLO, J.; ROLDAN, E. R. Effects of metabolic rate and sperm competition on the fatty-acid composition of mammalian sperm. **J Evol Biol**, v. 27, p.55-62, 2014.

DRUART, X.; COGNIÉ, J.; BARIL, G.; CLÉMENT, F.; DACHEUX, J. L.; GATTI, J. L. In vivo imaging of in situ motility of fresh and liquid stored ram spermatozoa in the ewe genital tract. **Reproduction**, v.138, p.45-53, 2009.

EL-ALAMY, M. A.; FOOTE, R. H. Freezability of spermatozoa from finn and dorset rams in multiple semen extenders. **Animal Reproduction Science**, v.65, p.245-254, 2001.

FANG, Y.; BLAIR, H.; ZHONG, R.; SUN, H.; ZHOU, D. Optimizing the freezing rate for ovine sêmen cryopreservation: phospholipid profiles and functions of the plasma membrane and quality and fertilization of spermatozoa. **Small Ruminant Research**, 2016.

FOOTE, R. H.; KAPROTH, M. T. Large batch freezing of bull semen: Effect of time of freezing and fructose on fertility. **Journal Dairy Science**, v.85, p.453-456, 2002.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. **Physiology of reproduction: Spermatozoa and seminal plasma**. Reproduction in Farm Animals. 6. ed. Philadelphia, USA: Lea e Febiger, 1993. p.165-187.

GHELLER, S. M. M. **Efeito da gelatina na refrigeração à 5°C do sêmen ovino**. (Dissertação) Universidade Federal De Pelotas, 2015.

GUIMARÃES, A. A. **Avaliação de diferentes diluentes na criopreservação de sêmen ovinos (ovis aries)**. Dissertação De Mestrado – Núcleo De Ciências Agrárias, Ufra, 2010, 14p.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008.

HOLT, W. V. Basic Aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-22, 2000.

KERSHAW, C. M.; KHALID, M.; MCGOWAN, M. R.; SUKANYA LEETHONGDEE, K. I.; WAX, G. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. **Theriogenology**, v. 64, p.1225–1235, 2005.

KANKOFER, M.; KOLM, G.; AURICH, J.; AURICH, C. Activity Of Glutathione Peroxidase, Superoxide Dismutase And Catalase And Lipid Peroxidation Intensity In stallion semen during storage at 5 degrees C. **Theriogenology**, v. 63 (5), p. 1354-65, 2005.

KUMAR, S.; MILLARJ, 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 cooled machines. **Cryobiology**, v.46, p.246-253, 2003.

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

MAIA, M. S.; MEDEIROS, I. M.; LIMA, C. A. C. Características reprodutivas de carneiros no nordeste do Brasil: parâmetros seminais. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.175-179, abr./Jun. 2011. Disponível Em [Www.Cbra.Org.Br](http://Www.Cbra.Org.Br)

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A.A. **Avaliação preliminar da fertilidade em carneiros de raça especializadas par corte em região semi-árida. congelação do sêmen**. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999,

Porto Alegre. Anais do simpósios e workshops. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1999.

MARTIN, G. B; WALKDEN-BROWN, S. W. Nutritional influences on reproduction in mature male sheep and goat. **J Reprod Fertil Suppl**, n.49, p.437-449, 1995.

MASOUDI, R.; SHAHNEH, A. Z; TOWHIDI, A; KOHRAM, H; AKBARISHARIF, A.; SHARAFI, M. Fertility response evaluation of artificial insemination methods in sheep with fresh and frozen thawed sêmen. **Cryobiology**, 2016.

NOTTER, D. R.; LUCAS, J. R.; MCCLAUGHERTY, F. S. Accuracy or estimation of testis weight from in situ testis measures in ram lambs. **Theriogenology**, Stonehan, v.15, n.3, p.227-234, 1981.

NORDSTOGAAB, S. L., ADNOY, T., PAULENZ, H. Effect of different packages and freezing / thawing protocols on fertility of ram semen. **Reprod Domest Anim**, v.44, p.527-531, 2009.

O'HARA, L.; HANRAHAN, J. P.; RICHARDSON, L.; DONOVAN, A.; FAIR, S.; EVANS, A. C. O.; LONERGAN, P. Effects of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. **Theriogenology**, v. 73, p. 541-549, 2010.

OLIVEIRA, A. V.; VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; FREITAS, R. T. F.; IZAÚ, Z. A. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.6, p.1509-1515, 2007.

OLIVEIRA, Giselle Dias. **Efeito de diferentes tempos de resfriamento pré-congelamentos na viabilidade espermática do sêmen descongelado de caprino**. Universidade Federal de Viçosa, abril de 2013.

PACHECO, A.; QUIRINO, C. R. Comportamento sexual em ovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.34, n.2, p.87-97, abr./jun. 2010. Disponível em [www.cbpa.org.br](http://www.cbpa.org.br)

PERIS, S. I; MORRIER, A.; DUFOUR, M.; BAILEY, J. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. **J Androl**, v.25, p.224-233, 2004.

PEREIRA DAS GRAÇAS, Carlos, *et al*. Metil - Formamida na criopreservação de sêmen ovino. **Cienc. Anim. Bras.**, Goiânia, v.14, n.4, out./dez. 2013, 482p.

SOUZA, J. A. T; CAMPELO, J. E. G; MACEDO, N, A; LEAL, T. M.; SOUZA, A, J; MEDEIROS, R, M; CHAVES, R, M. Biometria testicular, características seminais, libido e concentração de testosterona em ovinos da raça Santa Inês, criados a campo, na microrregião de campo maior, Piauí. **Ciênc. Vet. Tróp.**, Recife-Pe, v. 10, n. 1, p. 21 – 28, Janeiro/Abril, 2007.

SEAG - Secretaria De Estado Da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura E Pesca. **Pedeag 3** - 2015-2030. 2016. Acesso Em 11/05/2016:  
[Http://Www.Pedeag.Es.Gov.Br](http://www.pedeag.es.gov.br).

SILVA, A. E. D. F.; NUNES, J. Estacionalidade na atividade sexual e qualidade do sêmen nos ovinos deslanados das raças santa Inês e somalis. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.8, p. 207-214, 1987.

SIKKA, S. **Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function**. *Front Biosci*, v.1, p.78-86, 1996.

SÖDERQUIST, L.; MADRID-BURY, N.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. **Theriogenology**, v.48, p.115-1125, 1997.

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

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Anim Reprod Sci**, v.62, p.77-111, 2000.

JEREZ, R.; GONZÁLEZ, N.; OLACIREGUI, M.; LUÑO, V.; BLAS, I.; GIL, L. Use Of soy milk combined with different Cryoprotectants For Theram Sêmen. **Cryopreservation Small Ruminant Research**, v. 134, p. 34–38, 2016.

VALENTE, S. I. S. **Criopreservação de sêmen ovino**: comparação entre dois diluidores. Licenciatura Em Biologia - Universidade Lusófona De Humanidades E Tecnologias, 2007, 1p.

SOUSA, W. H.; LÔBO, R. N. B.; MORAIS, O. R. **Ovinos Santa Inês**: estado de arte e perspectivas. Embrapa Caprinos e Ovinos. CONGRESSO (ALICE), 2003.

WANG, X.; SHARMA, R. K.; GUPTA, A.; GEORGE, V.; THOMAS, A. J.; FALCONE, T.; AGARWAL, A. Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: A prospective observational study. **Fertil Steril**, v.80, suppl. 2, p.844-850, 2003.

WATSON P. F. The Causes Of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60/61, p.481-492, 2000.