

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DA PARAÍBA CAMPUS SOUSA**

BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CLARA DE ARAÚJO FIGUEIREDO

USO DE DILUENTES SEMINAIS NA
OVINOCULTURA

SOUSA – PB
MARÇO, 2023

CLARA DE ARAÚJO FIGUEIREDO

USO DE DILUENTES SEMINAIS NA
OVINOCULTURA

Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado, como parte
das exigências para a conclusão do
Curso de Graduação de
Bacharelado em Medicina
Veterinária do Instituto Federal da
Paraíba, Campus Sousa.

Dra. Patricy de Andrade Salles

Dr. Francisco Leo Nascimento de Aguiar

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DO IFPB CAMPUS SOUSA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Milena Beatriz Lira Dias da Silva – Bibliotecária CRB 15/964

F475u Figueiredo, Clara de Araújo
 Uso de diluentes seminais na ovinocultura / Clara de Araújo
 Figueiredo, 2023.
 43 p.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Patricy de Andrade Sales.
TCC (Bacharelado em Medicina Veterinária) - IFPB, 2023.

1. Caprinos. 2. Ovinos. 3. Caprinocultura. 4. Inseminação artificial. 5. Melhoramento genético de animais. I. Sales, Patricy de Andrade. II. Título.

IFPB Sousa / BC

CDU 619

Clara de Araújo Figueiredo

USO DE DILUENTES SEMINAIS NA
OVINOCULTURA

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: pela _____
Comissão Examinadora:

Orientadora:

Dra. Patricy de Andrade Salles
IFPB – SOUSA
Professora do Ensino Básico Técnico Tecnológico

Avaliadores:

Dr. Francisco Leo Nascimento de Aguiar
IFPB – SOUSA
Coordenador do HV-ASA

MSc. Danilo Lourenço de Albuquerque
IFPB – SOUSA
Especializando em Clínica de Grandes Animais

SOUSA – PB
MARÇO, 2023.

“Os nossos pais amam-nos porque somos seus filhos, é um fato inalterável. Nos momentos de sucesso, isso pode parecer irrelevante, mas nas ocasiões de fracasso, oferecem um consolo e uma segurança que não se encontram em qualquer outro lugar”.

Bertrand Russell

Dedico a conclusão deste ciclo a meus pais,
a Bernardo Roque e Agnus Weber,
que são minha luz guia,
À Bianca por todo apoio,
À Izadora por além de ser irmã também foi mãe.

“The memories of a man in his old age
Are the deeds of a man in his prime...”

(Free four – Pink Floyd)

Mãe e Pai, sem o apoio de vocês, eu jamais conseguiria conquistar tudo o que conquistei. Sem o amor de vocês, eu não saberia qual o significado de amor incondicional. Sem os cuidados de vocês, eu não teria a capacidade de cuidar sem esperar nada em troca. Sem vocês, eu seria tão pouco. Bernardo e Agnus, vocês são a realização de um sonho e com o incentivo de vocês realizo outro sonho, obrigada por serem combustível em minha vida.

RESUMO

O expressivo crescimento da ovino caprinocultura nacional tem demandado o aumento e difusão dos conhecimentos técnico-científicos nas áreas de nutrição, sanidade, melhoramento genético e reprodução, bem como de processos gerenciais da cadeia produtiva de leite, carne e pele, de forma a contribuir para o crescimento social e econômico do Brasil, através do aumento do lucro dos produtores, da maior oportunidade de empregos e renda no meio rural e a possibilidade do acesso constante do consumidor de produtos ovinos de alta qualidade, a preços compatíveis no mercado. Como ferramenta para o melhoramento genético temos a IA (inseminação artificial), entretanto há algumas dificuldades para obter bons resultados, um deles é a cérvix tortuosa das ovelhas, com isso busca-se o melhoramento dos diluentes seminais. Muitos estudos têm sido realizados para modificar diluentes de sêmen para proteger os espermatozoides durante o processo de congelamento-descongelamento. Na discussão do diluente de sêmen modificado para prevenção eficiente da qualidade do sêmen durante o congelamento, diferentes diluentes de sêmen têm sido usados para criopreservação de sêmen de carneiro nas últimas décadas. O sêmen de carneiro é particularmente suscetível ao choque de temperatura. O sucesso da criopreservação do sêmen de carneiro depende de diluentes, diluição resfriamento, congelamento e do protocolo de descongelamento.

Palavras-chave: sêmen, carneiros, reprodução.

ABSTRACT

The significant growth of national goat sheep farming has demanded the increase and diffusion of technical-scientific knowledge in the areas of nutrition, health, genetic improvement and reproduction, as well as management processes of the milk, meat and skin production chain, in order to contribute to the social and economic growth of Brazil, through the increase of the profit of producers, the greater opportunity for jobs and income in rural areas and the possibility of constant consumer access to high-quality sheep products at compatible prices in the market. As a tool for genetic improvement we have AI (artificial insemination), however there are some difficulties to obtain good results, one of them is the tortuous cervix of sheep, with this we seek the improvement of seminal diluents. Many studies have been conducted to modify semen diluents to protect sperm during the freeze-thawing process. In the discussion of the modified semen diluent for efficient prevention of semen quality during freezing, different semen diluents have been used for cryopreservation of sheep semen in recent decades. Sheep semen is particularly susceptible to temperature shock. The success of cryopreservation of sheep semen depends on diluents, dilution cooling, freezing and the thawing protocol.

Keywords: semen, rams, reproduction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Espermatozoides de diferentes espécies.....	26
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características seminais de pequenos ruminantes.....	24
Tabela 2 - Circunferência escrotal de carneiros.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACP102	água de coco em pó
BSA	albumina sérica bovina
BSP	proteínas do plasma seminal bovino
°C	graus celsius
Ca ⁺⁺	cálcio
Cm	centímetro
IA	inseminação artificial
µm	micrômetro
EG	etilenoglicol
FSH	hormônio folículo-estimulante
GLY	glycerol
IgA	imunoglobulina a
K ⁺	potássio
Kg	kilograma
L	Litro
LH	hormônio luteinizante
Min	minutos
mOsm	miliosmo
ml	mililitros
Na ⁺	Sódio
TES	n-tris (hidroximetil) metil 2-aminoetanosulfônico
TRIS	trishidroximetil-aminometano
LDL	lipoproteína de baixa densidade
PVP	polivinilpirrolidona
ROS	espécies reativas de oxigênio

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	14
2.0 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 Temperatura de resfriamento para a preservação do sêmen	17
2.2 Criopreservação do sêmen	17
2.3 Fatores que determinam a sobrevivência do sêmen criopreservado	19
2.4 Técnicas de criopreservação	19
2.5 Principais componentes crioprotetores	19
3.0 METODOLOGIA CIENTÍFICA	20
4.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
4.1 Ovinocultura e inseminação artificial	20
4.1.1 Parâmetros reprodutivos de carneiros.....	22
4.1.2 Espermatozoide.....	25
4.1.3 Plasma seminal.....	26
4.1.4 Conservação do sêmen ovino.....	27
4.2 DILUENTES SEMINAIS	29
4.2.1 TRIS-gema de ovo.....	30
4.2.2 TRIS-leite	31
4.2.3 TRIS-Citrato de sódio.....	32
4.2.4 BSA (Albumina sérica bovina).....	34
4.2.5 ACP-102.....	35
5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1.0 INTRODUÇÃO

A ovinocultura se define pela criação de ovinos nos diferentes tipos de sistema como: sistema extensivo, semi-intensivo e intensivo. Com isso o produtor precisa principalmente utilizar de estratégias, no sentido de promover o desenvolvimento dos animais em algumas regiões principalmente, quando se leva em consideração a escolha de raças adaptadas a determinado ambiente exposto a elas. Em 2020 o rebanho ovino no Brasil apresentou um crescimento de 3,3% em relação ao efetivo registrado em 2019, totalizando 20.628.699 cabeças. Utilizando como período de análise o período de cinco anos vê-se que foi a segunda maior taxa de crescimento do período. Em relação às regiões tem-se a região Nordeste com uma participação de 70,6% do rebanho total de ovinos no Brasil. (EMBRAPA, 2021)

O crescimento da ovinocultura nacional tem demandado o aumento e difusão dos conhecimentos técnico-científicos nas áreas de nutrição, sanidade, melhoramento genético e reprodução, bem como de processos gerenciais da cadeia produtiva de leite, carne e pele, de forma a contribuir para o crescimento social e econômico do Brasil, através do aumento do lucro dos produtores, da maior oportunidade de empregos e renda no meio rural e a possibilidade do acesso constante do consumidor de produtos e ovinos de alta qualidade, a preços compatíveis no mercado. (Andrioli et al, 2003)

Dentro do panorama do crescimento econômico mundial a pesquisa e a implementação de biotécnicas da reprodução é de suma importância no aumento do desfrute e da rentabilidade do agronegócio de pequenos ruminantes, obtendo-se animais geneticamente superiores quanto a produtividade, a fertilidade e a resistência a doenças. “A pesquisa deve sempre estar um passo à frente da demanda dos proprietários por novas tecnologias” (Pinheiro, 2002). Dentro desta perspectiva, haverá ampla necessidade de se assistir à reprodução destes animais seja para permitir aumento da eficiência reprodutiva e/ou produtiva dos rebanhos, seja para multiplicação mais de genótipos superiores (Fonseca, 2005). eficiente

Com o advento das biotecnologias, principalmente as reprodutivas, tornou-se possível a utilização de novas ferramentas no processo de melhoramento animal. Aliadas

a metodologias tradicionais, as novas técnicas tendem a incrementar ainda mais o progresso genético que vem sendo observado nos animais domésticos. Assim, as biotécnicas ligadas à reprodução têm auxiliado no melhoramento genético animal da espécie ovina e caprina no que se refere a seleção e reprodução mais eficientes. As tecnologias reprodutivas, como a inseminação artificial e a ovulação múltipla e transferência de embriões, podem ser utilizadas para aumentar a prolificidade do rebanho e, conseqüentemente, refletem na intensidade de seleção e nos ganhos genéticos (Nunes, 2010).

A inseminação artificial (IA) na ovinocultura nacional é uma prática pouco difundida, e apresenta resultados técnicos não satisfatórios que demandam de mais pesquisas científicas na área de reprodução animal, principalmente quando se utiliza sêmen congelado. Uma das dificuldades técnicas de inseminação em relação a fêmea, é a dificuldade de transpor a cérvix devido a sua anatomia, assim, é necessário o uso de laparoscopia para a deposição do sêmen dentro do útero, tornando essa técnica muito laboriosa. Quando se utiliza sêmen fresco ou refrigerado, pode-se optar pela inseminação artificial com a deposição do sêmen na entrada da cérvix, simplificando a técnica e viabilizando a sua utilização (Corandin, 2011). As IA's. com sêmen fresco ou refrigerado ao serem comparadas a com sêmen congelado, apresentam maiores chances de popularização, por requererem técnicas menos sofisticadas de deposição do sêmen no genital feminino, requerem equipamentos menos onerosos e menor rigor na cronologia do momento de inseminação (Bicudo et al., 2005).

Considerando a viabilidade de uso do sêmen fresco, refrigerado e congelado na IA de pequenos ruminantes, faz-se ainda necessário o aperfeiçoamento dos processos de tecnologia de sêmen, principalmente quanto ao uso de diluentes, tal como: avaliar melhor os meios diluidores para preservar, por um maior período de tempo, as características dos espermatozoides e sua capacidade fertilizante. Neste contexto esta revisão propõe explanar sobre as principais características do sêmen ovino e abordar diferentes diluentes e suas eficiências.

2.0 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Muitos trabalhos têm sido realizados na tentativa de melhorar a capacidade fertilizante do sêmen ovino congelado e refrigerado que ainda apresentam resultados insatisfatórios quando utilizado *in vivo*. Após a diluição e refrigeração ocorrem danos provocados nas células espermáticas que reduzem a motilidade e rompem a integridade das membranas dos espermatozoides. Estas alterações interferem significativamente na sobrevivência e capacidade fecundante dos espermatozoides (Martin, 1968; Maxwell & Watson, 1996).

Com o objetivo de encontrar um diluente com maior capacidade preservadora, diversas fórmulas têm sido propostas para sua conservação quando mantido a 5°C. Dentre os diluentes naturais destaca-se o leite de vaca utilizado na forma integral, desnatado, reconstituído e mais comumente ultrapasteurizado (Evans & Maxwell, 1987). Os diluentes sintéticos contêm TRIS ou citrato como tampões, glicose ou frutose como fonte de energia e gema de ovo contra os choques térmicos. Petruzzi et al., (1976), observaram que o TRIS e citrato foram superiores aos diluentes a base de leite após 24 horas de armazenamento a 5°C. Desde 1961, Schindler & Amir (1961) relatavam que a glicina acrescida nos diluentes promovia um benefício na longevidade dos espermatozoides.

Os diluentes seminais têm a função de proteger a membrana do espermatozoide contra os danos provocados pelo choque térmico e pelas injúrias causadas durante o transporte, além de fornecer nutrientes como fonte de energia, ter efeito tamponante, manter a pressão osmótica (285 mOsm) e aumentar o volume do ejaculado, a fim de obter múltiplas doses inseminantes (Verstegen et al., 2005; Aisen, 2008). Os diluentes atuais oferecem uma boa proteção à célula espermática, entretanto, com os últimos avanços nas técnicas de fecundação, tornou-se possível inferir a baixa fertilidade do sêmen resfriado, fundamentalmente à composição dos diluentes, que podem favorecer modificações na distribuição e nas características dos componentes da membrana que cobrem o espermatozoide, resultando na sua desestabilização. Este tipo de problema, está correlacionado ao aumento de fluidez da bicamada lipídica da membrana, o que a torna mais permeável (Silva, 2007).

Muitos estudos têm sido realizados para modificar diluentes de sêmen para proteger os espermatozoides durante o processo de congelamento-descongelamento. Na discussão do diluente de sêmen modificado para prevenção eficiente da qualidade do sêmen durante o congelamento, diferentes diluentes de sêmen têm sido usados para criopreservação de sêmen de carneiro nas últimas décadas (Watson, 2000). A qualidade do esperma pós-descongelamento é reduzida devido à ocorrência de choque frio e estresse osmótico durante o processo de congelamento-descongelamento (Salamon & Maxwell, 2000). A maior parte desses danos pode ser prevenida por extensores adequados e aditivos crioprotetores (Gil et al., 2003; Barbas & Mascarenhas, 2009).

2.1 Temperatura de resfriamento para a preservação do sêmen

Os esforços científicos para melhorar a qualidade do sêmen congelado-descongelado e a capacidade fertilizante são classificados em duas grandes categorias: a) modificações e especificidades dos métodos de congelamento, protocolos e embalagem do sêmen, b) aditivos e modificação dos diluentes. Em resumo, o processo comum de congelamento do sêmen ovino inclui a coleta do sêmen, duas etapas de diluição por diluidores suplementados com gema de ovo (primeira etapa) e glicerol (segunda etapa), resfriamento a uma temperatura próxima a 5°C e equilíbrio por algum tempo para reduzir a atividade metabólica celular e aumentar a vida útil dos espermatozoides. O sêmen é embalado em palhetas de 0,25 e 0,5 ml para congelamento e armazenamento, ou congelado como pellets em depressões rasas em gelo seco (Ritar & Ball, 1993). As palhetas são colocadas acima dos vapores de nitrogênio líquido ou em uma máquina de congelamento biológico programável. No primeiro método tradicional, a taxa de congelamento é regulada pela distância entre as palhetas e o nível de nitrogênio líquido. Assim, aconselha-se colocar 4-6 cm acima da superfície do nitrogênio líquido, pois o sêmen está sendo resfriado de acordo com uma curva em forma de parábola (Salamon & Maxwell, 2000)

2.2 Criopreservação do sêmen

O sêmen de carneiro é particularmente suscetível ao choque de temperatura. O sucesso da criopreservação do sêmen de carneiro depende de diluentes, diluição resfriamento, congelamento e do protocolo de descongelamento. Vários diluentes como TRIS, Andromed® amplamente utilizado para congelamento de esperma de carneiro,

dentre outros. O diluente mais comum para congelamento de sêmen ovino é à base de TRIS, sendo gema de ovo e glicerol os principais componentes adicionados. A proporção de gema de ovo e glicerol depende da composição do diluente, protocolo de resfriamento e congelamento. No entanto, a proporção de gema de ovo entre 5 e 20% e glicerol entre 3 e 7% têm sido utilizadas. O glicerol pode ser adicionado ao sêmen no método de uma etapa ou método de duas etapas. No método de uma etapa, o diluente com glicerol é adicionado como uma fração inteira ao sêmen entre 34 e 37°C e resfriado gradualmente (-0,2°C a -0,3°C/min) a 4-5°C em 2 h e deixado nesta temperatura por 2 h para equilíbrio. No método de duas etapas, a fração de glicerol é adicionada a 4-5 °C. A adição de fração de glicerol a 4-5°C resulta em melhor sobrevivência do esperma do que a 30°C.

2.3 Fatores que determinam a sobrevivência do sêmen criopreservado

Sabe-se que a criopreservação do sêmen das espécies domésticas é um processo complexo que envolve o balanço de muitos fatores tendo em vista a obtenção de resultados satisfatórios. Para garantir o sucesso da criopreservação é necessário ter o conhecimento não somente do diluente e do crioprotetor apropriado, das taxas de diluição, resfriamento ou descongelação, mas também o conhecimento da própria fisiologia espermática da espécie, que é essencial para a recuperação espermática máxima após a descongelação, e, conseqüentemente, para a obtenção de melhores taxas de fertilidade (Purdy, 2006).

A velocidade de redução da temperatura durante o congelamento tem sido um dos fatores mais importantes no processo de criopreservação, visto que o grau de lesões celulares depende da curva de resfriamento (Watson, 1995). O choque térmico pelo frio, nas membranas espermáticas, é mais pronunciado quando o resfriamento ocorre rapidamente na faixa de temperatura entre 20 e 0°C. Watson (1995) relatou que a faixa crítica está entre 12 e 2°C; Quinn et al., 1980, entre 15 e 0°C, e Moran et al. (1992), entre 19 e 8°C. Menores taxas de resfriamento do sêmen até 4- 6°C são mais benéficas para as membranas espermáticas (VARNER et al., 1988; MORAN et al., 1992).

2.4 Técnicas de criopreservação

Realizado o exame físico do ejaculado, a amostra deve ser pré-diluída em um tubo graduado, na proporção de uma parte de sêmen para duas partes de meio diluidor (1:3).

O diluidor e o tubo devem ser aquecidos em banho-maria a 37°C, previamente à diluição inicial, a fim de proteger o sêmen durante a manipulação. Então, avalia-se a motilidade espermática e vigor por meio de microscopia óptica, com aumento de 200 a 400X, com o intuito de verificar possíveis alterações nas características seminais durante o processo de diluição. Após procedida a concentração espermática, por contagem em câmara de Neubauer, é calculado o número de doses (100 milhões de espermatozoides/dose) e realizado o ajuste do volume final do diluidor a ser adicionado. Seguindo-se a diluição final. O diluidor de congelação deve ter como concentração final 6% de glicerol e 20% de gema de ovo. Feito o envase do sêmen diluído nas palhetas, essas são encaminhadas para o resfriamento conforme Barbosa (1999). Nesse caso, as palhetas devem ser colocadas horizontalmente sobre plataformas de isopor, dentro de uma geladeira de 280L, com temperatura interna estabilizada entre 4 e 5°C. Assim, as amostras são submetidas a uma curva de resfriamento de -1,07°C/min, em que, após, aproximadamente, 30min as amostras chegavam a temperatura de 5°C.

2.5 Principais componentes crioprotetores

Segundo Gibbons (2002), é imprescindível na composição de um diluente usado para a congelação do sêmen caprino uma substância tampão como o Tris, sais como o citrato de sódio, um ou mais açúcares (glicose, frutose, lactose, rafinose ou trealose), crioprotetores penetrantes (glicerol, etilenoglicol ou dimetilsulfóxido) e não-penetrantes (leite ou gema de ovo) além de antibióticos, sendo a penicilina e a estreptomicina os mais utilizados. Um dos diluentes mais utilizados para sêmen de pequenos ruminantes é o Tris, ácido cítrico, frutose, gema de ovo e glicerol (Neves et al., 2008).

O Tris (Trishidroximetil-aminometano - $H_2NC(CH_2OH)_3$) é uma substância solúvel em água, disponível comercialmente em um alto grau de pureza na forma de cristais. Ele permanece estável em temperatura ambiente por diversos meses, atuando como tampão iônico bipolar em pH entre 7,0 e 9,0 (McPhail & Goodman, 1984). De acordo com Purdy (2006), além do Tris, diluentes à base de leite em pó desnatado também são muito utilizados, entretanto o primeiro confere os melhores resultados de motilidade após a descongelação (Deka & Rao, 1987).

Muitos crioprotetores penetrantes (glicerol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, etilenoglicol, propilenoglicol) e suas combinações têm sido testadas para o sêmen de pequenos ruminantes, todavia, o crioprotetor penetrante mais frequentemente utilizado

continua sendo o glicerol (Purdy, 2006; Bezerra, 2009). Já segundo Pereira et al., 2022, o uso da água de coco e gema de ovo como diluente de sêmen proporciona melhor desempenho ao longo de 48 horas para as características motilidade, vigor e turbilhonamento.

3.0 METODOLOGIA CIENTÍFICA

Este trabalho trata-se de uma revisão de literatura sobre uso de diluentes seminais na ovinocultura e suas diferentes características. A partir disso é possível comparar características e eficácias dos diferentes diluentes de acordo com pesquisas realizadas anteriormente, e com isso compilar estas informações para nortear a escolha de um bom diluente. No total se procedeu a análise de artigos científicos. Foram pesquisados artigos científicos nos sites PubMed, ResearchGate, Google Acadêmico e Scielo.

4.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Ovinocultura e inseminação artificial

Segundo Vilela (2020), os primeiros ovinos que chegaram ao país foram trazidos pelos colonizadores, provenientes de Portugal, data-se dos anos iniciais da colonização (1534). Rapidamente esses animais se espalharam e multiplicaram-se, formando os primeiros rebanhos. Por se tratar de um país com grandes dimensões territoriais e climáticas, os ovinos começaram a passar por um processo natural de seleção, se adaptando as diferentes condições de ambiente e conseqüentemente alterando algumas de suas características específicas, como o porte, o número de crias por parto, resistência a parasitas e doenças, atividade sexual precoce, rusticidade a diferentes condições extremas e não estacionalidade reprodutiva. Entretanto, apesar de todas essas características que contribuíram para a resistência, pouca exigência, sobrevivência e perpetuação das raças, esses animais ainda apresentam baixos níveis de produtividade a nível nacional. Dentre os pontos positivos para a criação de ovinos está o fato de os animais serem altamente adaptáveis a sistemas de produções variados, sejam eles familiares e extensivos ou sofisticados e intensivos. Outro fator se refere ao ciclo produtivo e reprodutivo relativamente curto, com animais podendo ser abatidos a partir dos três meses de idade.

A precocidade também contribui para o ciclo mais rápido, sendo que machos e fêmeas podem ser acasalados a partir dos seis meses. O período de gestação de cinco meses e meio, aliado a um curto puerpério tornam ainda mais dinâmicos os sistemas de

criação destes animais. Por fim, a elevada prolificidade garante produção adicional de filhotes ao longo da vida reprodutiva das fêmeas (Fonseca et al., 2007). Sabe-se que, aliada a biotécnicas reprodutivas, o melhoramento genético pode incrementar e melhorar a produtividade do rebanho ovino, torná-lo mais resistente a doenças, dentre outros, como chegar a reduzir custos para o produtor

Algumas técnicas de biotecnologias reprodutivas podem agir para dar impulso a esses benefícios. (Corsino, [s.d.]). Várias biotecnologias como a criopreservação de gametas masculinos e a inseminação artificial vêm sendo desenvolvidas e aplicadas à criação de ovinos, com o intuito de fornecer subsídios para o crescimento efetivo da ovinocultura na região Nordeste brasileiro.

Em relação aos procedimentos convencionais de criopreservação de sêmen, sabe-se que os espermatozoides ao serem criopreservados sofrem devido ao uso dos crioprotetores, alterações químicas e físicas nas membranas espermáticas extra e intracelulares. Estas mudanças são atribuídas em parte, a alterações na transição da fase lipídica e/ou aumento na peroxidação (Purdy, 2006), durante os processos de congelamento/descongelamento. Uma das consequências destas modificações é a redução na porcentagem de espermatozoides móveis, velocidade e capacidade fertilizante (Isachenko et al., 2004).

Em relação ao uso IA na pecuária nacional, trata-se de uma tecnologia valiosa e de alto impacto na indústria de ruminantes, além de facilitar o comércio internacional de machos e a conservação de recursos genéticos. Dentre as biotecnologias utilizadas para a otimização da reprodução animal, a inseminação artificial é a mais antiga e a que mais rapidamente corrobora com a produção de animais superiores. Na ovinocultura, a I.A. tem contribuído consideravelmente, uma vez que proporciona a disseminação de genética de genótipos superiores, e vem promovendo a padronização de animais geneticamente privilegiados nas propriedades produtoras de ovinos, e facilitando um maior controle reprodutivo do rebanho, principalmente quando a IA é em tempo fixo (Salgueiro & Nunes, 2012; Casali et al., 2017).

A inseminação artificial pode ser realizada de variadas formas que incluem desde a colocação do sêmen na vagina, semelhante ao acasalamento natural ou a deposição do sêmen no corno uterino. De acordo com o local de deposição do sêmen, a inseminação

pode ser vaginal, cervical superficial, intracervical, intrauterina efetuada no corpo do útero ou intrauterina efetuada no corno uterino. Quanto mais próxima do local de fertilização (ampola da tuba uterina) for a deposição do sêmen, maior será a taxa de gestação resultante. (EMBRAPA, 2014).

Espermatozoides criopreservados têm menor habilidade de penetrar no muco cervical e por isso, quando do seu uso, as taxas de prenhez após I.A. com deposição vaginal profunda ou cervical superficial são menores que as obtidas por monta natural, estando em torno de 25% (Mortimer & Maxwell, 2004). Apesar dessa baixa taxa de sucesso, a IA na ovinocultura vem apresentando muitas vantagens, dentre elas, a facilidade do uso de sêmen congelado que pode ser armazenado e utilizado em várias propriedades simultaneamente o que permite o intercâmbio deste material entre propriedades, bem como permite utilizar os reprodutores em um número muito maior de fêmeas do que aquele que seria obtido em regime de monta natural. (Xavier et al, 2009).

4.1.1 Parâmetros reprodutivos de carneiros

A capacidade reprodutiva dos mamíferos depende da produção de espermatozoides viáveis e da sua adequada deposição na genitália feminina próximo ao momento da ovulação. Embora a libido também seja importante, a produção espermática é o fator chave, podendo ser afetada por diversos fatores, tais como: o tamanho testicular, a idade, o peso corporal, a época do ano, agentes exógenos, administração de esteroides, exercício e a frequência de ejaculação (Berndtson, 2014). A contribuição de machos para a eficiência reprodutiva e produtiva é de grande importância, uma vez que, além do fator genético, estes podem ser selecionados com maior eficiência que as fêmeas, devido ao maior potencial de gerar descendentes (Salgueiro, 2000).

A inclusão das características biométricas testiculares no processo de seleção de reprodutores ocorre, principalmente, em decorrência de sua correlação positiva com a fertilidade dos machos (Rege et al., 2000). A evidência de correlação entre circunferência escrotal e características reprodutivas em ovinos, resultou de estudos em ovinos jovens desenvolvido por Land (1973), o qual reforça a teoria de que a expressão dessas características está geneticamente correlacionada. (Santana et al., 2001).

Tradicionalmente, fazem parte do processo de seleção e avaliação de reprodutores a medição das características biométricas testiculares: perímetro escrotal, largura e

comprimento testicular (Notter et al., 1981). Segundo Bailey et al. (1998), o volume testicular constitui uma medida mais representativa da produção espermática que o perímetro escrotal, principalmente naqueles machos que possuem testículos com formato mais alongado (Bailey et al., 1996).

Embora, a circunferência escrotal seja um excelente indicativo da potencialidade reprodutiva, seus valores não devem ser ajustados à média de peso corporal, quando são comparados animais de diferentes idades. Estes dados sugerem que se deve considerar, tanto o peso corporal quanto à idade para a seleção de reprodutores potencialmente férteis (Moraes & Oliveira, 1992; Souza et al., 2005). Uma outra informação adicional que deve ser anotada para auxiliar no diagnóstico da aptidão reprodutiva é o tipo de alimento está sendo administrado aos carneiros (volumoso e/ou concentrado) e em que quantidade. Isto em função de ter sido relatada menor percentagem de espermatozoides normais em propriedades em que os carneiros recebiam maior quantidade de ração concentrada na sua dieta (Moraes & Oliveira, 1997).

O aparelho genital do macho é constituído pelos testículos, epidídimos, escroto, canal deferente, glândulas acessórias, pênis e prepúcio. O testículo tem duas funções principais – produzir os gametas masculinos (espermatozoides) e os hormônios sexuais masculinos ou andrógenos, entre eles a testosterona, que é responsável pelo desenvolvimento das características sexuais secundárias e pelo comportamento sexual. O tamanho dos testículos varia com a idade, peso corporal e estação do ano. No carneiro adulto e saudável, os testículos atingem cerca de 200-300 gramas cada e no bode cerca de 100-150 gramas. Isso é importante porque o número de espermatozoides produzidos é correlacionado com o tamanho do testículo. (Maia & Nogueira, 2019).

Em geral, dependendo da raça e do regime de manejo, os machos ovinos, já podem ser usados a partir dos seis - oito meses de idade, tanto como doadores de sêmen ou em monta natural. Entretanto, cuidados devem ser tomados quanto ao treinamento para aceitarem e ejacularem em vagina artificial e ao número de colheitas de sêmen por semana, bem como, quando usados para cobertura, ao número de fêmeas por macho, isto é, a relação macho:fêmeas; à nutrição dos indivíduos, que deve ser de boa qualidade; ao regime de monta, se no capril ou ovil ou a campo. Neste último caso, considerar a topografia das áreas de pastejo; a taxa de lotação; o porte e a experiência sexual dos indivíduos fêmeas e machos expostos à estação de monta, dentre outros aspectos.

(Simplício & Santos, 2005). Normalmente, o volume seminal está em torno de 1,0 ml, o aspecto de leitoso à cremoso e a coloração de branco à pérola. O sêmen deve apresentar aspecto variando de leitoso a cremoso, estando relacionado à concentração espermática (CBRA, 1998).

O aspecto do sêmen constitui-se em importante parâmetro na determinação diagnóstica de algumas patologias do aparelho reprodutor, haja vista que alterações desta característica correspondem à presença de elementos estranhos como sangue, pus e urina que, por sua vez, afetam a viabilidade dos espermatozoides (SORRIBAS, 1995). O volume do ejaculado de pequenos ruminantes é relativamente pequeno, podemos observar algumas características seminais na Tabela 1 com maior clareza.

Tabela 1. Características seminais de pequenos ruminantes.

Característica Seminal	Ovinos	Caprinos
Volume (mL)	0,5–3,0	0,5–1,5
Cor	Branco ou marfim	Marfim ou amarelada
Concentração	1-3 x 10 ⁹ /mL	2-5 10 ⁹ /mL
Total de espermatozoides / ejaculado	3 a 5 x 10 ⁹	3 a 5 x 10 ⁹
Motilidade (%)	≥80	80 (70-90)
Vigor (0 a 5)	≥3	≥3
Motilidade massal (0-5)	≥3	≥4
Espermatozoides normais (%)	≥80	≥80

Fonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013).

Entre duas e oito semanas de vida, o volume testicular de cordeiros é de cerca de 1,5cm³, ocupado em cerca de 50% pelos túbulos seminíferos, os quais apresentam um diâmetro médio de 50µm. O epitélio seminífero é composto por células de Sertoli indiferenciadas e pré-espermatogônias I, localizadas no centro dos túbulos seminíferos. Entre oito e treze semanas, o volume testicular atinge 5cm³, com os túbulos ocupando ainda 50% do volume, mas o diâmetro tubular mede cerca de 60µm. No período compreendido entre treze e dezoito semanas de idade, o volume testicular ultrapassa 15cm³, com cerca de 60% ocupados pelos túbulos seminíferos. O diâmetro tubular evolui para 80µm. As células de suporte já apresentam características típicas das células de

Sertoli, e formam as primeiras junções entre si, ainda incompletas (Steger & Wrobel, 1996).

Por ocasião da puberdade, com aproximadamente dezoito a vinte e quatro semanas, a circunferência escrotal atinge cerca de 18 cm (Souza et al., 2001). O volume testicular supera os 25cm³ e o diâmetro tubular ultrapassa 100µm, ocupando cerca de 63% do volume da gônada. As células de Sertoli param de multiplicar-se e se diferenciam (Hochereau-de-Reviere et al., 1987). Segundo Pugh (2005) a circunferência mínima para carneiros jovens é de 30 centímetros (cm), que pesem acima de 68 quilogramas (kg), 33cm para carneiros com 12 a 18 meses, 36cm para carneiros que pesem acima de 110kg, conforme especificado na tabela 2. A circunferência escrotal pode ter variações conforme a época do ano, pois fora da estação reprodutiva é de se esperar medidas testiculares menores (0,5 a 1,5cm menor).

Tabela 2. Circunferência escrotal de carneiros.

8 a 14 meses		Acima de 14 meses de idade	
Tamanho	Classificação	Tamanho	Classificação
Menor que 28cm	Questionável	Menor que 32cm	Questionável
28 a 36cm	Satisfatório	32 a 40cm	Satisfatório
Maior que 36cm	Excepcional	Maior que 40cm	Excepcional

Fonte: Adaptado de Yarney T. A. et al., citado por Pugh (2005).

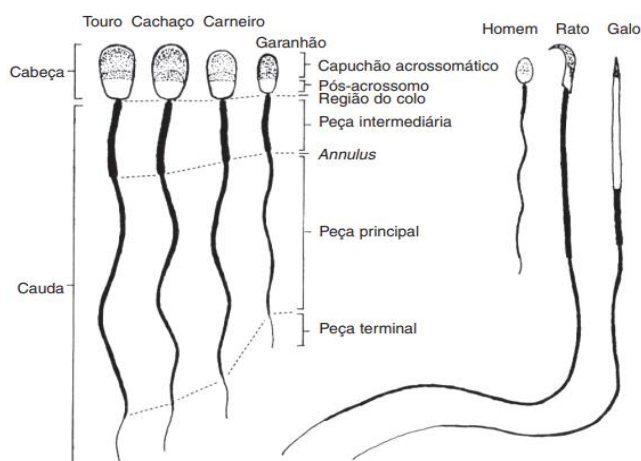
4.1.2 Espermatozoide

Segundo Derivaux (1980) citado por Medeiros (2004) o espermatozoide é dividido em cabeça, acrossomo e cauda, possíveis de serem visualizadas utilizando técnicas de colorações. Hafez (2004) cita que a cabeça do espermatozoide é achatada de forma oval, contendo no seu interior cromatina altamente condensada. O acrossomo é uma estrutura que recobre a extremidade anterior do núcleo espermático apresenta-se em forma de dupla camada de membranas contendo enzimas hidrolíticas envolvidas no processo de fertilização. O autor ainda cita que a cauda está dividida em colo, peça intermediária, principal e terminal. Está assim dividido conforme estruturas que cada peça apresenta distintamente, o colo que constitui o ponto de união da cabeça com a cauda propriamente

dita do espermatozoide, formando uma depressão no citoplasma; a parte central da peça intermediária junto com o comprimento total da cauda forma o axonema.

O axonema é formado de nove pares de microtúbulos situados ao redor de dois filamentos centrais, sendo que estes estão circundados por nove fibras grosseiras nesta região e recobertos perifericamente por numerosas mitocôndrias (bainha mitocondrial); a peça principal constitui centralmente do axonema e o conjunto de fibras grosseiras; e finalmente a peça terminal contém apenas o axonema central recoberta pela membrana plasmática (plasmolema) (Mies Filho, 1987). Na Figura 1 a seguir é possível ver a ilustração e comparação dos espermatozoides de diferentes espécies.

Figura 1. Espermatozoides de diferentes espécies.



Fonte: Hafez, 2004.

4.1.3 Plasma seminal

O plasma seminal é fluido composto por secreções oriundas dos testículos, epidídimos e glândulas sexuais acessórias (ampolas, glândulas vesiculares e bulbo-uretrais), que influenciam a capacidade de fertilização dos espermatozoides. Suas funções incluem o transporte dos espermatozoides durante a ejaculação, ativação de espermatozoides imóveis, manutenção de sua viabilidade no sistema reprodutivo feminino (Evans & Maxwell, 1987), prevenção de capacitação prematura e proteção das células espermáticas contra a peroxidação lipídica.

Além disso, o fluido seminal é o fluido natural para a maturação espermática, que ocorre ao longo do trânsito epididimal, através de mecanismos enzimáticos e hormonais

(Miller et al., 1990; Yanagimachi, 1994; Lasserre et al., 2001; Schönech et al., 1996; Yanagimachi, 1994 apud Souza, 2003). Segundo Hafez (2004) o plasma seminal raramente contém altos níveis de ácido cítrico, ergotioneína, frutose, glicerilfosforilcolina e sorbitol. Quantidades apreciáveis de ácido ascórbico, aminoácidos, peptídeos, proteínas, lipídeos, ácidos graxos e numerosas enzimas também estão presentes. Constituintes antimicrobianos, incluindo imunoglobulinas da classe IgA, fazem parte do plasma seminal. Além disso, uma variedade de substâncias hormonais incluindo andrógenos, estrógenos, prostaglandinas, FSH, LH, material semelhante à gonadotrofina coriônica, hormônio do crescimento, insulina, glucagon, prolactina, relaxina, hormônio liberador da tireóide e encefalinas tem sido também detectada no plasma seminal.

O plasma seminal também atua modulando a reação acrossômica, evitando que esta ocorra prematuramente, o que levaria a falhas na fertilização. Isto ocorre devido aos “fatores descapacitantes” presentes no plasma seminal que previnem o desencadeamento do processo de capacitação dos espermatozoides por meio da estabilização da membrana plasmática, tanto pela maturação da razão colesterol/fosfolipídios quanto pelo bloqueio da calmodulina, a qual facilita o transporte trans membrânico de cálcio (Lausmann, 2002; Silva et al., 2005; Fraser, 1998). Diferenças significativas têm sido encontradas na caracterização proteica do plasma seminal entre reprodutores ovinos de alta e de baixa fertilidade e muitas dessas proteínas estão relacionadas à qualidade seminal. (Cavalcante et al., 2013).

4.1.4 Conservação do sêmen ovino

Três formas de utilização do sêmen ovino são adotadas mundialmente: fresco, refrigerado e congelado. O sêmen fresco é preferido, quando o macho está presente no rebanho, e se tem muitas fêmeas em estro, natural ou sincronizado, inviabilizando a monta natural. A utilização de sêmen refrigerado é ideal quando o material genético de um macho é compartilhado por um grupo de criadores localizados em uma área relativamente pequena. Em tais casos, o sêmen é armazenado a 15° ou 5°C e utilizado entre 8 e 12 horas após o processamento. E o sêmen é congelado para a preservação em longo prazo, permitindo que ele seja distribuído por uma área mais ampla e usado por tempo indeterminado (Maia, 2015).

Em ovinos, existem relatos de resultados satisfatórios de fertilidade após IA com sêmen refrigerado por até 24 horas, muitos trabalhos têm sido realizados na tentativa de melhorar a capacidade fertilizante do sêmen ovino congelado e refrigerado que ainda apresentam resultados insatisfatórios quando comparados ao sêmen in vivo. Uma das problemáticas, é que após a diluição e refrigeração ocorrem danos provocados nas células espermáticas que reduzem a motilidade e rompem a integridade das membranas dos espermatozoides. Estas alterações interferem significativamente na sobrevivência e capacidade fecundante dos espermatozoides (Martin, 1968; Maxwell & Watson, 1996 apud Milczewski et al., 2000).

Apesar das dificuldades relativas ao processamento, a disponibilização de sêmen refrigerado ou congelado de boa qualidade, para uso na inseminação artificial, que é um desafio aos pesquisadores da área, tem-se que a IA proporciona muitas vantagens aos criadores, em relação à monta natural. Um dos principais problema para a difusão/adoção da técnica nos pequenos ruminantes é a fertilidade obtida após a IA com sêmen congelado, que ainda é aquém da obtida na monta natural. Soma-se a isso a dificuldade de realização da inseminação cervical nas ovelhas. Em ambas as espécies (ovina e caprina), os avanços nesta tecnologia têm-se concentrado principalmente na preservação da viabilidade/capacidade fertilizante dos espermatozoides, melhorando a composição dos diluidores e alterando protocolos de refrigeração e congelação e nas técnicas de avaliação da qualidade espermática, com o objetivo de prever a fertilidade do sêmen (Maia, 2015).

Considerando a importância da criopreservação, visando o melhoramento do potencial produtivo e reprodutivo das biotécnicas como a inseminação artificial, transferência de embriões e fertilização in vitro, os efeitos dos ritmos de refrigeração e congelação, define o grau de desidratação e a formação de cristais de gelo intracelular e extracelular, influenciando na sobrevivência dos espermatozoides (Mazur, 1984). A curva de congelamento ideal deve ser lenta o suficiente para prevenir a formação intracelular de gelo no espermatozoide, mas também tem que ser rápida a ponto de minimizar os efeitos nocivos de uma exposição prolongada a um ambiente hiperosmótico, a altas concentrações de solutos (Holt, 2000).

Em geral, os protocolos de criopreservação de sêmen utilizam taxas de congelação que vão desde -10 à -100°C por minuto, conseguindo boas taxas de sobrevivência pós criopreservação (Salamon & Maxwell, 2000). No resfriamento rápido, com quedas acima

de 1°C/min (Douglas-Hamilton et al., 1984), os espermatozoides submetidos à variação brusca de temperatura, principalmente entre 30 e 0°C (Watson, 2000), sofrem uma perda prematura da motilidade, redução da produção de energia, aumento da permeabilidade da membrana e perda de íons e moléculas intracelulares, induzindo ao choque térmico (Medeiros et al., 2002).

A utilização da refrigeração com taxas relativamente lentas com quedas abaixo de 0,33°C/min (Douglas-Hamilton et al., 1984) e homogêneas possibilita uma desidratação adequada, evitando a formação de cristais intracelulares (Watson, 2000), minimizando as lesões de membranas, prevenindo a indução prematura da capacitação e da reação acrossomal. Segundo Salamon & Maxwell (1995) apesar de 40 a 60% dos espermatozoides de carneiros apresentarem motilidade pós-descongelamento, somente 20 a 30% deles permanecem biologicamente inalterados. Os danos básicos que os espermatozoides sofrem durante o processo de congelamento podem ser ultraestruturais ou físicos, bioquímicos ou funcionais. Os espermatozoides podem estar móveis, mas danificados, de tal maneira que a penetração e fertilização sejam improváveis.

Segundo Amann & Pickett (1987) citado por Rodello (2006) a utilização de adequada taxa de refrigeração no sêmen diluído é um dos fatores para uma menor depleção da fonte energética devido à manutenção do metabolismo espermático reduzido, permitindo uma melhor qualidade do sêmen ao final do processo de refrigeração, evitando alterações na forma das moléculas de fosfolipídios das membranas, em virtude da mudança de fase do estado líquido para gel. Possivelmente, a redução da temperatura altera o funcionamento de várias bombas adenosina trifosfato (ATP) dependentes, dentre elas a de sódio/potássio (Na⁺/K⁺), provocando despolarização parcial da membrana, com consequência abertura dos canais de cálcio, tornando as membranas acrossomal e mitocondrial permeáveis ao cálcio (Ca⁺⁺) a 5°C, primeiramente induzindo a vesiculação prematura da membrana acrossomal e depois danificando a membrana mitocondrial que está associada com motilidade. 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).

4.2 Diluentes seminais

Com a maior demanda pelo interesse em biotecnologias reprodutivas aplicadas a produção de ovinos, tem-se buscado o desenvolvimento de melhores diluidores seminais que promovam o armazenamento seminal por longos períodos, facilitando a difusão do material genético de animais de alto valor zootécnico (Menezes et al., 2018). Os diluidores usados para a preservação espermática, de uma forma geral, devem ter pH adequado, capacidade de proteção e manutenção da viabilidade celular, osmolaridade adequada e, ainda, capacidade de proteger o espermatozoide de injúrias criogênicas (Salamon & Maxwell, 2000).

Segundo Purdy (2006), um diluente para ser usado na conservação do sêmen deve ter também um sistema tampão, como o fosfato de sódio, citrato de sódio, TRIS (Tris-hidroximetilaminometano) e o TES (N-tris (hidroximetil) metil 2-aminoetanosulfônico); fontes energéticas, como a glicose, a frutose e crioprotetores externos como a gema de ovo ou o leite, e crioprotetores internos, como o glicerol (GLY) e o etilenoglicol (EG). O diluente deve ainda apresentar em sua constituição antibióticos, sendo a Penicilina, a Estreptomicina e a Gentamicina, os mais utilizados. Além de ser atóxico para os espermatozoides, ele deve ser de baixo custo e preparo fácil, balanço mineral apropriado, combinação ajustada de nutrientes, bem como proporcionar a estabilidade dos sistemas enzimáticos e a integridade da membrana plasmática (Picket & Amann, 1987).

4.2.1 TRIS-gema de ovo

O sêmen ovino in natura não possui antioxidantes, sendo geralmente adicionados aos diluentes antioxidantes sintéticos, como ácidos graxos insaturados, gema de ovo, plasma seminal ou citrato de sódio para inibir a peroxidação de fosfolipídios espermáticos (Salamon & Maxwell, 1995). A gema de ovo preserva a motilidade e a integridade de membranas espermáticas, devido a sua ação protetora promovida pela fração fosfolipídica contra o choque térmico (Maxwell & Salamon, 1993; Salamon & Maxwell, 2000). Ela atua também com tampão osmótico, conferindo maior resistência às células tanto para meios hipotônicos quanto para hipertônicos (Jones & Martin, 1973 apud Falleiros, 2011).

Mesmo algumas vezes sendo parcialmente substituída por outras substâncias, a gema de ovo continua sendo um importante componente para criopreservação do sêmen de ovinos (Salamon & Maxwell, 1995), essa crioproteção é exercida durante o resfriamento, congelamento e descongelamento. (Aboagla et al., 2004 apud Dorado et al.,

2007). A gema de ovo é geralmente utilizada na concentração de 20 % no diluente e evidências indicam que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são os constituintes da gema de ovo responsáveis pela proteção do espermatozoide (Bergeron & Manjunath, 2006). Silva et al., (2008), trabalharam com lipoproteínas de baixa densidade em substituição à gema de ovo no resfriamento do sêmen de ovinos, nas concentrações de 5, 10 e 20% e não foram observados efeitos benéficos das LBD sobre a motilidade espermática pós-resfriamento, porém a integridade de membrana foi preservada de forma semelhante ao meio com 16% de gema de ovo. No estudo de Paulenz et al., (2003) os diluentes à base de gema de ovo tiveram uma melhor capacidade de proteção do espermatozoide em relação aos diluidores à base de leite após 30h de armazenamento. Em relação a motilidade espermática, integridade da membrana plasmática e a taxa de capacitação.

Paulenz et al. (2002) obtiveram uma melhor taxa de não-retorno ao cio após 25 dias da IA e melhor taxa de parição foi relatada quando se utilizou um diluente à base de leite, em comparação com o diluente Tris gema de ovo. Kober (1985) citado por Rodrigues (1997) reportou que o TRIS não apenas apresenta atividade tamponante, mas que também atua na redução do metabolismo da frutose pela célula espermática, contribuindo assim para a economia de sua energia. Davis et al., (1963) foram os primeiros pesquisadores a descrever a utilização do tampão TRIS para a conservação do sêmen de bovinos. Carvalho et al., (2008) quando compararam a diluição e a criopreservação do sêmen ovino com TRIS-Gema (TG), Leite-Gema (LG) e TRIS-Gema Leite (TGL), e observaram que o diluente TG mostrou motilidade progressiva (46,5%) superior aos diluentes LG (26,1%) e TGL (32,1%) após a descongelação. Segundo Oliveira et al., (2009) o meio à base de TRIS promove maior proteção quanto às crio injúrias em espermatozoides, devido a maior quantidade de Gema de Ovo. Este fato foi confirmado por Cavalcante (2008), quando comparando o sêmen ovino criopreservado em TRIS e em água de coco em pó (ACP-102), observou que após a descongelação o percentual de espermatozoides móveis foi de 62,8% e 40,3%, respectivamente.

3.2.2. TRIS-leite

Os diluidores mais utilizados em geral, são a base de TRIS (hidroximetil aminometano) (Maia et al., 2008) e leite desnatado (Hafez & Hafez, 2004). A inseminação ovina com sêmen diluído em leite foi inicialmente utilizada por Salamon & Robinson

(1962). O sêmen foi diluído na proporção de 1:2 e 1:4 resultando numa concentração espermática de 150/200 milhões de espermatozoides por dose. O índice de não retorno após a primeira inseminação num representativo número de animais, com sêmen diluído em leite integral foi de 75% e em leite desnatado 76%. (Neves, 1982). O leite é isotônico ao sêmen e contém muitos compostos favoráveis a manutenção da viabilidade espermática. A eficiência dos meios diluentes a base de leite tem sido atribuída à sua composição proteica que atua como um tampão, além da sua propriedade quelante frente a metais pesados (Watson, 1976; Maxwell & Salamon, 1993; Salamon & Maxwell, 2000).

Salamon & Maxwell (2000) relataram ainda, uma proteção parcial contra a redução da temperatura durante o processo de refrigeração do sêmen. O uso bem sucedido da lactose, como principal componente dos diluentes para congelamento do sêmen de touro, estimulou sua aplicação para o sêmen de outros mamíferos. A lactose-gema foi usada tanto para as porções do diluente não glicerolizado quanto glicerolado, ou apenas para a porção não glicerolada seguida pelo meio INRA glicerolado (Salamon & Maxwell, 2000). Nos estudos de Kasimanickam et al. (2011) o potencial da membrana mitocondrial e motilidade progressiva total permaneceram, sem diferença estatística entre o diluente com gema de ovo e o diluente com leite para dois dias de armazenamento à 4°C.

Tem sido mostrado que as micelas de caseína isoladas a partir do leite podem proteger o sêmen de garanhão, bode, carneiro e touro durante o armazenamento entre 4°C e 5°C. Acredita-se que as micelas de caseínas, as principais proteínas do leite, protegem o esperma, reduzindo a ligação das proteínas Binder of SPerm (BSP) ao esperma e, em seguida, a perda de lipídios. Com a gema do ovo, sabe-se que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são responsáveis pela proteção do esperma durante a criopreservação (Bergeron et al., 2007; Lusignan et al., 2011). No entanto, o mecanismo pelo qual as micelas de caseína protegem o espermatozóide durante o armazenamento não está bem elucidado (Bergeron & Manjunath, 2006). Os resultados do estudo de O'hara et al., (2010) indicaram que o sêmen ovino resfriado e armazenado a 15°C tem uma vida mais curta do que o sêmen resfriado a 5°C. Além disso, os diluentes comerciais testados por ele não diferiram significativamente em termos de desempenho com o sêmen fresco *in vitro*, quando armazenados à 5°C.

Olivera-Muzante et al., (2011) obtiveram bons resultados de prenhez com sêmen ovino armazenado por 24h ou 48h em diluente a base de leite e gema (49 vs 47%, $p >$

0,05). Paulenz et al., (2002) descobriram que a motilidade dos espermatozóides de carneiro foi significativamente maior no diluente à base de Tris em comparação com o citrato de sódio e diluentes à base de leite durante o armazenamento líquido. Desse modo pode-se dizer que, ainda há necessidade de mais estudos comparativos.

4.2.3 TRIS-citrato de sódio

O citrato, designação genérica dos sais do ácido cítrico, é o principal nutriente produzido pela próstata como alimento para os espermatozóides. O citrato de sódio (citrato trissódico - $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) é o sal de sódio do ácido cítrico, um agente tamponante que resiste a mudanças no pH do meio (WIKIPÉDIA, 2022). Machado & Simplício (1995) afirmaram que, energeticamente, o citrato é pouco importante para o metabolismo intermediário do espermatozóide, mas favorece a entrada mais lenta do crioprotetor glicerol no interior da célula espermática, auxiliando na regulação do equilíbrio osmótico durante o processo de congelamento.

O Citrato de Sódio 2,92% e a solução fisiológica Ringer lactato são isoosmóticas e podem ser utilizadas como extensores ou expansores seminais (Aisen, 2008; Salviano & Souza, 2008). Essas soluções são utilizadas na rotina dos laboratórios de reprodução animal como meio de lavagem dos espermatozoides após a centrifugação, ou então como pré-diluidores para análises microscópicas do sêmen (motilidade e vigor espermático) (Dell'aqua Junior & Papa, 2001).

Foote (1964) adaptou o uso do diluente à base de tampão TRIS associado ao Citrato de Sódio para a preservação do sêmen na espécie canina. Posteriormente, Maxwell & Watson (1996) reportaram que na conservação de sêmen caprino, utilizando um diluente a base de TRIS-Citrato de Sódio a 5°C, a capacidade de fertilização in vitro dos espermatozóides pode ser mantida por 14 dias.

Segundo Dias (2010) a adição das soluções Ringer Lactato, Citrato de Sódio 2,92% e Solução TRIS não permitiram uma persistência da motilidade e do vigor após o descongelamento. Apesar do tratamento em que foi utilizado a solução TRIS ter apresentado motilidade e vigor 30 minutos a mais do que os outros tratamentos, os valores para estes parâmetros estavam abaixo do preconizado para um sêmen descongelado.

Dauzier et al., (1954) citado por Milczewski (2000) reportaram que a motilidade dos espermatozóides de carneiro foi mantida por mais tempo em diluentes à base de citrato do que em leite. Petruzzi et al., (1976) não observaram diferenças entre 6 diluentes

testados, para sêmen ovino, avaliando-os quanto à motilidade 4 horas após refrigeração a 5°C. Às 24 horas o TRIS e citrato foram superiores aos diluentes à base de leite. Com 120 horas foram obtidos valores de 45%, 26%, 23% e zero de motilidade para o TRIS, citrato, leite com e sem gema de ovo, respectivamente. A diferença na percentagem média de espermatozoides móveis entre o diluente TRIS e os demais foi significativa a partir de 48 horas de refrigeração.

4.2.4 BSA (albumina sérica bovina)

A capacidade da albumina sérica bovina (BSA) em se aderir a diferentes lipídeos é bem conhecida e este efeito pode ser responsável pela preservação da superfície celular ao rompimento lipídico o que, conseqüentemente, evitaria a perda dos componentes de membrana (Ollero et al., 1996 apud Bicudo et al., 2007). A adição de BSA aos espermatozoides ovinos tem como benefício a elevação da motilidade, manutenção da cinética espermática no sêmen refrigerado e a preservação da viabilidade espermática após a congelação. (Upreti et al., 1995; Ollero et al., 1996 apud Bicudo et al., 2007).

Durante a criopreservação ocorre perda de lipídios de membrana (Chakrabarty et al., 2007 apud Guimarães, 2010), deste modo, aos diluentes são adicionados lipídios de diversas origens, como a gema de ovo, o leite, a albumina sérica bovina (BSA) e o polivinilpirrolidona (PVP) (Pérez-Garnelo et al., 2006). Gil et al., (2003) citam que a utilização de aditivos de origem animal como a gema de ovo e leite na diluição pode implicar em riscos sanitários, não apenas pela inclusão de agentes microbiológicos, mas também por contaminantes que podem comprometer a qualidade do produto.

Matsuoka et al. (2006) relataram que a BSA pode substituir a gema de ovo nas concentrações de 10 e 15 mg/mL, uma vez que melhora a motilidade, a integridade da membrana e do acrossoma. Eles avaliaram diferentes concentrações de BSA (0; 0,3; 15; 10 e 15%) no meio de congelação do sêmen ovino, sem gema de ovo. O sêmen congelado com 10 e 15% de BSA, apresentou os maiores índices de motilidade espermática pósdescongelação, em relação aos demais grupos estudados, inclusive quando comparado ao meio à base de frutose com 20% de gema de ovo. Estes resultados estão de acordo com os observados nos trabalhos de Fukui et al. (2007, 2008), que ao congelarem o sêmen de ovinos com os meios TRIS-gema de ovo (15%) ou BSA (10%) sem gema de ovo, obtiveram taxas de fertilidade semelhantes (64 e 66% com TRIS-gema versus 58 e 65% com BSA, respectivamente), nas fêmeas inseminadas em tempo fixo.

Já Uysal & Bucak (2007) apud Câmara et al., (2018), relataram que a melhor concentração de BSA é de 20 mg/mL. BSA elimina os radicais livres gerados por ROS, e, portanto, conservam a integridade da membrana e a integridade dos espermatozoides durante o processo de congelação e descongelação. Esses achados indicam que a BSA pode substituir a gema de ovo nos meios de congelação do sêmen ovino, sem comprometer os índices de fertilidade.

4.2.5 ACP-102

Diluentes à base de água de coco in natura têm apresentado resultados satisfatórios quando utilizados para a conservação de espermatozoides de espécies como cães (Cardoso et al., 2003), ovinos (Machado et al., 2006), caprinos (Salgueiro et al., 2002) e suínos (Toniolli et al., 2010). Devido as variações físico-químicas da água de coco e a indisponibilidade de frutos em estágios ideais, elaborou-se um meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP® - ACP Biotecnologia, Fortaleza-Ceará, Brasil), caracterizado pela padronização e estabilização da água de coco, por meio de um processo de desidratação e subsequente formulação de meios de conservação específicos para células e tecidos (Salgueiro et al., 2002).

Os meios à base de água de coco desidratada tornaram-se uma patente brasileira (ACP Serviços Tecnológicos, Ltda, ACP Biotecnologia, Fortaleza, Ceará, Brazil) e têm sido utilizados para a manutenção da viabilidade e fertilidade espermática em diferentes espécies, inclusive ovinos com resultados satisfatórios (Nunes & Salgueiro, 1999), e podem ser uma alternativa mais segura, especialmente quando utilizado sem a presença da gema de ovo. Entretanto, para a criopreservação espermática com os meios à base de água de coco reconstituída, é necessário acrescentar níveis variados de gema de ovo integral (Silva et al., 2000), sendo então um fator ainda limitante para a sua utilização, quando se quer substituir os componentes de origem animal. Uma possibilidade é a substituição da gema de ovo integral pela LDL exposta à radiação gama, para redução da população de microorganismos, mas que ainda não foi testada. (Bittencourt et al., 2013).

Em um estudo realizado por Campos (1999), para verificar a viabilidade do diluente à base de água de coco criopreservado a -196 °C, para a congelação do sêmen caprino, constatou-se que o mesmo se comportou como ótima alternativa possibilitando seu uso em regiões onde inexista o coqueiro, bem como facilitando o armazenamento, conservação e transporte desta solução. Cavalcante (2008), quando comparando o sêmen

ovino criopreservado em TRIS e em água de coco em pó (ACP-102), observou que após a descongelação o percentual de espermatozóides móveis foi de 62,8% e 40,3%, respectivamente. Este resultado coincidiu com o mesmo encontrado por Cavalcante (2014) onde o diluente à base de água de coco em pó (ACP-102c) conferiu menor proteção na congelação de espermatozoides ovinos avaliados *in vitro* em comparação ao diluente TRIS.

Já Brito (2017) identificou que o meio de conservação ACP-102c adicionado de 10% óleo de coco extra virgem é eficiente na manutenção da qualidade dos espermatozoides ovinos criopreservados. Apresentando-se como um diluente alternativo para programas internacionais de inseminação artificial e transferências de embriões. Entretanto Santos (2013) avaliando o efeito da adição de óleo de coco em meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP-101c) em sêmen caprino criopreservado nas concentrações de 2,5%, 4%, 10% e 20%, não obteve resultados superiores ao meio de conservação contendo a gema de ovo como crioprotetor. Porém, observou que o óleo apresentou um possível potencial crioprotetor quando adicionadas concentrações 2,5 e 4%, sugerindo mais estudos

5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a literatura consultada pode-se inferir que o conhecimento dos diluidores seminais são importantes para aperfeiçoar o uso da IA em ovinos. Também concluímos que imprescindível na composição de um diluente usado para a congelação do sêmen ovino uma substância tampão como o Tris, sais como o citrato de sódio, um ou mais açúcares (glicose, frutose, lactose, rafinose ou trealose), crioprotetores penetrantes (glicerol, etilenoglicol ou dimetilsulfóxido) e não-penetrantes (leite ou gema de ovo) além de antibióticos, sendo a penicilina e a estreptomicina os mais utilizados.

Para ter o diluente ideal é necessário consultar a bibliografia para comparar o mais benéfico para o produtor.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AISEN E. G.; VENTURINO A. **Coleta e avaliação do sêmen**, In: AISEN E.G. Reprodução Ovina e Caprina. 1ª ed. São Paulo. Editora MedVet, 2008. p. 57-73.
- AISEN, E.G. et al. **Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders**. *Cryobiology*, v.50, n°3, 2005. p. 239-249
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. **Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa**. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.7, 1987. p. 145-173
- BARBAS, J. P.; MASCARENHAS, R. D. **Cryopreservation of domestic animal sperm cells**. *Cell and Tissue Banking*, Amsterdam, v.10, 2009, p. 49-62.
- BARBOSA, L. P. **Avaliação de diferentes diluidores e métodos de congelação de sêmen, em programas de inseminação artificial em caprinos da raça Alpina**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Viçosa - MG. 1999, p. 71.
- BAILEY, T. L.; MONKE, D.; HUDSON, R. S. et al. **Testicular shape and its relationship to sperm production in mature Holstein bulls**. *Theriogenology*, v. 46, n.3, 1996, p. 881- 887.
- BERGERON, A. et al. **As caseínas do leite diminuem a ligação das principais proteínas do plasma seminal bovino ao esperma e previnem a perda de lipídios da membrana do esperma durante o armazenamento do esperma**. *Biol Reprod*. 2007.
- BERGERON, A.; MANJUNATH, P. **New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk**. *Molecular Reproduction and Development*, v. 73, 2006. p. 1338–1344.
- BERNDTSON, W. E. **Sperm production and its harvest**. *Animal Andrology*. *Nosworth Way: CAB International*, 2014. p. 11-33.
- BICUDO, S. D. et al. **Avanços na criopreservação do sêmen ovino visando sua aplicação em programas de inseminação artificial e em biotecnologias com embriões**. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2007.
- BUENO, R. **Criopreservação de sêmen canino, utilizando dois diluidores e dois protocolos de resfriamento**. 91 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2000.
- CAMPOS, A. C. N. **A água de coco criopreservada, proveniente de frutos de diferentes variedades e idades de maturação como diluidor do sêmen caprino**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 1999, p. 45

CARDOSO, R. C. S., et al. **Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations.** Theriogenology, v.59, 2003. p. 743-751

CARVALHO, F. P.; et al. **Diferentes diluentes sobre a motilidade e integridade de membrana plasmática após o congelamento e descongelamento de sêmen ovino.** Revista Brasileira Saúde e Produção Animal, v.9, n.3, 2008, p. 612-620

CAVALCANTE, J. M. **Avaliação do sêmen ovino diluído e congelado em meio à base de água de coco em pó (ACP-102c) ou Tris. 2008.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará. Ceará. 2008.

CASALI, R. et al. **Semen deposition by cervical, transcervical and intrauterine route for fixed-time artificial insemination (FTAI) in the ewe.** Theriogenology, v.103, 2017, p. 30-35

CAVALCANTE, J. M. M. et al. **Plasma seminal ovino e sua aplicação na biotecnologia reprodutiva.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte - MG, v. 37, n. 3, 2013, p.254-259. Disponível em: [http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v37n3/pag254-259%20\(RB417\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v37n3/pag254-259%20(RB417).pdf). Acesso em: 24 out. 2022.

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2 ed. 1998.

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 3. ed. Belo Horizonte, 2013, p. 104.

CITRATO DE SÓDIO. In: WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2022. Disponível em: https://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Citrato_de_s%C3%B3dio&oldid=64450346. Acesso em: 24 set. 2022.

CORSINO, M. C., **Biotechnology alavanca o melhoramento genético de ovinos: Técnicas beneficiam a ovinocultura e ajudam o produtor rural a obter lucros.** [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.cpt.com.br/noticias/biotecnologia-alavanca-o-melhoramento-genetico-de-ovinos>. Acesso em: 11 out. 2022.

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

DEKA B.B.; RAO, A. R. **Effect of extenders and thawing methods on post-thawing preservation of goat semen.** Ind. Vet. J., 1987.

DELL'AQUA, J. J.A.; PAPA F. O. **Efeito de diluentes e da intensidade e tempo de centrifugação, sobre os parâmetros espermáticos para congelamento de sêmen equino.** Revista Brasileira de Reprodução Animal. 2001.

DORADO, J.; RODRIGUEZ, I.; HIDALGO, M. **Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two based extenders based on post-thaw sperm**

- quality and fertility rates after artificial insemination.** *Theriogenology*, v.68, 2007, p.168-177.
- DOULGAS-HAMILTON, D. H., OSOL, R.; OSOL, G. **A field study of the fertility transported equine semen.** *Theriogenology*, v.22, n.3, p.291-304, 1984.
- EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats.** Sydney, Butterworths, 1987, p. 194
- FOOTE, R. H. **Extenders for freezing dog semen.** *Am J Vet Res*, v.25, 1964, p.37-40.
- FONSECA, J. F. et al. **Biotecnologias aplicadas à reprodução de ovinos e caprinos.** EMBRAPA – Brasília - DF, 2014.
- FONSECA, J. F. et al. **Sincronização de estro e superovulação em ovinos e caprinos,** II Simpósio de Caprinos e Ovinos da EV-UFGM, Sobral, CE, 2007.
- FRASER, L. R. **Interactions between a decapacitation factor and Mouse spermatozoa appear to involve fucose residues and a GPI-anchored receptor.** *Mol. Reproduction Development*. v.51, 1998, p. 193-200
- FUKUI, Y. et al. **Fertility of ewes inseminated with intrauterinally.** *Ciência Animal*, 2018.
- GIBBONS, A. **Inseminacion artificial con semen congelado en cabras da raza angora.** *Rev. Taurus*, 2002, p. 24-32.
- GIL, J. L. et al. **Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen.** *Theriogenology*, v.59, 2003, p. 1241-1255
- HOCHEREAU-DE-REVIERS, et al. **Spermatogenesis and Sertoli cell numbers and function in rams and bulls.** *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 34, 1987, p. 101. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3305912/>. Acesso em: 19 out. 2022.
- HOLT, W. V. **Basic aspects of frozen storage of semen.** *Anim. Reprod. Sci.* 2000.
- ISACHENKO, V. et al. **Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability.** *Biol Reprod.* 2004.
- KASIMANICKAM, R.; KASIMANICKAM, V.; TIBARY, A.; PELZER, K. **Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4 °C.** *Small Ruminant Research*, v. 99, 2011, p. 208– 213.
- LAND, R. B. **The of female sex-limited characters in the male.** *Nature*, v.241, 1973, p. 208-209.
- LAUSMANN, C. V. **Plasma seminal na capacitação espermática em ovinos.** (Dissertação Mestrado), Universidade Federal de Santa Maria, 2002, p. 57.

- LUSIGNAN, M. F. et al. **As principais proteínas do plasma seminal bovino interagem com caseínas e proteínas do soro do leite.** Biol Reprod. 2011.
- MACHADO, et al. **Fertility following intracervical or intrauterine laparoscopic insemination of ewes using extenders based on coconut water.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v.43, 2006, p. 43-49.
- MACHADO, R.; SIMPLICIO, A. A. **Inseminação artificial em caprinos no Brasil: estágio atual.** Revista Brasileira Reprodução Animal, v.19(1-2), 1995, p. 61-72.
- MAIA, M. da S.; NOGUEIRA, D. M. **Manejo reprodutivo de caprinos e ovinos em regiões Tropicais.** Documentos 290, Petrolina – PE, Embrapa Semiárido, 2019. 46 p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1116433>. Acesso em: 19 out. 2022.
- MATSUOKA, T.; IMAI, H.; KOHNO, H.; FUKUI, Y. **Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa.** Journal of Reproduction and Development, v.52, n.5, 2006, p. 675-683.
- MARTIN, I.C.A. **Milk and synthetic diluents for ram semen.** In: International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination, Paris, 1968, p.1619-1622.
- MAXWELL, W. M. C.; WATSON, P. F. **Recent Progress in the Preservation of Ram Semen.** Animal Reproduction Science, 1996, p. 55-65.
- MAXWELL, W. M. C.; SALAMON, S. **Liquid storage of ram semen: a review.** Reproduction Fertility Development, v. 5, 1993, p. 613-38.
- MAZUR, P. **Freezing of living cells: mechanisms and implications.** Am. Physiol. Soc., 1984, p. 125-142.
- MCPHAIL D. B.; GOODMAN, B. A. **Tris buffer – a case for caution in its use for cooper containing systems.** Bioch J, v.221, 1984, p. 559-560.
- MEDEIROS, C. M. O. et al. **Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better?** Theriogenology, v.57, 2002, p. 327- 344.
- MEDEIROS, A. A. **Utilização do azul de bromofenol como método de coloração vital para a avaliação da morfologia do espermatozóide ovino.** Fortaleza - CE, dezembro de 2004, p. 3- 5; 7-8.
- MENEZES, G. F. O. et al. **Dimetilacetamida associada ou não ao glicerol para criopreservação de sêmen ovino.** Ciência Animal Brasileira. v. 19. 2018.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial.** Volume 1 e 2. 6ªEd. Porto Alegre: Sulina, 1987.
- MILCZEWSKI, V; KOZICKI, L. E; NEVES, J. P. **Viabilidade do sêmen ovino refrigerado em diferentes diluentes.** Archives of Veterinary Science. v.5, 2000, p. 29-33.
- MORAES, J. C. F. **A avaliação andrológica no carneiro.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 21, 1997, p. 10-19.

MORAES, J. C. F.; OLIVEIRA, N. M. Método para avaliação de carneiros Romney March baseado no tamanho testicular. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 1992, vol. 16, nº 1-2, p. 55-62.

MORAN, D. M. et al. **Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa.** *Theriogenology*, v.38, 1992, p. 999-1012.

MORTIMER S.T.; MAXWELL, W.M.C. **Effect of medium on kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa.** *Reproduction*, v.127, 2004, p. 285-291.

NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M. **Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de caprinos e ovinos.** *Revista Científica de Produção Animal*, v.1, 1999. p 17–26.

OLIVEIRA, R. V. et al. **Avaliação morfológica de espermatozóides caprinos diluídos e congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) ou Tris, corados por eosinanígrina e azul de bromofenol.** *Ciência Animal Brasileira*, v.10, n.3, 2009, p.862-869.

PEREIRA, T. R. et al. **Preservação do sêmen de ovino Santa Inês com diluentes alternativos.** *Studies In Engineering And Exact Sciences*, 2022, p. 532–539.
<https://doi.org/10.54021/sesv3n3-009>

PÉREZ-GARNELO, et al. **Post-thaw viability of European bison (*Bison bonasus*) semen frozen with extenders containing egg yolk or lipids of plant origin and examined with a heterologous in vitro fertilization assay.** *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 37, n. 2, 2006, p. 116-125.

PETRUZZI, V. et al. **Effect of different semen diluents on survival of ram spermatozoa at 5°C.** *Zentralblatt für Veterinärmedizin*, v.23, n.7, 1976, p. 556-561.

PURDY, P.H. **A review on goat sperm cryopreservation.** *Small Ruminant Research*, v.63, 2006, p.215-225.

PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos.** 1. Ed. São Paulo: Roca Ltda, 2005, p. 145-153; 164-166; 174-176; 179-181.

REGE, J. E. O. et al. **Reproductive characteristics of Ethiopian highland sheep. II. Genetic parameters of semen characteristics and their relationships with testicular measurements in ram lambs.** *Small Ruminant Research*, v. 37, 2000, p. 173-187.

RITAR, A. J.; BALL, P. D. **Effect of freeze-thawing of goat and sheep semen at a high density of spermatozoa on cell viability fertility after insemination.** *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v.31, n.3/4, 1993, p. 249-262.

RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J. L. **Efeito da adição de diferentes concentrações de Albumina Sérica Bovina (BSA) ao diluidor à base de Tris sobre a viabilidade in vitro do sêmen canino criopreservados.** *Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, v.26, n.2, 1998, p. 32-49.

- SALAMON, S.; ROBINSON, T. J. **Studies on the artificial insemination, age of the ewe, rams, and milk dilutens on lambing performance.** Aust. J. Agric. Res., 1962.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. **Storage of ram semen.** Animal Reproduction Science, v.62, 2000, p. 77-111.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. **Frozen storage of ram semen. Review I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination.** Animal Reproduction Science, v.37, 1995, p. 185-249.
- SALGUEIRO, C. C. M. et al. **Utilization of extenders based on coconut water “in natura” and in powder on the does artificial insemination at fixed time.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.5, 2002, p. 96-98.
- SALGUEIRO, C. C. M. **Estudo de Características Testiculares e Esperáticas de Ovinos da Raça Santa Inês.** Curso de Especialização em Ovinocultura. Universidade Federal de Alagoas (UFAL). 2000.
- SALGUEIRO C.C. M.; NUNES J. F. **Água de coco em pó em biotécnicas da reprodução de caprinos.** Ciênc Anim, v.22, 2012, p. 20-32.
- SALVIANO M. B.; Souza J. A. T. **Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino.** Revista Brasileira de Reprodução Animal. 2008, p. 159-167.
- SANTOS, B. M. B. **Criopreservação de sêmen caprino e ovino em diluente de origem vegetal à base de água de coco em pó sem adição de gema de ovo.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza - CE, 2013.
- SCHINDLER, H.; AMIR, D. **Longevity of ram sperm in various diluent and at different dilution rates.** Journal Agricultural Science , v.56, 1961, p. 183-189.
- SILVA, A. R et al. **Canine semen's freeze with different concentrations of egg yolk and glycerol in TRIS and coconut water extenders.** Ciência Rural, v.30, n.6, 2000, p.1021-1025.
- SILVA, T. A. S. N. et al. **Viabilidade e estado acrossomal do sêmen ovino descongelado e incubado com plasma seminal.** Anais do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – XVI CBRA Goiânia, 2005.
- SILVA, T.A.S.N. **Efeito do plasma seminal na descongelação do sêmen ovino avaliado in vitro e na inseminação artificial cervical.** Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade de Brasília. Brasília. 2007, p. 64.
- SIMPLÍCIO, A. A.; SANTOS, D. O. **Estação de monta x mercado de cordeiro e leite: manejo reprodutivo.** In: Simpósio de Caprinos e Ovinos da Escola de Veterinária da UFMG. Belo Horizonte - MG, Embrapa Semiárido, 2005. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/532480>. Acesso em: 19 out. 2022.
- SORRIBAS, C. E. **Reproduccion em los animales pequeños.** Buenos Aires: Intermédica, 1995, 152 p.

SOUZA, C. E. A. **Avaliação da função reprodutiva de carneiros Santa Inês durante o primeiro ano de vida: desenvolvimento testicular, produção espermática e proteínas do plasma seminal.** 160f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2003.

SOUZA, C. E. A.; MOURA, A. A.; LIMA, A. C. B. **Circunferência escrotal e características seminais em carneiros Santa Inês.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.25, n. 2, 2001, p. 196-199.

SOUZA, W. H.; LOBO, R. N. B.; MORAIS, O. R. **Ovino Santa Inês. Estado da arte e perspectivas.** EMEPA [Acesso em: 16 de Outubro de 2022] www.emepa.org.br/ovino_si13.php>.

STEGER, K.; WROBEL, K. H. **Postnatal development of ovine seminiferous tubules: an electron microscopical and morphometric study.** Annals of Anatomy, v.178, 1996, p. 201-213.

TONIOLLI, R. et al. **Uso do diluente água de coco em pó (ACP-103®) na conservação prolongada do sêmen do varrão: avaliação in vitro e in vivo.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.62, 2010, p.1072-1079.

VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C. L. et al. **Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters.** Theriogenology, v.29, 1988, p.1043-1055.

VERSTEGEN, J. P.; ONCLIN, K.; IGUER-OUADA, M. **Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: in vitro and in vivo studies.** Theriogenology, v.64, 2005, p.720-733.

VILELA, L.C.V.; EMBRAPA. **Origem das raças naturalizadas.** Disponível em: Acesso em: 16 de fev. de 2020. às 17h00.

XAVIER, M. N. et al. **Avaliação de diferentes antibióticos na inibição do crescimento de Brucella ovis em sêmen ovino congelado.** In: XVIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte - MG, 2009.

WATSON, P. F. **Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post thawing function.** Reprod. Fertil. Dev., v.7, 1995, p. 871-891.

WATSON, P. F. **The causes of reduce fertility with cryopreserved semen.** Anim. Reprod. Sci., v.60-1, 2000, p. 481-492.

WATSON, P. F. **The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5°C and deep freezing.** J. Therm. Biol., v. 1, 1976, p. 137-41.

Documento Digitalizado Ostensivo (Público)

Depósito de TCC

Assunto: Depósito de TCC
Assinado por: Clara Figueiredo
Tipo do Documento: Dissertação
Situação: Finalizado
Nível de Acesso: Ostensivo (Público)
Tipo do Conferência: Cópia Simples

Documento assinado eletronicamente por:

- **Clara de Araújo Figueiredo, ALUNO (201518730337) DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA - SOUSA**, em 28/05/2023 22:35:49.

Este documento foi armazenado no SUAP em 28/05/2023. Para comprovar sua integridade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifpb.edu.br/verificar-documento-externo/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 839650

Código de Autenticação: 2b8e95b35b

