

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA PARAÍBA –
CAMPUS SOUSA
BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

GESSYCA MARIA MARTINS DE CARVALHO

DETERMINAÇÃO DOS PADRÕES MORFOLÓGICOS E DAS PATOLOGIAS DOS
ESPERMATOZÓIDES DE ASININOS NORDESTINOS

SOUSA-PB
2017

GESSYCA MARIA MARTINS DE CARVALHO

DETERMINAÇÃO DOS PADRÕES MORFOLÓGICOS E DAS PATOLOGIAS DOS
ESPERMATOZÓIDES DE ASININOS NORDESTINOS

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

Orientador: Prof. Msc. Luis Eduardo Pereira de Andrade Ferreira

SOUSA, PB
2017

Gessyca Maria Martins de Carvalho

DETERMINAÇÃO DOS PADRÕES MORFOLÓGICOS E DAS PATOLOGIAS DOS
ESPERMATOZÓIDES DE ASININOS NORDESTINOS

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

Orientador:

Prof. Msc. Luis Eduardo Pereira de Andrade Ferreira

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba, Campus Sousa

Avaliadores:

Prof^a. Dr^a. Ana Lucélia de Araújo

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba, Campus Sousa

Prof^a. Dr^a. Ana Valeria de Sousa Marques

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba, Campus Sousa

SOUSA-PB

2017

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, e a minha família. Em especial a minha mãe, minhas irmãs, meus sobrinhos e meu namorado. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por ser tudo na minha vida.

A minha rainha, minha mãe Cleide, mulher guerreira e que apesar de toda a dificuldade soube amar e educar a mim e minhas irmãs. Saiba que sem a senhora nada seria possível!

As minhas irmãs que eu amo incondicionalmente, Gilcleanny, Gleycyanny, Gisely e Williane.

Meus Sobrinhos lindos que trouxeram muito mais que alegria para nossa família e sim esperança e vontade de vencer. Ryan, Kauê, Anny, Lara e Maria.

Ao meu namorado Sandino Batista por todo amor e dedicação. Meu porto seguro!

A todos os professores por serem as luzes dos nossos caminhos e por não passar só conhecimentos e sim a humildade de ser família.

Ana Lucelia a qual tenho um amor gigantesco por ser por mim tida como uma mãe. Aquela que me fez apaixonar pela disciplina de anestesiologia e que hoje é pra mim uma referência de pessoa e profissional.

Ana Valeria por ser essa mulher de fibra, linda e médica de grandes animais. Morro de orgulho por tê-la como minha professora e referência de profissional.

Luciana por ser um doce de pessoa e ainda ser da minha terrinha, gente da minha gente.

Ao meu Orientador e “Papai”. Agradecer por toda paciência e por todas as broncas! Um exemplo de pessoa do bem e que sabe cativar o próximo. Obrigada por ser apoio e ser um grande mestre!

Aos meus amigos de longas datas por ter sido base da minha caminhada. Rildo, Aline Rafaelly, Aline Batista, Vanessa, Jaqueline, Renata, Geusivania, Prycila, Rennê.

E aos amigos mais recentes e não menos importantes. Paloma, Claudia, Flávia, Camila, Corrinha, Valdevan, Icaro, Vicente, Redy, Bianca, Sarah Caetano, Seginando, Pablo, Anderson Lourenço, Anderson Holanda.

A Claudia por ter me ajudado muiiiiiitooo no meu trabalho e por sempre ser uma amiga companheira!

A Paloma e Padinha por todo amor e cuidado, minha segunda família!

A Samira por ser amiga, irmã e cunhada. Por ser “intojo” e alegria, por ser companhia nesse lugar diferente.

Valdevan, Corrinha e Nando pelo companherismo e amizade. Vocês foram essenciais nessa caminhada. Que seja eterna nossa amizade!!

A Sandra e Família e Dona Edilene e Família por ter me acolhido com tanto carinho. Minha eterna gratidão!

RESUMO: O exame andrológico é uma das práticas utilizadas na reprodução animal em várias espécies e, que visa à avaliação física e funcional reprodutiva do macho. A espécie asinina não foi incluída na literatura para tal avaliação, sendo hoje criados principalmente com objetivo de coleta de sêmen para produção de muare, frisando assim a importância para a avaliação seminal o qual é um componente essencial dentro do exame andrológico. Tal avaliação se caracteriza por várias práticas, entre elas está a avaliação morfométrica e as patologias do espermatozóide. A análise morfométrica espermática é uma técnica que avalia em tamanho as estruturas, e a avaliação das patologias classifica-se em maiores e menores de acordo com o comprometimento com a fertilidade. O trabalho foi realizado no IFPB Sousa, no Laboratório de reprodução animal e Laboratório de morfometria. Foram feitas coletas a cada 48 horas de intervalos, perfazendo cinco ejaculados por indivíduo, foram feitas lâminas nos momentos, a fresco, após centrifugação e adição de diluente, e o terceiro e quarto momento foram do descongelamento de sêmen congelado em geladeira vapor e sistema automatizado. Na patologia espermática foi observados números de células normais avaliadas à baixo do que é padronizado para a espécie equina (70%), e valores à cima de 30% preconizado para patologias em geral. Os defeitos menores para cada momento respectivo foram 41,4(±7,44), 41,6(±2,27), 46,5(±3,03), 44,3(±2,39), Superiores aos observados em defeitos maiores 12,3%; 16,4%; 12,7%; 14,7%, indicando alto valor de patologias, mas sem comprometimento com a fertilidade do animal. O espermatozóide asinino Nordeste apresenta-se em média com as seguintes medições: Diâmetro Menor 3,19 (±0,28), Diâmetro Maior 6,18 (±0,38), Área da Cabeça 407,10 (±47,54), Área do Acrossoma 238,49 (±43,04), % de Acrossoma 0,59 (±0,08), Peça Intermediária 11,30 (±2,17), Cauda 41,81 (±3,38). Demonstrando semelhança com o equino, Porém o espermatozóide é mais globuliforme assemelhando essa característica com o espermatozóide bovino, ressaltando a importância de se estudar cada indivíduo por suas características distintas.

Palavras Chaves: Exame andrológico, Reprodução animal, Espermatozóide bovino, Globuliforme.

ABSTRACT: The andrological examination is one of the practices used in animal reproduction in several species and that aims at the physical and functional reproductive evaluation of the male. The asinine species was not included in the literature for such evaluation, being nowadays created mainly for the purpose of collecting semen for the production of mules, emphasizing the importance for seminal evaluation, which is an essential component of the andrological exam. This evaluation is characterized by several practices, among them is the morphometric evaluation and the pathologies of spermatozoa. The sperm morphometric analysis is a technique that evaluates structures in size and the evaluation of pathologies is classified as major and minor according to the commitment to fertility. The work was carried out at IFPB Sousa, at the Animal Reproduction Laboratory and Morphometry Laboratory. Samples were collected every 48 hours at intervals, with five ejaculates per individual, slides were made at the moments, fresh after centrifugation and addition of diluent, and the third and fourth moments were the thawing of semen frozen in steam refrigerator and automated system . In the spermatic pathology, the number of normal cells evaluated under the standard equine (70%), and values above 30% recommended for general pathologies were observed. The minor defects for each respective moment were 41.4 (± 7.44), 41.6 (± 2.27), 46.5 (± 3.03), 44.3 (± 2.39), superior to observed in major defects 12.3%; 16.4%; 12.7%; 14.7%, indicating high value of pathologies, but without compromise with the fertility of the animal. The Northeast asinine spermatozoon is presented in mean with the following measurements: Diameter Minor 3.19 (± 0.28), Larger Diameter 6.18 (± 0.38), Head Area 407.10 (± 47.54) , Acrosome Area 238.49 (± 43.04), Acrosome% 0.59 (± 0.08), Intermediate Part 11.30 (± 2.17), Tail 41.81 (± 3.38). However, spermatozoa are more globuliform, resembling this characteristic with bovine spermatozoa, emphasizing the importance of studying each individual because of its different characteristics.

Key words: Andrological examination, Animal reproduction, Bovine sperm, Globuliform.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Imagem 1. Asininos da raça Nordestina.....	13
Imagem 2. Esquema Ilustrativo das patologias encontradas nos espermatozóide.....	16
Imagem 3. Espermatozóide de Asinino Nordestino.....	26
Figura 1. Ilustração de avaliação em “zigzague”	19
Figura 2. Desenho ilustrativo de um espermatozóide com suas respectivas estruturas e locais de medições morfométricas.....	20
Figura 3. Distribuição das médias dos espermatozóides com patologias, em diferentes momentos do congelamento espermático (Grupos), de jumentos nordestinos.....	21
Figura 4. Distribuição das médias (desvio padrão) das patologias espermática, em diferentes momentos do congelamento espermático (Grupos), de jumentos nordestinos.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μm: Micrometro

PI: Peça Intermediaria

CASA: sistema computadorizado da motilidade espermática

IFPB: Instituto Federal da Paraíba

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação de Blom para patologias espermáticas (1973).....	16
Tabela 2- Média(x) e Desvio Padrão(DP) dos defeitos maiores e menores, assim como o total de anomalias acrossômicas, de cabeça, de cauda e de formas teratogênicas, em porcentagem em diferentes momentos do congelamento espermático (Grupos), de jumentos nordestinos. Nas fases pós a coleta (fresco), pós centrifugação e adição de crioprotetor (pré congelamento) e descongelados, após congelamento na geladeira e na máquina.....	22
Tabela 3- Média (X) e Desvio Padrão (DP) dos defeitos gerais encontrados na avaliação de patologia espermática no sêmen de jumentos Nordestino, nos momentos Fresco, Centrifugado, Descongelado Geladeira e Descongelado Máquina.....	24
Tabela 4- Média (\pm desvio padrão) dos valores morfométricos, (μ m) encontrados para as medições de Cabeça (diâmetro maior, menor e a área da cabeça), Acrossoma (área e porcentagem em relação ao total da cabeça), Peça intermediária (tamanho em comprimento) e comprimento de Cauda dos asininos Nordestinos.....	25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1. Asinino Nordeste	14
2.2. Célula espermática	14
2.3. Morfometria espermática	15
2.3. Patologia Espermática	16
2.3.1. Criopreservação espermática.....	18
4. METODOLOGIA	19
4.1. Localização	19
4.2. Grupos Experimentais	19
4.3. Coleta e avaliação do sêmen	19
4.4. Preparo de lâminas	20
4.5. Avaliação morfológica	20
4.5.1 Patologias espermáticas.....	20
4.5.2 Morfometria espermática	21
4.6. Análise estatística	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1. Morfologia espermática	22
5.2. Morfometria espermática	26
6. CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1. INTRODUÇÃO

O exame andrológico é uma das práticas utilizadas na reprodução animal em varias espécies e, que visa à avaliação física e funcional reprodutiva do macho. Com a importância de tal exame o colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) em 1998 padronizou a avaliação seminal de varias espécies, entretanto não incluiu os asininos, sendo então utilizados os padrões para espécie equina devido serem da mesma família equídea (CANISSO, 2008).

Varias são as raças de asininos, porém para a região nordeste a raça Nordestina é a que prevalece em maior numero. Segundo o IBGE (2011), o efetivo de asininos foi de 974, 532 mil no Brasil, desses, 91% localizam-se na região nordeste. Sendo também encontrado em menor quantidade em outros lugares como o centro-oeste. Caracteriza-se por ser altamente rústico e por servir ao homem do campo por sua função de tração e transporte (ALMEIDA, 2009). Sendo também utilizados como alimentação humana e essencial para a produção de muares. Os asininos são considerados como patrimônio social, cultural, econômico e ecológico (AEPGA, 2007).

Esses Asininos são criados em alguns países como Brasil, Estados Unidos, México e Cuba, com objetivo principal de coleta de sêmen para utilização na inseminação artificial em éguas, obtendo-se assim produtos muares (CANISSO, 2008). Com foco nos estudos de produção de muares, destaca-se a importância do exame andrológico na espécie dos animais doadores de sêmen, podendo assim determinar parâmetros, na avaliação espermiática, morfológicas e físicas, de maneira a selecionar e quantificar o potencial de cada indivíduo (MORAIS, 1994).

Na avaliação morfológica, os espermatozoides devem ser caracterizados e avaliados como um todo, por isso quanto mais estruturas avaliadas e características identificadas, maior será a confiabilidade da fertilidade do sêmen (ARRUDA, 2004), pois se o espermatozoide apresentar algum tipo de defeito poderá comprometer todo o processo de reprodução (PUGLIESI, 2009).

Dentre os padrões na avaliação morfológica as patologias ou anormalidades dizem muito sobre o potencial de fertilidade do animal (ARRUDA, 2011), e para classificá-las, utilizam-se principalmente as descritas por Blom (1973), que são classificadas por defeitos maiores, quando interfere diretamente na fertilidade, ou defeitos menores, quando não se tem essa interferência. Já a classificação do manual do CBRA (1998) para exame andrológico e

avaliação do sêmen animal, caracteriza em porcentagem o número de patologias identificando os locais de acometimento.

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a morfologia espermática, determinando os padrões, como morfometria e as patologias de espermatozóides da raça Nordestina, da espécie Asinina, tanto do sêmen fresco e após a criopreservação, na tentativa de contribuir para novas pesquisas na área, que servirão de alicerce para determinar melhorias para espécie.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Asinino Nordestino

O Asinino Nordestino pertence ao Reino animalia, filo chordata, classe Mammalia, ordem perissodáctilos, família Equidea, gênero Equuos, espécie Equuos asinus. Tendo esses sido citados antes mesmo que o cavalo por Abraão quando viajou ao Egito (DOMINGUES, 1968).

No Brasil os asininos foram introduzidos pelos colonizadores, e com o passar do tempo, através de cruzamentos naturais, esses animais foram reproduzindo entre si, dando origem a raças rústicas e fortes, como exemplo as raças, Brasileira, Pêga e Nordestina (MARIANTE & CAVALCANTE, 2006).

Dentre essas raças, o asinino Nordestino, também chamado de jumento, ganha destaque por ser utilizado em toda região nordeste, caracterizando 91% do número total desses animais do Brasil segundo o IBGE (2006).

A raça Nordestina (Imagem.1) é caracterizada por ter porte de 1,10 metros(m) em média; cabeça um pouco alongada, mas bem proporcionada; pescoço fino, bem inserido nas espáduas; corpo longo, linha dorso-lombar reta, garupa oblíqua e afinada posteriormente; membros descarnados, denominando-se secos, bons aprumos, cascos pequenos, talões altos e resistentes e pelagem podendo variar entre cardã, ruça, pelo de rato, roxa e apatacada (ALMEIDA, 2009).

Imagem.1- Asininos da raça Nordestina



2.2. Célula espermática

O gameta masculino ou espermatozóide foi indentificado por Van Leeuwenhoek em 1677 (PESCH e BERGMANN, 2006). Essas células têm sua produção nos testículos pelo

processo da espermatogênese, e sua morfologia é dividida em cabeça, colo e cauda (HAFEZ & HAFEZ, 2004; MRUK & CHENG, 2004).

A espermatogênese é um longo processo de produção de espermatozóide nos túbulos seminíferos, divididos nas seguintes fases: espermatocitogênese, meiose e espermiogênese (HAFEZ & HAFEZ, 2004; JOHNSON et al, 2000). Na primeira fase as espermatogônias (célula germinais) são divididas varias vezes por mitose, transformando-se em espermatócito. Na segunda fase inicia a divisão por meiose, onde o espermatócito terá o material genético duplicado e recombinado, dando origem a duas espermátides. Na terceira fase acontecem mudanças estruturais, formação de acrossoma, de cauda e retirada do excesso de conteúdo citoplasmático, tornando-os espermatozóides (Forma final da célula) (JOHNSON et al, 2000; ZHOU & GRISWOLD, 2008).

Todos os mamíferos apresentam a mesma estruturação de espermatozóides (MONTESINOS, 2012), essas estruturas maiores são cabeça, colo e cauda. A cabeça é composta por acrossoma e pelo núcleo celular. O acrossoma na extremidade anterior da célula, que contem enzimas hidrolíticas (acrosina, hialuronidase entre outras) responsáveis para romper a zona pelúcida do óvulo no processo de fecundação. O núcleo transporta o material genético. Abaixo da cabeça temos o colo, que é a ligação entre a cabeça e a cauda. E a cauda por sua vez é composta por peça intermediaria, onde estão presentes as organelas para produção de energia. E peça principal ou flagelo que tem por funcionalidade a locomoção (HAFEZ e HAFEZ, 2004; PESCH e BERGMANN, 2006).

2.3. Morfometria espermática

A análise morfométrica espermática é uma técnica que avalia em tamanho as estruturas do espermatozóide. Esta é realizada através de softwares especializados, como por exemplo, o sistema computadorizado da motilidade espermática CASA (CANISSO, 2008; ARRUDA et al, 2011). Tal técnica é feita por imagens de lâminas coradas com posteriores medições básicas, como área, comprimentos e largura (SILVA et al., 2008). Essa análise é muito importante para averiguação do estado do espermatozóide podendo dar uma estimativa do potencial reprodutivo do animal. Com tudo não avalia os espermatozóides internamente, sendo assim considerado subjetivo (BELETTI, 2004).

Para a espécie asinina se utiliza como padrão as analise morfométricas feitas para o espermatozóide equino (QUINTERO & RODRIGUEZ, 2009).

Embora a morfologia espermática se assemelhe a outras espécies, o espermatozóide asinino contém suas particularidades, e segundo Canisso (2008), o acrossoma do asinino é

pouco desenvolvido e o espermatozóide tem por característica um formato assimétrico, demonstrando que os asininos apresentam características reprodutivas individuais, sendo necessária a identificação das suas particularidades seminais.

2.3. Patologia Espermática

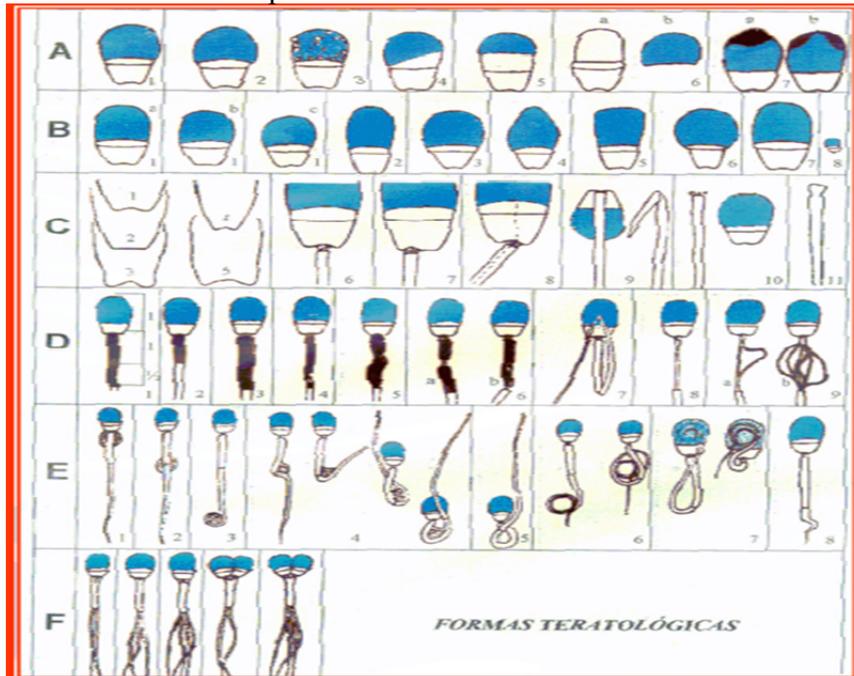
A avaliação das patologias espermática é a avaliação do gameta masculino que permite identificar reprodutores que possuem defeitos nos espermatozóide (ARRUDA et al., 2015; MONTESINOS, 2012). Dentre os diversos fatores que podem interferir diretamente na morfologia da célula, está à espermatogênese que é um processo delicado e que requer cuidados para a produção de células normais. Assim como a espermiogênese, maturação epididimária, migração e outros, que são etapas que o espermatozóide passa para estar pronto para ser excretado junto aos fluidos seminais (ARRUDA et al., 2015). Qualquer acometimento que possa alterar esses processos pode provocar a produção de células com patologias ou anomalias (GARCIA, 2004).

E essas patologias podem indicar a condição de saúde dos órgãos onde os espermatozóides são produzidos e os locais que percorrem para sua maturação, tendo influência os fatores estressantes, genéticos, condições ambientais e idade do animal (FRENEAU et al., 2010). Comprometendo assim a fertilidade do reprodutor (ARRUDA et al., 2015).

Com isso o exame andrológico se torna essencial para o prognóstico do potencial reprodutivo do indivíduo, e a morfologia espermática é um componente importante para a determinação do mesmo, fornecendo estimativa de números de espermatozóides normais e anormais, como algumas anomalias ou injúrias (MELDAU, 2013).

Para a avaliação morfológica existe a classificação do Manual de andrologia (CBRA, 1998) o qual caracteriza os defeitos em cada estrutura da célula, cabeça com acrossoma e cauda, incluindo a peça intermediária. Há também a classificação de Blom (1973) que avalia as patologias com relação à interferência da fertilidade ou não, classificando em defeitos maiores e menores respectivamente.

Imagem. 2- Esquema Ilustrativo das patologias encontradas nos espermatozóide



- A) Patologias de acrossoma. B) Patologias de cabeça. C) Patologias de inserção de cauda. D) Patologias da peça intermediária. E) Patologias de cauda. F) Formas duplas ou teratológicas.

Fonte: Papa et, al. (2014)

Tab.1 - Classificação de Blom para patologias espermáticas (1973)

Defeitos Maiores		Defeitos Menores	
Estruturas	Patologias	Estruturas	Patologias
1. Acrossomo		1. Cabeça:	Gigante Curta Larga peq. Normal Delgada Isolada normal
2. Patologia da cabeça:	Subdesenvolvida Isolada patológica Estreita na base Piriforme Pequena anormal Contorno anormal	2. Implantação:	Retro Abaxial
3. Gota proximal		3. Cauda:	Oblíquo Dobrada
4. Formas teratológicas			
5. Defeito de P. I:	Desfibrilação, Fratura Edema Pseudogota		
6. Patologia da cauda:	Fortemente dobrada Dobrada com gota Enrolada na cabeça		

Alguns defeitos de maior importância para a avaliação morfológica são defeitos da cabeça, incluindo os de acrossoma; cabeça isolada, sendo essa apresentada com forma normal; defeitos da peça intermediária e cauda ou peça principal (CBRA, 1998).

Dividindo por estruturas, citam-se os defeitos da cabeça como forma, tamanho e contorno, geralmente influenciando na fertilidade por comprometimento com o material genético, e relação com a condensação da cromatina espermática (OSTERMEIER et al., 2001). As alterações em nível de acrossoma são pouco vista, mas, quando encontradas pode interferir diretamente na fecundação e desenvolvimento embrionário. E com relação aos demais defeitos os da cauda são considerados os mais comuns e que prejudicam na movimentação do espermatozóide, impedindo os mesmos de se locomover até o óvulo (CBRA, 1998; FRENEAU et al., 2010).

2.3.1. Criopreservação espermática

Os diversos processos que os espermatozoides passam para ser excretados influenciam muito na determinação das patologias ou anormalidades dos mesmos (ARRUDA et al, 2015). Porém já foi visto que práticas como as biotecnologias podem ser as causadoras de injúrias e comprometer a reprodução do animal (MEDEIROS et al, 2002).

Inseminação artificial, Transferência de embrião entre outras são biotecnologias que tem a função de selecionar animais geneticamente melhores que os de mais e ainda melhorar o trabalho e manejo das propriedades, e essas técnicas necessitam da avaliação prévia e preservação dos espermatozoides, utilizando na maioria das vezes a criopreservação para tal processo (MONTESINOS, 2012).

A criopreservação é uma técnica que visa suspender o metabolismo da célula e preservar suas características por um tempo maior (YOSHIDA, 2000), mas segundo Medeiros et al. (2002), a criopreservação reduz consideravelmente as funções do espermatozóide, causando certos danos, também chamados de crio-injúrias as estruturas. Pelas variações de temperatura, estresse oxidativo e osmolaridade (NOGUEIRA 2017).

4. METODOLOGIA

4.1. Localização

O experimento foi realizado no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba (IFPB) – Campos de Sousa, utilizando o Laboratório de reprodução e o laboratório de morfometria do Hospital Veterinário.

O campus está localizado no alto sertão da Paraíba, município de Sousa, perímetro irrigado de São Gonçalo. A região apresenta clima tropical semiárido, latitude sul de 6°50'14,69" e 38°17,43'43,69" de longitude oeste, altitude de 234 m, precipitação média anual de 894 milímetros (mm) e evaporação média anual de 3.056,6 mm. O clima da região é do tipo Bsh da classificação de Köppen, com dois períodos bem definidos, seco e chuvoso, com o período chuvoso entre janeiro e maio (DNOCS, 2017).

4.2. Grupos Experimentais

O experimento se deu em quatro momentos (grupos) o primeiro com o sêmen fresco recém coletado, sendo esse utilizado para avaliação morfométrica e patológica, o segundo após a diluição 1:1, com diluidor comercial para centrifugação (BotoSemen® - bothufarma) e centrifugado, o terceiro e quarto ao descongelamento das palhetas crio preservadas na geladeira a vapor e no sistema automatizado respectivamente.

4.3. Coleta e avaliação do sêmen

As coletas foram realizadas utilizando a vagina artificial, a mesma utilizada para equinos seguindo o trabalho de Fernandes (2012). Para auxiliar na coleta, foram utilizadas jumentas em cio natural ou induzidos, como manequim para que o macho apresentasse libido facilitando assim o ejaculado na vagina artificial, a qual estava aquecida com água a 45°C. Após a coleta o sêmen foi medido o volume em um tubo falcon graduado. Após esse processo o sêmen passou por avaliação das suas características macro e microscópica.

Para avaliação de congelamento de sêmen (SILVA NETO 2017), foram utilizados dois tipos de tratamentos sendo eles: congelamento na geladeira/vapor de nitrogênio líquido e o outro congelamento em maquina automático. Para esses tratamentos foram utilizado os diluentes botusêmen® e botucurio® ambos da botufarma para centrifugação e congelamento respectivamente.

As coletas se deram com intervalos de 48 horas, três vezes por semana, perfazendo um total de cinco coletas de cada asinino.

As lâminas utilizadas para as análises foram confeccionadas no período de outubro a novembro de 2016, durante a realização de outro experimento de reprodução em asininos na mesma instituição e laboratório.

4.4. Preparo de lâminas

Foram preparadas duas lâminas novas para cada momento, e realizado a técnica de esfregação, colocando uma gota do sêmen na lâmina e em seguida outra lâmina elevada obliquamente a um ângulo de 45° em relação a que estava com a gota de sêmen, assim a gota é puxada e não esfregada, segundo o Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal (CBRA 1998). Usamos a coloração do tipo panótico, composto pelas soluções de triarilmetano 0,1%, Solução dexantenos 0,1% e Solução de Tiazinas 0,1%, com sequência de imersões de 10 vezes em cada solução. O excesso de corante da lamina foi removido em água corrente e seco e temperatura ambiente. E as laminas foram armazenadas em uma caixa para futura avaliação morfológica.

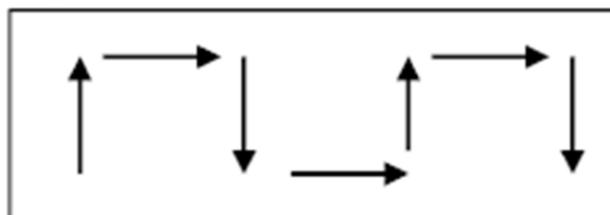
4.5. Avaliação morfológica

4.5.1 Patologias espermáticas

As lâminas foram avaliadas em microscópio óptico (100x), contadas 200 células, percorrendo a lâmina em forma de “zigue-zague” (Fig.1), para assim classificar os espermatozóides conforme suas patologias, obtendo no final as porcentagens de espermatozóides normais e de cada patologia de acordo com sua localização. Classificando essas em defeitos maiores ou menores, conforme o modelo proposto por Blom (1973). Os valores foram expressos em porcentagem e para interpretação dos resultados foram tidos como parâmetros os de equino descrito no CBRA (1998).

Foram avaliadas 12 lâminas, sendo três lâminas de cada momento, contabilizando 200 células por lâmina, perfazendo a contagem de 2.400 células.

Fig 1. Ilustração de avaliação em “ziguezague”



Fonte: CBRA, 1998

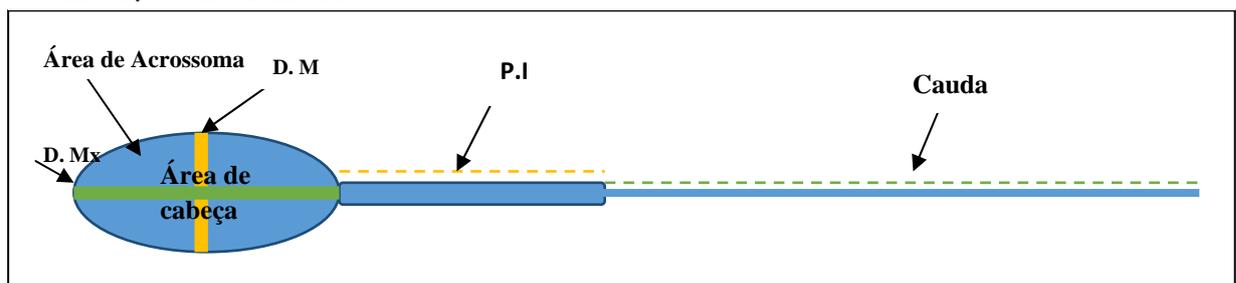
4.5.2 Morfometria espermática

Nas lâminas do grupo a fresco foram feitas mensurações básicas de cada estrutura do espermatozóide (cabeça, peça intermediária e cauda) com o intuito de determinar padrão morfométrico da raça Nordestina.

Foi realizadas as seguintes medições no software MImage (Microscope image processin) calibrado e com aumento de 100 vezes no microscópio óptico. Na cabeça avaliou-se, diâmetro máximo (DMx), diâmetro mínimo (DM), área da cabeça(AC), área do acrossoma, % de acrossoma (acrossoma/ AC) e na cauda foram feitas medição de peça intermediária e cauda (peça principal) (ARRUDA et al, 2011; CBRA, 1998). (Fig.2)

Foram medidas 600 células, sendo 200 células por animal e com escolha aleatória de lâminas das datas de coleta, sempre no momento a fresco.

Fig. 2- Desenho ilustrativo de um espermatozóide com suas respectivas estruturas e locais de medições morfométricas.



4.6. Análise estatística

Os dados obtidos das variáveis estudadas são apresentados como média e seus respectivos desvios padrão, como medidas de tendência central. Para análise, foi empregando a análise de variância (ANOVA). Nos casos em que houve significância no teste F ($P \leq 0,05$), as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey. O programa computacional Sigma Stat 3.1, foi empregado em todas as análises.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Morfologia espermática

Na Avaliação da morfologia espermática o percentual de defeitos encontrados nos asininos Nordestinos foram, 53,7%; 58%; 59,2% e 58,3%, para os momentos a fresco, centrifugado, criopreservados em geladeira vapor e sistema automatizado (máquina), respectivamente (Fig1). Conforme o colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998), o percentual de espermatozóides anormais no ejaculado não deve ultrapassar 30% na espécie equina. De base desse dado, os animais do nosso estudo encontram-se à cima do padrão estabelecido para essa espécie similar, demonstrando uma particularidade da qualidade espermática de cada espécie, mesmo a equina sendo tão semelhante.

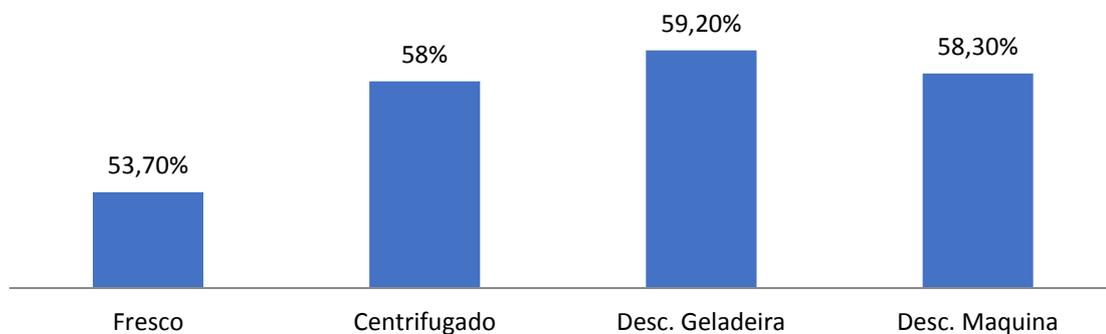


Fig. 3- Distribuição das médias dos espermatozóides com patologias, em diferentes momentos do congelamento espermático, de jumentos nordestinos. Nas fases a fresco, pos cetrifugação e adição de crioprotetor (pré-congelamento) e descongelados, após congelamento na geladeira e na maquina.

Diante disto, friza-se a importância de pesquisas específicas para cada espécie, pois já foram relatadas varias diferenças entre os equinos e os asininos. Sendo os asininos rotineiramente comparados aos equinos o que leva a erros drásticos no tratamento e melhoramento genético desses animais.

Além disto, esses valores de patologia elevados levam em consideração todos os defeitos descritos por Papa et, al. (2014), inclusive inserção abaxial, a qual nos trabalhos de Moraes et al (1994) e El Wishy (1974) ambos com asininos, notaram grande numero de células com a implantação abaxial e determinaram que, assim como nos equinos, esse defeito no espermatozóide asinino são considerados normais por ter alta incidência e sem casuísticas analisados com a infertilidade.

Ainda nessa avaliação percebemos o numero de patologias numericamente maiores após a técnica de congelamento, o que é esperado pelas lesões causadas aos espermatozóides

no processo de congelamento e descongelamento (MEDEIROS et al, 2002). Porém observamos que a técnica de congelamento foi viável, pois não demonstraram diferenças estatísticas entre os grupos.

Na (tab. 2) são apresentados as médias de defeitos maiores e menores, como indicados por Blom (1973), bem como a média dos defeitos totais de acrossoma, cabeça, cauda e formas teratológicas segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998), encontradas também na figura 4.

Os defeitos considerados maiores em média foi 12,3%; 16,4%; 12,7%; 14,7% e menores 41,4%; 41,6%; 46,5% e 44,3%, para os momentos a fresco, centrifugado, descongelado na geladeira e descongelado na maquina respectivamente. Conforme o CBRA(1998) os valores máximo de defeitos maiores não pode ultrapassar 20%.

Tabela 2. Média(x) e Desvio Padrão(DP) dos defeitos maiores e menores, assim como o total de anomalias acrossômicas, de cabeça, de cauda e de formas teratogênicas, em porcentagem em diferentes momentos do congelamento espermático (Grupos), de jumentos nordestinos. Nas fases pós a coleta (fresco), pós centrifugação e adição de crioprotetor (pré congelamento) e descongelados, após congelamento na geladeira e na máquina.

	Grupos			
	Fresco X (DP) %	Centrifugado X (DP) %	Desc. Geladeira X (DP) %	Desc. Maquina X (DP) %
Normal	46,3(±4,48) ^a	42(±0,50) ^a	40,8(±0,58) ^a	41,7(±2,02) ^a
Defeitos Maiores	12,3(±3,46) ^a	16,4(±2,31) ^a	12,7(±3,45) ^a	14(±1,40) ^a
Defeitos Menores	41,4(±7,44) ^a	41,6(±2,27) ^a	46,5(±3,03) ^a	44,3(±2,39) ^a
Defeitos de Acrossoma	0,12 (±0,11) ^a	0,13 (±0,23) ^a	1,27 (±1,07) ^b	1,7 (±0,75) ^{ab}
Defeitos de Cabeça	8,46(±0,30) ^a	11,7(±3,12) ^a	10,1(±0,86) ^a	9,64(±1,21) ^a
Defeitos de Cauda	45,1(±4,51) ^a	46,2(±3,29) ^a	47,8(±1,17) ^a	47(±2,18) ^a
Formas Teratogenicas	2,18(±1,57) ^a	0,89(±1,00) ^a	0,85(±0,32) ^a	0,78(±0,69) ^a

^{ab}Letras diferentes na linha representam diferenças estatísticas.

Tais dados demonstrando que os espermatozoides dos asininos Nordestinos, desta vez, estão dentro do padrão para espécie equina, que é a mais similar. Já Moraes et al (1994), teve valores a cima dos preconizados para o CBRA (1998) em asininos da raça pega, o que mais uma vez reforça a particularidade de cada espécie.

Também foram observadas diferenças estatísticas das patologias de acrossoma (Tab.2), onde os momentos pós-descongelamento se apresentaram superiores com relação ao pré-congelamento, dando ênfase no momento de congelamento em geladeira vapor. Isso demonstra a redução da qualidade espermática, em asininos, quando congelados em sistema geladeira vapor, provavelmente pela inexistência de padronização na curva de congelamento. Corroborando e ressaltando os resultados de Silva Neto (2017) que estudou a motilidade espermáticas usando os dois tratamentos (Geladeira vapor e Sistema automatizado- maquina) para congelamento de sêmen em asinino nordestino, onde o resultado da geladeira vapor foi inferior, não atendendo aos parâmetros do CBRA (1998). Porém a não diferença entre as duas técnicas de congelamento demonstra que, caso usado em vivo, este sêmens devem atingir taxas semelhantes de prenhes.

Ainda observamos diferença estatística de Cabeça, em especial a patologia globuliforme, nos momentos de centrifugado e descongelado na geladeira. Isso demonstra que as técnicas causam possíveis danos osmóticos ao espermatozóide. Mas que segundo CBRA (1998) essa alteração na célula é tida como defeito menor e não causa danos a fertilidade do animal. Na patologia de rutura de colo, também se encontrou diferença estatística entre os momentos fresco e centrifugado, sendo essa patologia considerada preocupante quando a mesma se encontra com anomalias associada à cabeça, o que não encontramos, demonstrando que o atrito, que é submetido no momento de centrifugação, pode sim causar danos a célula, mas não afeta a sua fertilidade, segundo a classificação de Blom (1973).

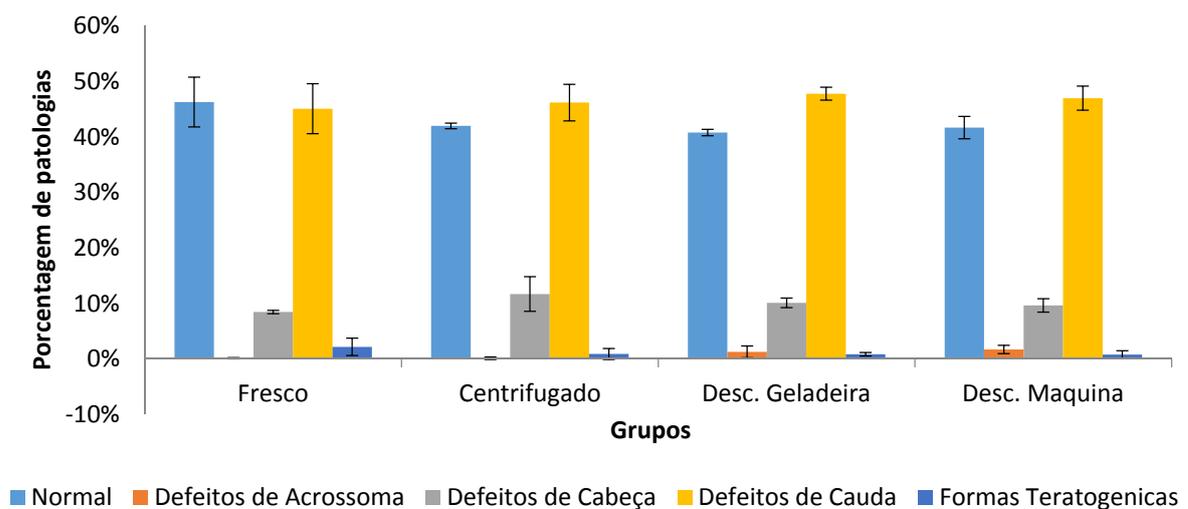


Fig.4- Distribuição das médias (desvio padrão) das patologias espermáticas, em diferentes momentos do congelamento espermático (Grupos), de jumentos nordestinos. Nas fases pós a coleta (fresco), pós centrifugação e adição de crioprotetor (pré congelamento) e descongelados, após congelamento na geladeira e na máquina.

Tabela 3. Média (X) e Desvio Padrão (DP) dos defeitos gerais encontrados na avaliação de patologia espermática no sêmen de jumentos Nordestino, nos momentos Fresco, Centrifugado, Desc. Geladeira e Desc. Maquina.

Patologias	Grupos			
	Fresco	Centrifugado	Desc. Geladeira	Desc. Maquina
Sem acrossoma	0,12(±0,11) ^a	0,13(±0,23) ^a	1,27(±1,07) ^b	1,40(±0,28) ^{ab}
Deformação do acrossoma	0(±0) ^a	0(±0) ^a	0(±0) ^a	0,30(±0,52) ^a
Estreita	2,86(±0,77) ^a	5,31(±1,66) ^a	5,36(±1,53) ^a	3,58(±1,70) ^a
Piriforme	0(±0) ^a	0(±0) ^a	0(±0) ^a	0,22(±0,38) ^a
Lanciforme	2,24(±0,58) ^a	2,7(±0,58) ^a	3,11(±0,11) ^a	2,43(±0,96) ^a
Raquetiforme	0,138(±0,12) ^a	0,55(±0,60) ^a	0(±0) ^a	0,40(±0,16) ^a
Globuliforme	2,14(±0,67) ^a	0,93(±0,46) ^b	0,61(±0,21) ^b	1,07(±0,21) ^{ab}
Gigante	0(±0) ^a	0,34(±0,41) ^a	0,42(±0,72) ^a	0,75(±0,55) ^a
Anã	1,09(±0,69) ^a	1,87(±0,48) ^a	0,64(±0,31) ^a	1,19(±0,51) ^a
Reta	13,9(±4,24) ^a	14,2(±2,51) ^a	18,9(±2,30) ^a	18,30(±1,21) ^a
Estreita	0,46(±0,45) ^a	0(±0) ^a	0(±0) ^a	0(±0) ^a
Abaxial	13,3(±4,31) ^a	13,1(±3,87) ^a	12,4(±1,73) ^a	12,80(±2,57) ^a
Paraxial	2,45(±1,45) ^a	0,716(±0,63) ^a	1,2(±0,90) ^a	0,99(±0,88) ^a
Retroaxial	0,13(±0,22) ^a	0,07(±0,11) ^a	0,17(±0,29) ^a	0,07(±0,13) ^a
Rutura de Colo	0,67(±0,12) ^a	3,79(±1,59) ^b	2,5(±0,67) ^{ab}	3,04(±0,90) ^{ab}
Curta	2,14(±0,20) ^a	1,01(±0,71) ^a	1,73(±0,67) ^a	1,60(±0,44) ^a
Comprida	1,54(±0,75) ^a	1,4(±0,40) ^a	2,29(±0,79) ^a	1,59(±1,04) ^a
Disforme	0,12(±0,11) ^a	0(±0) ^a	0,23(±0,21) ^a	0,34(±0,44) ^a
Ruturada	0,90(±0,51) ^a	2,38(±0,68) ^a	0,84(±0,30) ^a	1,64(±0,88) ^a
Repregueada	0,20(±0,03) ^a	0(±0) ^a	0,08(±0,14) ^a	0(±0) ^a
Fibrilar	0(±0) ^a	0(±0) ^a	0(±0) ^a	0,07(±0,12) ^a
Gota distal	0(±0) ^a	0,08(±0,13) ^a	0(±0) ^a	0(±0) ^a
Gota na cauda	1,99(±0,13) ^a	2,43(±0,52) ^a	1,14(±1,01) ^a	1,86(±0,87) ^a
Gota na P.i	0,91(±0,30) ^a	1,26(±0,33) ^a	0,87(±0,54) ^a	0,79(±0,54) ^a
Fortemente enrolada	2,71(±2,91) ^a	3,09(±1,88) ^a	2,87(±0,82) ^a	2,16(±1,15) ^a
Espiraliforme	0,16(±0,27) ^a	0,31(±0,36) ^a	1,12(±0,61) ^a	0,54(±0,31) ^a
Enrolada a cabeça	1,06(±0,94) ^a	0,31(±0,27) ^a	0,53(±0,46) ^a	0(±0) ^a
Rudimentar	0,18(±0,31) ^a	1,06(±0,78) ^a	0,07(±0,12) ^a	0,34(±0,25) ^a
Cabeça dupla	1,69(±1,18) ^a	0,54(±0,74) ^a	0,54(±0,27) ^a	0,57(±0,47) ^a
Cauda dupla	0(±0) ^a	0,14(±0,13) ^a	0,15(±0,13) ^a	0,14(±0,12) ^a
PI dupla	0,49(±0,43) ^a	0,209(±0,20) ^a	0,15(±0,13) ^a	0,07(±0,13) ^a

^{ab}Letras diferentes na linha representam diferenças estatísticas.

Individualmente os defeitos que predominaram foi anomalias de cauda, na maioria fortemente enroladas e defeitos de peça intermediária. Em segundo lugar os mais observados foram os defeitos de cabeça, predominando os defeitos considerados menores, os quais não contribuem para infertilidade do sêmen (Tab.3). Corroborando com o trabalho de Moraes et, al. (1994).

Diante disto observamos que as técnicas de congelamento utilizadas, assim como o processo de centrifugação não levaram a maiores lesões nos espermatozoides, demonstrando que provavelmente o sêmen asinino pode sofrer criopreservação pelo mesmo processo que o sêmen equino.

5.2. Morfometria espermática

Para a caracterização de acordo com particularidades em estruturas do espermatozoide, a avaliação morfométrica determinou para a raça Nordestina de asininos (tab.4), que os espermatozoides apresentam-se com os as medições, de Área da Cabeça: 407,10 ($\pm 47,54$); Área do acrossoma: 238,49 ($\pm 43,04$); Diâmetro maior: 6,18 ($\pm 0,38$); e Diâmetro menor da cabeça: 3,19 ($\pm 0,28$); Porcentagem de acrossoma: 59% ($\pm 0,08$); Fator de elipse: 52% ($\pm 0,05$) Peça intermediária: 11,30 ($\pm 2,17$) e cauda: 41,81 ($\pm 3,38$). Assim corroborando com os dados de equino que segundo Quintero & Rodriguez (2009) o espermatozoide de equino apresentaram medições de cabeça, 6 a 7 microns de diâmetro maior por 2,8 a 3,3 microns de diâmetro menor. Acrossoma ocupando um terço da cabeça, e cauda medindo 46 a 53 microns de comprimento.

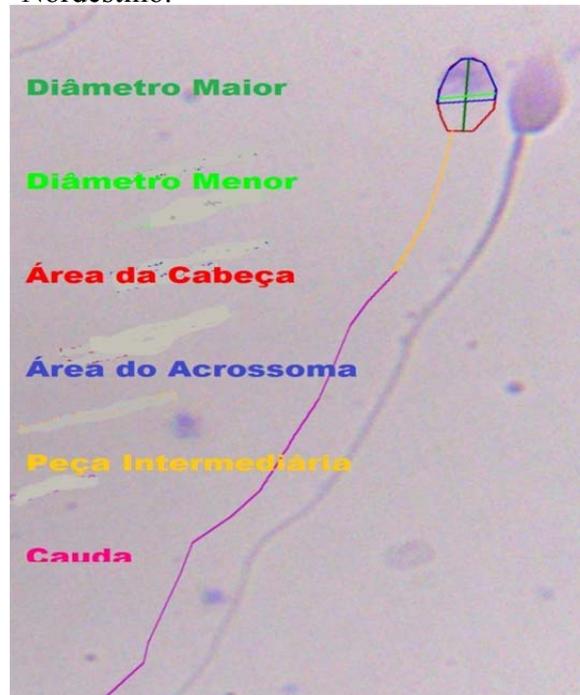
Tab.4 - Media (\pm desvio padrão) dos valores morfométricos, (μm) encontrados para as medições de Cabeça (diâmetro maior, menor e a área da cabeça), Acrossoma (área e porcentagem em relação ao total da cabeça), Peça intermediária (tamanho em comprimento) e comprimento de Cauda dos asininos Nordestinos.

VARIÁVEL	Média (\pm D.P) μm
Diâmetro Menor	3,19 ($\pm 0,28$)
Diâmetro Maior	6,18 ($\pm 0,38$)
Área da Cabeça	407,10 ($\pm 47,54$)
Área do Acrossoma	238,49 ($\pm 43,04$)
% de Acrossoma	0,59 ($\pm 0,08$)
Peça Intermediária	11,30 ($\pm 2,17$)
Cauda	41,81 ($\pm 3,38$)

Desta maneira, para facilitar os estudos para essa espécie e por ajudar na avaliação espermática mediante a regulação de aparelhos como exemplo o sistema computadorizado da

motilidade espermática (CASA), que mensuram a morfologia espermática de acordo com padrões de medidas para cada espécie.

Imagem. 3 – Espermatozóide de Asinino Nordesteño.



Os espermatozóides dos asininos se apresentaram mais globuliforme (Imagem.3), o que segundo Canisso (2008) em 1992 e 1959 Nishikawa comparou o sêmen asinino com de equino, e percebeu que o espermatozóide asinino assemelha-se mais com o espermatozóide bovino do que com os demais animais. Reforçando, mais uma vez, que mesmo com tantas semelhanças o jumento nordestino não é uma miniatura do equino e sim outra espécie com característica e particularidades próprias.

6. CONCLUSÃO

Concluimos que os parâmetros da morfologia espermática de asininos Nordestinos apresentam-se semelhantes em algumas avaliações com os parâmetros descritos para equino, porém apresentam também diversas particularidades que diferem até mesmo entre as raças, com isso friza-se a importância de estudar cada indivíduo por apresentarem características distintas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEPGA. **Associação para o estudo e proteção do gado asinino**. Disponível em:

<<http://www.aepga.pt/portal/PT/109/default.aspx>>. Acessado em: 02 de Maio de 2017.

ALMEIDA, L.D. **Diversidade genética de raças asininas criadas no Brasil, baseada na análise de locos microssatélites e DNA mitocondrial**. 2009. 83 p. Dissertação- Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília.

ARRUDA, R.P. ENEIVA C.C. CELEGHINI, A.F.C ANDRADE, A.R. GARCIA, J. NASCIMENTO, C.F. RAPHAEL, L.W.O. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TEFT. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA. **Anais**. Londrina, Brasil, p.166-179. 2004.

ARRUDA, R.P. CELEGHINI, E.C.C. ALONSO, M.A. CARVALHO, H.F. L.Z. OLIVEIRA, J. NASCIMENTO, D.F. SILVA, F.J. AFFONSO, K.M, LEMES, J.D. JAIMES . Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros .**Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.35, n.2, p.145-151, 2011.

ARRUDA.R.P, CELEGHINI.E.C.C, GARCIA. A.R. et al. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Revista Brasileira Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.39, n.1, p.47-60. 2015.

BELETTI, M. E. COSTA, L. F. VIANA, M. P. A computational approach to characterization of bovine sperm chromatin alterations. **Revista Taylor & Francis healthsciences**. Biotechnic & Histochemistry, 79 p: 17_ 23. 2004.

BLOM,E. The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification of Bull spermogram. **Nordic Veterinary Medicine**, v.25, p. 383-391, 1973.

CANISSO, I. F. SOUZA, F. A. CARVALHO, G. R. GUIMARÃES, J. D. SILVA, E. C. LIMA, A. Alguns aspectos fundamentais do exame clínico andrológico de jumentos (*Equus asinus*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.4, p.233-239, 2008.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 52 p.1998.

DEPARTAMENTO NACIONAL DE OBRAS CONTRA SECA. **Perímetro irrigado de São Gonçalo**. Disponível em:

<http://www.dnocs.gov.br/~dnocs/doc/canais/perimetros_irrigados/pb/sao_goncalo.htm>.

Acesso em: 26 de Maio de 2017.

DOMINGUES, O. **Introdução à Zootecnia**. Rio de Janeiro: Serviço de informação Agrícola – Ministério da Agricultura. 386 p. (Série didática – nº.5). 1968.

EL WISHY, A.B. Morphology of epididymal spermatozoa in the ass (*Equus asinus*) and stallion (*Equus caballus*) Revista: **Ms. received** vol. 3. P 67-72. 1974.

FERNANDES, L.S. **comportamento sexual, parâmetros seminais e diluição pós-congelamento de sêmen de jumentos (equus asinus) da raça pega**. 2012. 78 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

FRENEAU GE, CHENOWETH PJ, ELLIS R, RUPP G. Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods. **Revista Animal Reproduction Science** , v.118, p.176-181, 2010.

GARCIA AR. **Efeitos do estresse térmico testicular e do uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozoides de touros Simental (*Bos taurus taurus*)**. 258f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga. 2004.

HAFEZ, E.S.E. Transporte e sobrevivência de gametas. In: **Reprodução Animal**, 7 ed. Barueri: Manole Ltda, 2004. cap.6, p.83-96.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário 2006**. Disponível em:

<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2006/ppm2006.pdf>>. Acesso em: 26 de Maio de 2017.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo, Agropecuário 2011**. Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2011/default_pdf.shtm>. Acesso em: 26 de Maio de 2017.

JOHNSON, L.; VARNER, D.D.; ROBERTS, M.E.; SMITH, T.L.; KEILLOR, G.E.; SCRUTCHFIELD, W.L. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Revissta Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.471-480, 2000.

MARIANTE, A.S.; CAVALCANTE, N. **Animais do descobrimento: raças domésticas da história do Brasil**. 274 p, Brasília: Embrapa Sede/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2006.

MELDAU, D.C. **morfometria do núcleo espermático associada à avaliação histológica testicular em bovinos**. 35p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 2013.

MEDEIROS, C.M.O, FORELL, F., OLIVEIRA, A.T.D., ET AL. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better. **Jornal Theriogenology: Elsevier Science Inc.** vol. 57. Pag 327-344. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2002.

MONTESINOS, I.S. **Avaliação espermática do semen criopreservado de touros curraleiro/pé duro em banco de germoplasma**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás. P. 67. 2012.

MORAIS, R.N. et al. Biologia reprodutiva de jumentos. II. Características físicas e morfológicas do sêmen. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.31. n.1, p.49-57, 1994.

MRUK DD, CHENG CY. Sertoli-sertoli and sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. **Revista Endocrinologia**, v.25, p.747-806, 2004.

NOGUEIRA, M.B.R. **efeitos da adição in vitro de aminoácidos na qualidade seminal de asnos andaluzes após o descongelamento.** p. 94. Tese (Doutorado em veterinária) - universidade federal de Lavras, Minas Gerais. 2017.

OSTERMEIER, G.C.; SARGEANT, G.A.; YANDELL, B.S.; EVERSON, D.P.; PARRISH J.J. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. *Journal of Andrology*, v.22, p.595-603, 2001.

PAPA.F.O, ALVARENGA.M.A, DELL'AQUA JR. J. A. MOMTEIRO, G. A. SANCLER SILVA, Y. F. R. NETO, C. R. **Manual de andrologia manipulação de sêmen equino.** P. 60. 2014.

PESCH S, BERGMANN M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability and cryopreservation. *Revista Micron*, v.37, p.597-612, 2006.

PUGLIESI,G. **Viabilidade e fertilidade do sêmen equino resfriado a 5°C por 24 horas com dois diluidores.** 103p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. 2009.

QUINTERO, A.L, RODRIGUEZ.A.Y., Comparación Morfométrica de Espermatozoides Humanos y de Animales Domesticos, Teñidos con la Coloración Árbol de Navidad. 2009.

SILVA..L.M. SILVA C.M.G, CAVALCANTE T.V. et al. Utilização do Corante Rosa Bengala no Método de Preparação Úmida para Avaliação Morfológica de Sêmen Ovino. *Revista Científica Produção Animal.*, v.10. n.2. 2008.

SILVA NETO.V.A. **Qualidade espermática do sêmen de jumentos nordestinos submetido a processos de conservação pelo frio.** Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - IFPB- Campus Sousa. p.40. 2017.

YOSHIDA,M. Conservation of sperms: current status and new trends. *Revista Animal reproduction science.* Amsterdam, v.57, p. 149-179. 2000.

ZHOU,Q.;GRISWOLD, M. D. REGULATION OF SPERMATOGONIA. In: MELTON, D. A. stembook.[online]. Cambridge (MA): **Harvard stem cell institute**, 2008. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/zBK27035/>>. Acesso em: 10 set. 2017.