

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

Herbert Adames Lira dos Santos

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE ESPERMÁTICA DE OVINOS SANTA INÊS
SUBMETIDOS À CRIOPRESERVAÇÃO UTILIZANDO DIFERENTES MEIOS E
MÉTODOS

SOUSA, PB

2019

Herbert Adames Lira dos Santos

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE ESPERMÁTICA DE OVINOS SANTA INÊS
SUBMETIDOS À CRIOPRESERVAÇÃO UTILIZANDO DIFERENTES MEIOS E
MÉTODOS

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.

Orientadora: Prof^a Dra. Patricy de Andrade Salles

SOUSA, PB

2019

Herbert Adames Lira dos Santos

Trabalho de Conclusão de Curso Defendido e Aprovado em ____/____/____ pela
Comissão Examinadora:

Orientador(a):

Dra. Patricy de Andrade Salles
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba
Medicina Veterinária

Avaliadores (a):

Dra. Inez Liberato Evangelista
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba
Medicina Veterinária

Avaliadores (a):

Dra. Amélia Lizziane Leite Duarte
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba
Medicina Veterinária

SOUSA, PB

2019

Dedico este trabalho ao meu Deus, por estar
sempre comigo me dando forças e não
me deixar desistir dessa conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente á Deus, pois sem Ele isso nunca teria acontecido em minha vida, por estar comigo em momentos bons e ruins, por me auxiliar em toda essa árdua jornada.

Á minha mãe Maria de Lourdes, que não só me deu apoio como me ajudou em tudo, na minha formação profissional, na formação do meu caráter, na minha educação, mesmo diante de todas as dificuldades sempre quis o meu melhor, devo tudo que tenho e tudo o que eu sou hoje á ela, essa grande mulher guerreira e batalhadora, exemplo a ser seguido. Por estar sempre me colocando em suas orações sou muito grato por ter a melhor mãe que existe. Te amo mãe!

Agradeço á minha noiva Melissa Nogueira, por ser o meu braço direito, por estar comigo em toda essa jornada, me aconselhando sabiamente, me guiando, um anjo que Deus colocou em minha vida, por nunca ter deixado eu sair do foco, sem ela nada disso estaria acontecendo. Te amo.

Á meus irmãos Annyelly e José Neto, por estarem comigo, me ajudando sempre que podiam, me aconselhando, lembrando que a família é nossa base, nossa origem, e por estarmos sempre unidos dando a volta por cima e conseguindo driblar as dificuldades da vida.

Á minhas sobrinhas Eloá Ester e Ana Vivian, por me propiciar essa incrível sensação de ser tio, pelos sorrisos ao chegar, por nossas brincadeiras e todos os momentos felizes.

Agradeço á minhas tias e tios que acompanharam de perto o meu crescer, que me deram apoio e não deixaram que me faltasse nada, a todos que oraram por mim, muito obrigado!

A meu sogro Francisco Nogueira, por ter me dado sempre a mão, por ser meu sócio em muitas coisas, por ter me dado oportunidades que não imaginei que pudesse ter, por ser mais que sogro, ser amigo, conselheiro, pai de família exemplar, homem reto que tenho como espelho, por me ajudar em tudo, agradeço por ser como um pai pra mim.

À minha sogra Marlete Lopes Nogueira, por ser essa pessoa de coração bom, por ser sábia e sempre me aconselhar para o meu melhor, por estar sempre de prontidão, me ajudando muito em tudo, minha segunda mãe, muito obrigado.

A minha cunhada Michelle Lopes e seu esposo Ediluzio, por todas as brincadeiras e viagens que fizemos por todos esses momentos ímpares, obrigado.

A todos que fizeram parte da minha historia acadêmica o meu muito obrigado.

RESUMO:

O Semiárido Brasileiro é caracterizado por altas taxas de insolação, altas temperaturas, baixa precipitação pluviométrica e baixa umidade onde o sistema de criação ovino é predominantemente semiextensivo. Na região Nordeste, em especial no Alto Sertão Paraibano, a produtividade desses animais ainda é relativamente baixa quando comparada a todo potencial disponível na região, demonstrando a necessidade de técnicas capazes de aperfeiçoar o melhoramento genético. Diante disto, a criopreservação do sêmen se mostra como uma biotécnica alternativa para potencializar o desempenho reprodutivo de rebanhos ovinos no Semiárido. O trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade espermática de ovinos Santa Inês utilizando diferentes meios e métodos de congelamento. Para o Experimento foram utilizados três ovinos machos da raça Santa Inês, pré-selecionados por exame clínico e andrológico para garantir que todos estivessem saudáveis e se apresentassem púberes e na mesma faixa etária. Os animais foram mantidos em sistema de criação semi-intensivo, submetidos à pastejo em capim nativo, suplementados com concentrado composto de farelo de milho, pré-mix mineral além de água a vontade durante todo período experimental. Os animais foram submetidos a período de adaptação por 15 dias, e tiveram sanidade comprovada. As coletas de sêmen foram realizadas com a utilização de vagina artificial (modelo Walmur®) com um total de 5 repetições realizadas duas vezes por semana durante os meses de Novembro e Dezembro de 2018. As amostras de sêmen, logo após a coleta foram avaliadas macro e microscopicamente observando as características de volume, aspecto, turbilhonamento, motilidade progressiva e vigor. Após avaliado, uma parte do sêmen foi diluído no meio Tris-gema produzido no laboratório, e outra parte diluída em meio comercial. Após a diluição, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,25ml. A criopreservação foi dividida em dois grupos: método manual e método automatizado (TK 3000®). Após o descongelamento do sêmen, a 37°C por 30 segundos, as amostras foram novamente avaliadas quanto aos parâmetros observados antes do congelamento, comparando os meios e métodos utilizados. Pode-se concluir que não houveram diferenças significativas entre os diferentes meios e métodos de congelamento de sêmen de ovinos da raça Santa Inês, apresentando valores semelhantes entre si no pós-descongelamento.

Palavras-chave: Sêmen. Banco de germoplasma. Ovinocultura. Desempenho reprodutivo.

ABSTRACT:

The Brazilian semi-arid region is characterized by high insolation rates, high temperatures, low rainfall and low humidity where the sheep farming system is predominantly semiextensive. In the Northeast region, especially in Alto Sertão Paraibano, the productivity of these animals is still relatively low when compared to all available potential in the region, demonstrating the need for techniques capable of improving genetic improvement. In view of this, the cryopreservation of semen is shown as an alternative biotechnique to enhance the reproductive performance of sheep herds in the Semiarid region. The objective of this study was to evaluate the sperm quality of Santa Inês sheep using different methods and freezing methods. For the experiment were used three male sheep of the Santa Inês race, pre-selected by clinical and andrological examination to ensure that all were healthy and presented pubescent and in the same age group. The animals were kept in a semi-intensive rearing system, submitted to grazing in native grass, supplemented with concentrate composed of corn meal, mineral pre-mix and water at will throughout the experimental period. The animals were submitted to adaptation period for 15 days, and were sanctioned. Semen collections were performed using an artificial vagina (Walmur modelo model) with a total of 5 replications performed twice a week during the months of November and December 2018. Semen samples were collected shortly after collection and microscopically observing the characteristics of volume, appearance, swirling, progressive motility and vigor. After being evaluated, one part of the semen was diluted in the Tris-gem medium produced in the laboratory, and another part diluted in commercial medium. After dilution, the samples were packed in 0.25 ml vats. Cryopreservation was divided into two groups: manual method and automated method (TK 3000®). After the semen thawed at 37°C for 30 seconds, the samples were again evaluated for the parameters observed before freezing, comparing the means and methods used. It can be concluded that there were no significant differences between the different methods and methods of freezing semen of Santa Inês sheep, presenting similar values among themselves in post-thawing.

Keywords: Semen. Germplasm bank. Sheep. Reproductive performance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Medição do perímetro testicular de ovino Santa Inês utilizado no experimento	19
Figura 2 - Volume de sêmen in natura pós coleta	20
Figura 3 - Gota de sêmen na lâmina para avaliação microscópica.....	20
Figura 4 - Estante artesanal utilizada no experimento para congelamento do sêmen na geladeira/vapor de nitrogênio	21
Figura 5 - Máquina TK 3000 utilizada no experimento para congelamento do sêmen.....	22
Figura 6 - Palhetas com sêmen alocadas na máquina TK 3000 antes de iniciar o processo de congelamento.....	22
Figura 7 - Descongelamento do sêmen em banho maria a 37°C durante 30 segundos	23
Figura 8 - Avaliação dos parâmetros de vigor e motilidade do sêmen pós-descongelamento	23
Gráfico 1 - Vigor e motilidade pós descongelamento com método automatizado	27
Gráfico 2 - Vigor e motilidade pós descongelamento método manual	27

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Médias e desvios-padrão ($\mu \pm s$) dos valores dos parâmetros FR (mpm), temperatura corpórea (°C), frequência cardíaca (bpm) e diâmetro testicular (cm) de ovinos submetidos à avaliação da integridade de espermatozoides in natura e criopreservados utilizando dois meios e métodos para o congelamento do sêmen. 25
- Tabela 2** - Resultado da Anova quanto ao número de palhetas, vigor e motilidade pós-descongelamento..... 26
- Tabela 3** - Resultados do qui-quadrado quanto ao número de palhetas, vigor e motilidade no pós-descongelamento..... 26

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - porcentagem

°C – graus celsius

bpm – Batimentos por minuto

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal

cm – centímetros

DMSO - Dimetilsulfóxido

FC – Frequência cardíaca

FR – Frequência respiratória

g – gramas

IBGE – Instituto Brasileiro de Geográfico de Estatística

IFPB – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia

ml – Mililitros

mm - Milímetros

mpm – Movimentos por minuto

OPG – Ovos por grama de fezes

PE – Perímetro escrotal

sptz/MI – Espermatozóides por mililitros

µL – Microlitros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Animais e grupos experimentais.....	18
3.2 Coleta e avaliação morfofisiológica do sêmen.....	19
3.3 Diluição e Congelamento do sêmen.....	20
3.4 Avaliação do sêmen após o descongelamento.....	22
3.5 Análise estatística.....	23
3.6 Princípios Éticos.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1 Parâmetros fisiológicos.....	24
4.2 Comparativo entre meios e métodos de congelamento.....	25
5. CONCLUSÕES.....	29
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
APÊNDICE A – Lista de Tabelas.....	34
APÊNDICE B – Lista de Gráficos.....	37

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura representa uma importante atividade socioeconômica na região Semiárida Brasileira. Em pesquisa realizada pelo IBGE (2018), o Brasil conta com um rebanho de aproximadamente 17,97 milhões de cabeças. O Semiárido Brasileiro detém 64,2% deste rebanho nacional, e nesta região, a criação de ovinos é uma atividade básica e generalizada que permeia na grande maioria das propriedades rurais, principalmente das áreas Semiáridas (LINS, 2017). Entretanto, a produtividade desses animais na região Nordeste, em especial no Alto Sertão Paraibano, ainda é relativamente baixa quando comparada a todo potencial disponível na região, demonstrando a necessidade de técnicas capazes de aperfeiçoar o melhoramento genético.

O Semiárido Nordestino é caracterizado por apresentar altas taxas de insolação, altas temperaturas (média de 26-38°), baixa precipitação pluviométrica (700 mm anuais) e umidade (variando de 60% a 75% com alta evapotranspiração). Esses índices ambientais criam uma condição que facilmente pode colocar os animais fora do seu conforto térmico, contribuindo negativamente no desempenho reprodutivo destes (INMET, 2017).

Os ovinos são poliéstricos estacionais e o fotoperíodo é quem determina essencialmente essa sazonalidade, cujo efeito é individualmente manifestado em latitudes superiores a 35° (BARBAS et al., 2002). Um melhor desempenho reprodutivo é observado, nos períodos do ano que o dia se torna mais curto, entretanto esse mecanismo fisiológico não é notado no Nordeste Brasileiro. Acredita-se que animais criados nessa região tenham se adaptado e perdido essa capacidade sem comprometer sua eficiência reprodutiva. Entretanto, segundo (SIMPLICIO, 2008), há outros fatores que são responsáveis pela interferência no ciclo reprodutivo dos animais em determinadas épocas do ano, sendo o estresse provocado por altas temperaturas considerado um dos fatores de maior interferência no desempenho reprodutivo da espécie em estudo. Na microrregião de Sousa - PB, os fatores climáticos do Semiárido em períodos de estiagem, somados a manejos reprodutivos e nutricionais inadequados (LINS et al., 2015; LINS et al., 2016) podem contribuir negativamente para a qualidade espermática dos reprodutores da região, em determinados períodos do ano. Diante disto, a criopreservação do sêmen pode ser uma alternativa tecnológica capaz de potencializar o desempenho reprodutivo de rebanhos ovinos, na região em estudo. Segundo CASTELO et al. (2008), os ejaculados de alguns animais domésticos possui uma quantidade maior de espermatozoides do que seria necessário para a fecundação. Assim, a diluição do sêmen mostra-se como excelente opção, agregando um maior aproveitamento do ejaculado em um maior número de fêmeas,

pois tal tecnologia tem um importante papel na produção animal, proporcionando a realização da inseminação artificial, facilitando o controle reprodutivo e auxiliando na realização de testes de progênie mais precisos em um menor espaço de tempo. Além disso, possibilita a criação de um banco de germoplasma, proporcionando a manipulação de material genético (LEBOEUF et al., 2000).

O presente trabalho tem como objetivo avaliar os diferentes meios e métodos de congelamento do sêmen de ovino.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A busca incansável pelo melhoramento da produtividade animal, principalmente no que tange a produção de carne ovina no Nordeste Brasileiro, vem levando a uma necessidade de incrementação do manejo reprodutivo desses animais e uma das alternativas é a utilização de biotecnologias que possam auxiliar na melhoria da eficiência reprodutiva animal (COUTINHO, 2010). Diante de todo avanço tecnológico, as biotecnologias de ordem reprodutiva são as que oferecem uma maior e melhor relação custo/benefício ao produtor rural quando empregada em programas de melhoramento genético dos animais. Arelada a isso o congelamento de sêmen vem com o objetivo de aumentar a propagação genética desejada em um curto espaço de tempo e propiciar o controle da sanidade dos reprodutores e matrizes através da erradicação de doenças sexualmente transmissíveis, reduzindo riscos e custos com aquisição e transporte de reprodutores, perpetuando as características de reprodutores que perderam a capacidade de cobrir ou mesmo que vieram a óbito (CASTELO et al., 2008).

O estresse térmico é uma situação de desconforto que ocorre quando o calor produzido no metabolismo animal é maior que o calor dissipado para o ambiente. Esse tipo de estresse pode levar a alterações fisiológicas como aumento da frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal, mudanças visíveis de comportamento, queda na imunidade, diminuição da eficiência reprodutiva e queda na produtividade, este último fato está relacionado a um aumento da ingestão de água e diminuição da ingestão de alimentos, levando assim a diminuição do ganho de peso diário e comprometendo a eficiência reprodutiva (MAIA, 2011). Pois a nutrição é um fator de extrema importância na influência do desempenho reprodutivo, uma vez que deficiências nutricionais podem ser responsáveis por desenvolver queda da produção de espermatozoides (SILVA et al., 2011).

A criopreservação é um processo que envolve as fases de redução de temperatura, desidratação celular, congelamento e descongelamento do sêmen (MEDEIROS et al., 2002), podendo ser realizada de várias maneiras, contudo, para o sucesso do processo todas as etapas devem ser realizadas de forma harmoniosa. De acordo com (MAXWELL E SALOMON, 1993), a técnica de criopreservação do sêmen, em conjunto com a inseminação artificial, é uma biotécnica reprodutiva que oferece muitas vantagens à indústria de produção animal, especialmente relacionada a programas de melhoramento animal. Todavia, para alguns reprodutores, a preservação de espermatozoides pelo frio constitui-se um problema, principalmente quando armazenados congelados, o que pode resultar em alterações biológicas e funcionais (ORTEGA et al., 2003). Além disso, SILVA et al. (2011) concluiu que ovinos

criados em regiões com variação dos índices pluviométricos sofrem ação da condição climática, sendo o período de menor índice pluviométrico deletério à integridade da célula espermática submetida ao processo de criopreservação. Na maioria dos casos as avaliações realizadas para determinar a qualidade espermática, representando o seu possível potencial de fertilidade, são a motilidade espermática, o vigor, a concentração espermática, anormalidades espermáticas e o teste de termo-resistência (lento ou rápido), realizados segundo recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

Devido ao pouco volume (0,5 a 2,0 mL) e alta concentração espermática ($2 \text{ a } 5 \times 10^9$ spz/mL), é necessário que se utilize diluentes para aumentar o volume total do ejaculado e assim obter maior proporção de doses inseminantes. Os diluidores visam primeiramente o aumento de volume, mas devem também favorecer a sobrevivência dos gametas masculinos e ser livres de materiais tóxicos para minimizar o desperdício de células (GONÇALVES et al., 2001). Existem diversas substâncias orgânicas e sintéticas (SALOMON & MAXWUEL, 2000) que são utilizadas e lançadas pela indústria para promover proteção aos espermatozoides durante a diluição, porém, o balanço entre concentração e interação desses agentes com o meio celular deve ser sempre mensurado que são os crioprotetores. São classificados como permeantes ou não permeantes.

Os crioprotetores permanentes no geral são solutos que passam facilmente as membranas celulares, atuando intra como no extracelular. São classificadas nessas categorias substâncias como glicerol, etilenoglicol, propilenoglicol, amidas, dimetilsulfóxido (DMSO) e álcoois poliidrícos. (MOLÍNIA et al., 1994) trabalharam com associações de etilenoglicol, propanodiol, DMSO e glicerol para a criopreservação de espermatozoides de ovinos os autores constataram que o DMSO é ineficaz para a criopreservação de sêmen de ovinos.

Os crioprotetores não permeantes são macromoléculas que não traspassam as membranas celulares e agem apenas no meio extracelular, como açúcares (lactose, trealose, rafinose, galactose, sacarose), proteínas do leite e da gema de ovo, albumina, soro e polímeros sintéticos, como a polivinilpirrolidona e a metilcelulose. Esses compostos melhoram a osmolaridade do meio diluidor, possibilitando a desidratação celular durante o congelamento (SALAMON E MAXWELL, 2000). Outros açúcares, como a glicose e a frutose, são adicionados aos meios diluidores, aumentando assim a osmolaridade do meio, entretanto, por serem capazes de penetrar na célula, acabam por balancear o gradiente osmótico. Além disso, tanto a glicose quanto a frutose são usados como fonte de ATP pela célula espermática, sendo que a glicose é metabolizada preferencialmente devido à maior afinidade da enzima hexoquinase (enzima responsável pela primeira etapa da glicólise) por esta (MANN, 1964).

2.1 Glicerol

Os primeiros relatos da utilização (POLGE ET AL., 1949; POLGE, 1951; POLGE E ROWSON, 1952), do glicerol com crioprotetor, sendo o mais aplicado para a preservação de espermatozoides de diversas espécies, inclusive ovinos (SALAMON E MAXWELL, 2000). Quimicamente é classificado como um álcool e apresenta fórmula molecular $C_3H_8O_3$, sendo 3 grupamentos hidroxila, tendo alta capacidade de ligação com a água, impedindo a formação e o crescimento de cristais de gelo no meio diluidor, além do mais possibilita a penetrar na célula, regulando assim o balanço osmótico intra e extracelular. Em poucos minutos de interação do glicerol com o espermatozoide (0 a 5 minutos) já são suficientes para ocasionar efeito crioprotetor satisfatório (SALAMON E MAXWELL, 1995; SALAMON E MAXWELL, 2000). O glicerol possui atividade direta na membrana plasmática, ao contrário dos outros crioprotetores permeantes. Estudos relatam que o crioprotetor se ligue diretamente aos fosfolípidos da membrana plasmática, reduzindo sua fluidez e interferindo em sua permeabilidade (PARKS E GRAHAM, 1992; MOLÍNIA et al., 1994).

2.2 Gema de Ovo

Desde a descoberta através de estudos, de suas ações (PHILLIPS, 1939; PHILLIPS E LARDY, 1940), a gema de ovo se tornou um dos principais complementos sendo indispensável para a manutenção do sêmen resfriado e também para sua criopreservação. (PHILLIPS E LARDY, 1940), em seus primeiros estudos, pode observar efeitos satisfatórios na adição de gema de ovo em meios para preservação do sêmen de bovinos a 5°C. Em meio aos principais efeitos da gema de ovo, está a proteção contra o choque térmico, a preservação da motilidade espermática, a diminuição da saída de enzimas acrossomais (hialuronidase) e a manutenção da integridade de membranas mitocondriais (SALAMON E MAXWELL, 1995). Apesar de se ter várias vantagens, por ser de origem animal, a gema traz sérios riscos de contaminação para o diluidor de sêmen. Estudos indicam a importância de se certificar a origem dos ovos utilizados em meios diluidores, uma vez que, dependendo de sua procedência, podem estar mais ou menos sujeitos à contaminação podendo colocar em risco o desempenho e a qualidade espermática. Até mesmo os diluidores comerciais, à base de ovo e/ou leite, apresentam algum grau de contaminação microbiana (BOUSSEAU et al., 1998). O uso da gema de ovo em pó, que passa pelo processo de pasteurização, permite redução da contaminação e melhor padronização das amostras. Outro ponto negativo na utilização da gema de ovo em meios diluidores é a dificuldade de se ter uma padronização das amostras, uma vez que a composição dos ovos pode variar dependendo da alimentação e da genética dos

animais (AMIRAT et al., 2005). Além disso, pode-se observar que a gema de ovo apresenta grânulos e outras substâncias (lipoproteínas de alta densidade e minerais) que previnem trocas metabólicas dos espermatozoides ou diminuem sua motilidade (KAMPSCHMIDT et al., 1953; PACE E GRAHAM, 1974; WATSON E MARTIN, 1975).

2.3 Métodos para criopreservação seminal

Após a diluição, é realizada a refrigeração do sêmen ovino. Essa etapa se constitui como principal método de armazenamento, onde se caracteriza pela redução da temperatura que originalmente encontra-se em torno de 37°C para temperaturas próximas a zero grau Celsius. Nesse período o espermatozóide sofre inibição reversível de seu metabolismo (CÂMARA & GUERRA, 2011). São utilizados diferentes métodos para promover a queda de temperatura, sejam eles automáticos ou manuais, a curva de queda da temperatura deve ser promovida de maneira constante e homogênea, evitando variações bruscas que podem resultar em choque térmico e redução da viabilidade espermática (WATSON, 2000; MEDEIROS et al., 2002).

O processo de criopreservação pode causar danos às organelas espermáticas mais precisamente nas membranas e induzir mudanças semelhantes à capacitação espermática e reação acrossomal na população sobrevivente (BAILEY et al., 2000). No processo de mudança na temperatura de 5°C positivos a -50°C, o que determina se as células espermáticas se manterão em equilíbrio com o meio extracelular ou progredir para uma supercongelamento com o possível aumento de gelo intracelular é a curva de congelamento (WATSON, 2000). NEIL (1999) e BYRNE et al. (2000) observaram que a congelamento rápida de 5°C positivos para -25°C com descenso de 5°C/minuto, teve melhor viabilidade, melhor atividade mitocondrial e integridade acrossomal do que com congelamento lenta (-0,5°C/min).

O princípio de funcionamento da máquina de congelamento de sêmen, modelo *TK 3000*, o processo se inicia em temperatura ambiente, 37°C, com controle eletrônico determinando a taxa de resfriamento (°C/min) de acordo com o programa selecionado. O resfriamento do porta palhetas é realizado sem usar nitrogênio líquido, utiliza-se para esta função o módulo eletrônico (Efeito Peltier) para que ocorra o resfriamento, sendo este módulo controlado pelo sistema computadorizado da máquina, proporcionando uma taxa de variação (°C/min) precisa e uniforme, desde a temperatura ambiente até 4 ou 5°C positivos (MOTTA, 2006). Após a refrigeração o operador retira o porta palheta do sistema de refrigeração e mergulha no nitrogênio contido no recipiente e o controle eletrônico passa a controlar a taxa de temperatura (°C/min) de congelamento de acordo com a curva selecionada. O controle atua sobre o porta palhetas contrapondo ao frio proporcionado pelo nitrogênio líquido. O equilíbrio entre

o frio do nitrogênio líquido e o aquecimento proporcionado pela eletrônica define a taxa de congelação ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$) programada de 5°C positivos até -120°C (MOTTA, 2006).

O sistema de criopreservação em geladeira/vapor de nitrogênio líquido tem se mostrado viável, porém, de difícil padronização dos ritmos de refrigeração e de congelação, uma vez que diversos fatores contribuem para induzir a variações no processamento do ejaculado a cada partida. Entre as variações estão; qualidade do material a ser processado, marca e modelo da geladeira, tipo da caixa isotérmica de poliestireno (isopor), nível de nitrogênio líquido, meio diluidor e a falta de habilidade do especialista (RODELLO, 2006).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia da Paraíba (IFPB) – Campus Sousa - Unidade São Gonçalo, no setor de Ovinocultura. As análises foram processadas no Laboratório de Ensino em Biotecnologia da Reprodução (LEBRE) do Hospital Veterinário do IFPB de Sousa. 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 $6^{\circ}50'14,69''$ e $38^{\circ}17,43'43,39$ de longitude Oeste, altitude de 237 metros e precipitação média anual de 654 mm. A temperatura média anual é de 27°C , com máxima de 38°C , e umidade relativa média de 61%. A vegetação predominante da região é a caatinga hiperxerófila, INMET (2017).

3.1 Animais e grupos experimentais

Foram utilizados três ovinos machos da raça Santa Inês, com idade entre um ano e um ano e meio caracterizando a idade reprodutiva. A fim de aferir a sanidade dos animais foram realizados exames clínicos e andrológicos (figura 1). O perímetro escrotal foi avaliado para garantir que os animais estivessem púberes, pois o perímetro testicular é um excelente padrão para determinar reprodutores de boa qualidade CELIS et al. (1987). Os ovinos passaram por período de adaptação durante 15 dias onde foram levados a clínica de grandes animais e feita as coletas de sêmen.

Os animais eram mantidos em sistema de criação semi-intensivo, submetidos à pastejo em capim nativo, suplementados com concentrado composto de farelo de milho, pré-mix mineral além de água a vontade. Durante todo período experimental os animais foram submetidos à avaliação dos parâmetros fisiológicos, tais como frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura corporal.

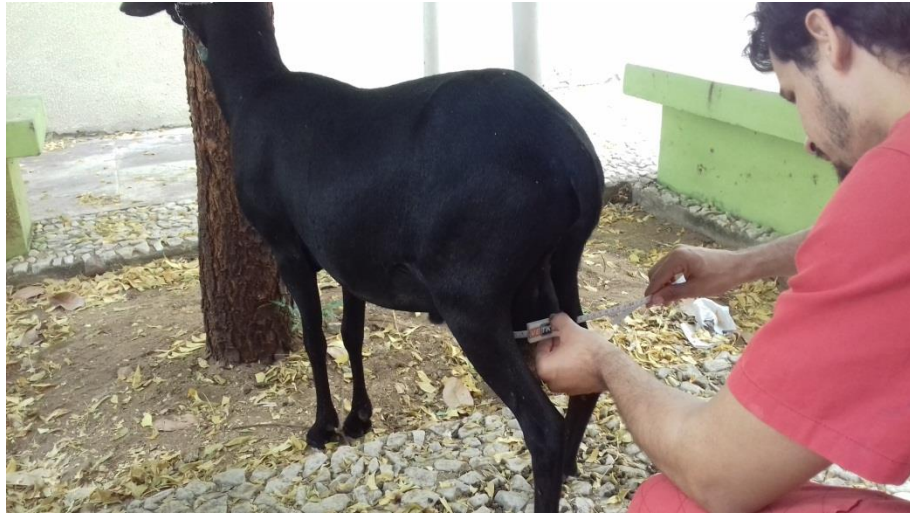


Figura 1- Medição do perímetro testicular de ovino Santa Inês utilizado no experimento

Fonte: Arquivo pessoal

3.2 Coleta e avaliação morfofisiológica do sêmen

Antes da realização das coletas foram feitas avaliação do perímetro testicular (PE), frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e temperatura corporal de todos os animais. As coletas de sêmen foram realizadas com a utilização de vagina artificial (modelo Walmur®) duas vezes por semana durante os meses de Novembro e Dezembro de 2018, compreendendo um total de 5 repetições. As amostras de sêmen coletadas foram separadas em dois grupos, manual e automatizado, para cada grupo foram separadas cinco amostras com o meio comercial e cinco amostras com o meio produzido no laboratório. As amostras foram avaliadas macro e microscopicamente observando as características de volume, aspecto, odor coloração (figura 2) turbilhonamento, motilidade progressiva e vigor (figura 3). Para as devidas análises, foram utilizados 10 μ L de sêmen em lâmina previamente aquecida a 37°C, para a observação do turbilhonamento vigor e motilidade.

A concentração espermática do ejaculado foi obtida com a utilização de uma câmara de Neubauer, sendo utilizado a diluição de 1 parte de sêmen para 200 partes de formol salino (1:200).

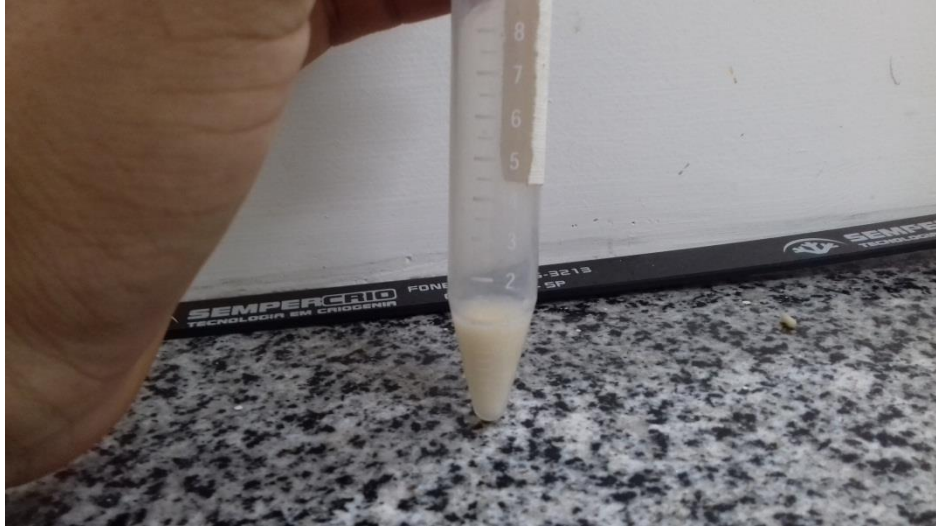


Figura 2 - Volume de sêmen in natura de 1,5 ml pós-coleta com o uso de vagina artificial

Fonte: Arquivo pessoal



Figura 3 - Gota de sêmen na lâmina para avaliação microscópica

Fonte: Arquivo pessoal

3.3 Diluição e Congelamento do sêmen

O sêmen foi diluído na proporção de uma parte de sêmen para uma parte de meio (1/2) utilizando-se diluidor Tris-Gema (3,605g de Tris; 2,024g de ácido cítrico; 1,488g de frutose; 100 ml de água bidestilada; 20% de gema de ovo, 5% de glicerol e pH 7,2), meio este que foi produzido no laboratório. O mesmo procedimento é realizado com um Diluidor X[®] de uso comercial, obedecendo á mesma proporção de sêmen/diluidor. Após a diluição foram envasados em palhetas de 0,25ml. A criopreservação foi dividida em dois grupos: método manual e método automatizado (TK 3000[®]). No método automatizado, a curva positiva teve duração de aproximadamente uma hora, até atingir a temperatura de 5°C (figura 5), assando

por igual período de estabilização a mesma temperatura. Logo após foram submetidas à curva negativa de 20° C/minuto até -120° C. Posteriormente, as palhetas foram imersas diretamente no nitrogênio líquido (-196° C) raqueadas e transferidas para o botijão criogênico. No método manual, as palhetas foram alocadas em uma estante artesanal própria para o congelamento e levadas para a geladeira sendo refrigeradas e estabilizadas a 5°C durante 20 minutos. Após esse período a estante com as palhetas foram colocadas em um isopor com nitrogênio líquido a uma distância de 4 cm acima deste, permanecendo 20 minutos no vapor (figura 4), atingindo cerca de -120°C, e em seguida submersas no nitrogênio líquido e estocadas no botijão criogênico a (-196°C) (RODELLO, 2006).

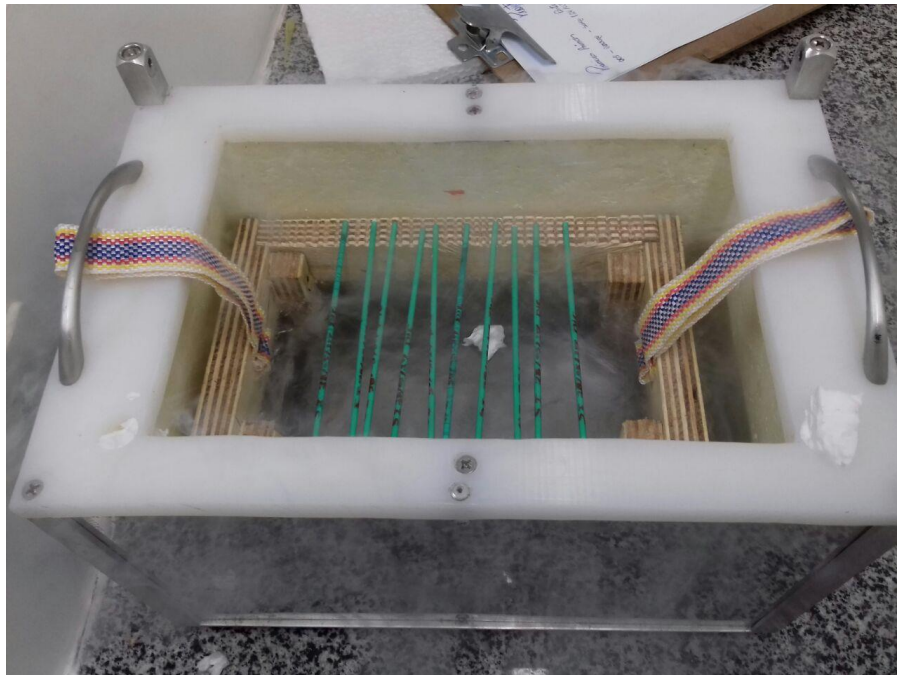


Figura 4 - Estante artesanal utilizada no experimento para congelamento do sêmen na geladeira/vapor de nitrogênio

Fonte: Arquivo Pessoal

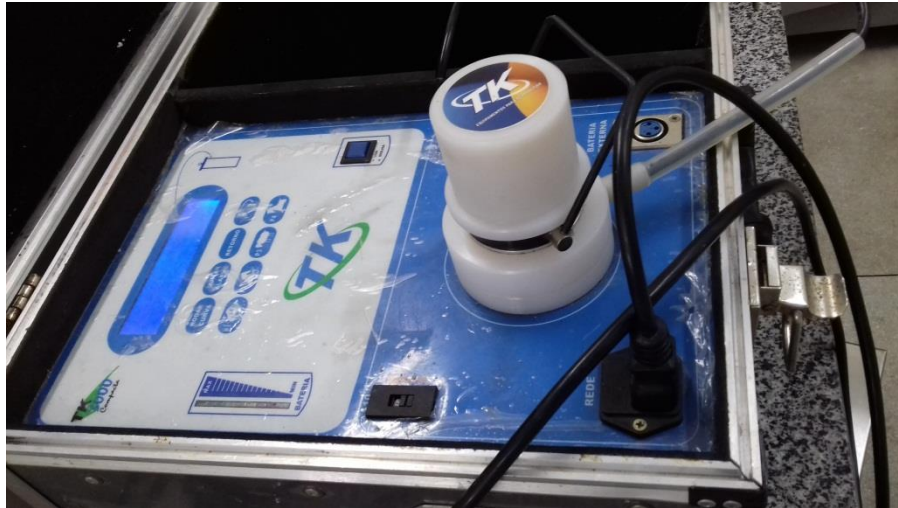


Figura 5 - Máquina TK 3000 utilizada no experimento para congelamento do sêmen

Fonte: Arquivo pessoal



Figura 6 - Palhetas com sêmen alocadas na máquina TK 3000 antes de iniciar o processo de congelamento

Fonte: Arquivo pessoal

3.4 Avaliação do sêmen após o descongelamento

Após o descongelamento do sêmen, a 37°C por 30 segundos (figura 7), as amostras foram novamente avaliadas quanto aos parâmetros de aspecto, motilidade progressiva e vigor de acordo com a metodologia descrita pelo Manual de Exame Andrológico do CBRA (1998) e posteriormente foram comparados os meios e métodos utilizados. A motilidade é expressa em porcentagem conforme a proporção total de espermatozoides móveis. Segundo MIES FILHO (1987), esta é uma das principais características que devem ser levadas em conta no exame de um sêmen, para avaliação de sua capacidade fecundante. O vigor é a característica que representa a força do movimento, que acaba influenciando a velocidade com que os

espermatozoides se movimentam. Esta é classificada em escala de 0 a 5, em que 0 é a ausência de movimento progressivo com o deslocamento lateral de cauda fraco e inexpressivo e 5 resulta em movimento vigoroso e veloz dos espermatozoides (figura 8), geralmente progressivo (CBRA, 1998), é importante que as análises sejam feitas pelo o mesmo avaliador antes e pós descongelamento, pois os valores são muito subjetivos.



Figura 7 - Descongelamento do sêmen em banho maria a 37°C durante 30 segundos

Fonte: Arquivo pessoal

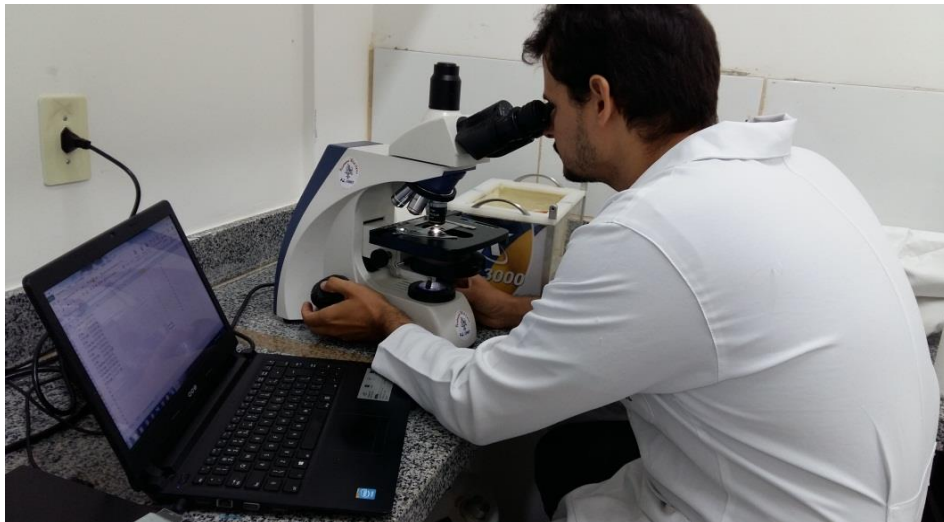


Figura 8 – Avaliação microscópica dos parâmetros de vigor e motilidade do sêmen pós-descongelamento

Fonte: Arquivo pessoal

3.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos á análise de estatísticas descritiva. Análise de variância foi utilizada para observar a existência de homogeneidade entre as variâncias e o Teste de Tukey ($P < 0,05$) para comparação múltipla entre os parâmetros avaliados foi submetido ainda ao teste da Anova e Qui-quadrado.

3.6 Princípios Éticos

O experimento foi submetido e aprovado n° 23000.001595.2017-72 pelo comitê de ética e pesquisas em animais, do IFPB campus Sousa (CEUA), respeitando todas as leis que regem procedimentos científicos em animais.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Parâmetros fisiológicos

Segundo SILANIKOVE, (2000) quando o animal está em homeostasia a taxa de normalidade respiratória se encontra entre 20 a 30 movimentos por minutos. A tabela 1 mostra que os valores obtidos para frequência respiratória estão dentro dos padrões citados pelo autor.

KOLB (1981) relata que batimentos cardíacos de carneiros podem variar de 70 a 110 batimentos por minutos, esses valores podem ser observados na tabela acima indicando que os animais encontravam-se dentro da normalidade esperada para a espécie em estudo.

A temperatura retal de ovinos pode variar de acordo com a temperatura ambiente, em condições de termoneutralidade a temperatura retal de ovinos varia entre 38,6 e 39,9°C (MARIA et al., 2007) esse valores também foram observados no grupo de ovinos do experimento.

CELIS et al. (1987) considera que o diâmetro testicular é um padrão confiável para selecionar reprodutores de boa qualidade, onde carneiros entre 1 a 2 anos e superior a 2 anos, possui uma média de circunferência escrotal entre $19,16 \pm 4,25$ a $25,93 \pm 1,49$, respectivamente, mostrando que o grupo experimental está dentro dos padrões esperados para a idade reprodutiva.

Tabela 1 - Médias e desvios-padrão ($\mu \pm s$) dos valores dos parâmetros FR (mpm), temperatura corpórea ($^{\circ}\text{C}$), frequência cardíaca (bpm) e diâmetro testicular (cm) de ovinos submetidos à avaliação da integridade de espermatozoides in natura e criopreservados utilizando dois meios e métodos para o congelamento do sêmen.

Parâmetros Fisiológicos/ Animal	Animal	Animal	Animal	μ e s
	1	2	3	
FR (mov/min)	28	28	24	27 \pm 2,3
FC (bpm/min)	76	114	100	97 \pm 19,2
TC $^{\circ}\text{C}$	38,7	39,2	39,5	39,1 \pm 0,4
Diâmetro Testicular (cm)	30	27	26,5	27,8 \pm 1,9

4.2 Comparativo entre meios e métodos de congelamento

Após a descongelação do sêmen, não foi observada diferença significativa na motilidade e no vigor espermático entre os quatro tratamentos (tabelas 2, 3). Esses resultados concordam com RODELLO (2006) que comparou o congelamento de sêmen em sistema automatizado (TK 3000) com sistema manual utilizando geladeira e vapor de nitrogênio e obteve médias de 50,3% e 47,9% respectivamente para motilidade pós-descongelamento, observando que não houveram diferenças significativas entre os sistemas analisados. Em relação ao meio utilizado SAMPER (1992), observou que o diluente tris-gema manteve maior motilidade em células espermáticas após o descongelamento, quando comparado com outros diluentes. Entretanto o presente trabalho não demonstrou diferenças significativas para motilidade e vigor entre o meio a base de tris-gema produzido no laboratório e o meio comercial “X”.

Em um processo de criopreservação a motilidade pós-descongelação varia de 40 a 60% (SALAMON & MAXWELL, 2000). Dessa forma, os resultados do presente estudo mostraram que a conduta de criopreservação de sêmen em todos os sistemas foram eficientes para a manutenção da motilidade pós-descongelação dos espermatozoides, demonstrando médias de 58,26%, 71,43%, 65,26% e 71,54% para os tratamentos manual comercial, manual laboratório, automatizado laboratório e automatizado comercial, respectivamente.

Tabela 2 - Resultado da Anova quanto ao número de palhetas, vigor e motilidade pós-descongelamento.

		Soma dos quadrados	df	Quadrado Médio	F	Sig.
Vigor	Entre grupos	165,793	139	1,193	.	.
	Dentro dos grupos	,000	0	.		
	Total	165,793	139			
Motilidade	Entre grupos	64568,571	139	464,522	.	.
	Dentro dos grupos	,000	0	.		
	Total	64568,571	139			

Tabela 3 - Resultados do qui-quadrado quanto ao número de palhetas, vigor e motilidade no pós-descongelamento.

	Número de palhetas	Vigor	Motilidade
Qui-quadrado	,000 ^a	67,714 ^b	63,914 ^c
df	139	3	12
Asymp. Sig.	1,000	,000	,000

a. 140 células (100,0%) têm frequências esperadas inferiores a 5. A frequência celular mínima esperada é de 1,0.

b. 0 células (, 0%) têm frequências esperadas inferiores a 5. A frequência celular mínima esperada é de 35,0.

c. 0 células (, 0%) têm frequências esperadas inferiores a 5. A frequência celular mínima esperada é de 10,8.

Os resultados apresentados nas tabelas 2 e 3 referentes á estatística ANOVA e Qui-quadrado não foram significantes. Isso se deve provavelmente ao pequeno número de animais analisados. Para ser corrigido sugere-se um aumento na quantidade de animais avaliados.

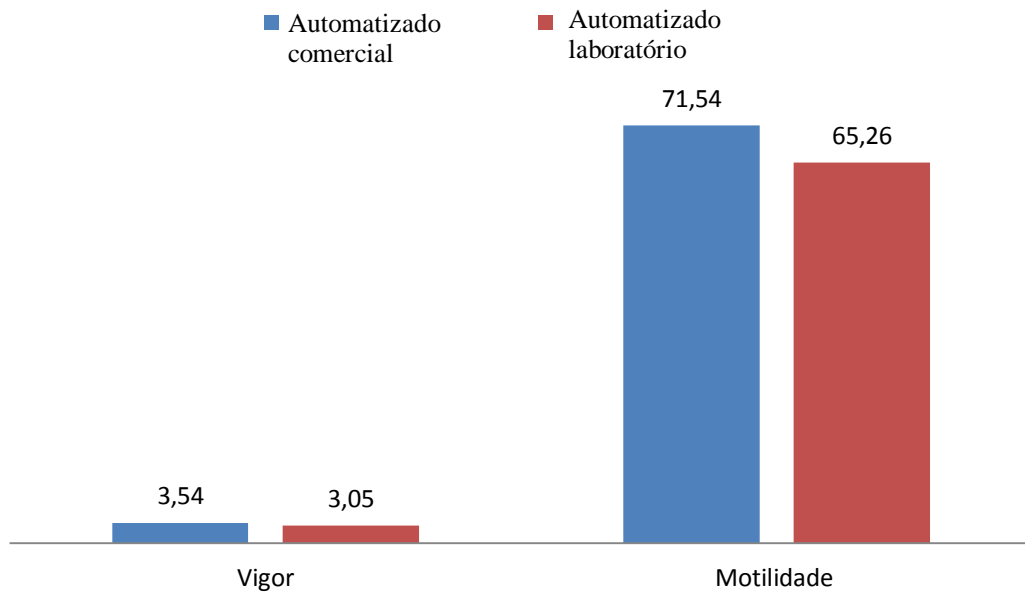


Gráfico 1 - Vigor e motilidade pós descongelamento com método automatizado

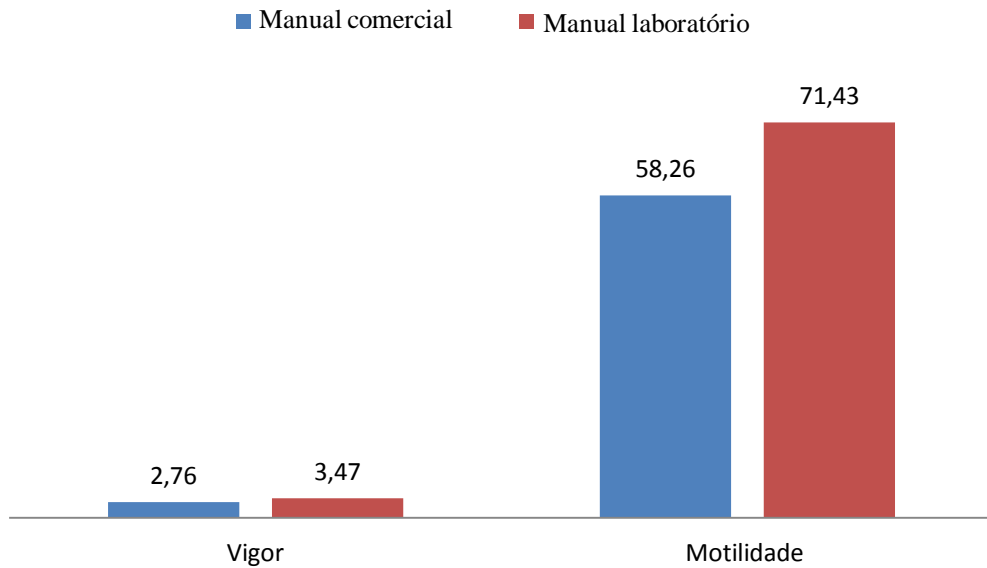


Gráfico 2 - Vigor e motilidade pós descongelamento método manual

Nos gráficos 1 e 2 pode ser observados os valores de vigor e motilidade para os tratamentos manual comercial, manual laboratório, automatizado comercial e automatizado laboratório na fase de pós-descongelamento. Os resultados obtidos para motilidade nos diferentes tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre si, atingindo o requisito mínimo de 30% de motilidade proposto pelo CBRA (1998) para aprovação de seu

uso. Os resultados demonstrados para vigor não diferiram significativamente entre os tratamentos aplicados, isso mostra que os procedimentos precedentes, são provavelmente viáveis para espécie.

5. CONCLUSÕES

Diante dos dados analisados podemos concluir que não houveram diferenças significativas para os meios produzidos no laboratório e o meio comercial, utilizando com métodos automatizado e o método manual para congelamento de sêmen de ovinos da raça Santa Inês, podendo ser usado os dois sem apresentar comprometimento quanto as parâmetros de motilidade e vigor no pós descongelamento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMIRAT, L.; ANTON, M.; TAINTURIER, D. *et al.* Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. **Reproduction**, v.129, p.535-543, 2005.
- BAILEY, J.L., BILODEAU, J.F., CORMIER, N. Semen, cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **J. Androl.**, v.21, p.1-6, 2000.
- BARBAS, J.; BAPTISTA, C.; MASCARENHAS, R.; HORTA, A. E. M. Efeito de duas doses de eCG em ovelhas Serra da Estrela submetidas a dupla inseminação artificial sobre a fertilidade, prolificidade e fecundidade. **Revista Portuguesa de Zootecnia**, v. 1, n. 2, p. 13-26, 2002.
- BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J. P.; MARQUANT-LE, B. *et al.* Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, v. 50, p. 699-706, 1998.
- BYRNE, G.P., LONERGAN, P., WADE, M., DUFFY, P., DONOVAN, A., HANRAHAN, J.P., BOLAND, M.P. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. **Animal Reproduction Science.**, v.62, p.265- 275, 2000.
- CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 1, p. 33-40, 2011.
- CASTELO, T. S.; FROTA T. R.; SILVA A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinária Brasilica**, v. 2, n. 3, p. 67-75, 2008.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA)**. Disponível em: <<http://www.cbra.org.br/portal/index.htm#>> Acesso em: 28 de setembro de 2018.
- COUTINHO, L. L.; ROSARIO, M. F.; JORGE, E. C. Biotecnologia animal. **Estudos avançados**.v. 24, n. 70, p. 123-147, 2010.
- GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 340 p.
- IBGE – **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Pecuária Municipal 2017**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/3939#resultado>>. Acesso em: 30 de setembro de 2018.
- INMET – **Instituto Nacional de Meteorologia. Climatologia 2017**. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home2/index>>. Acesso em: 30 de novembro de 2018.

KAMPSCHMIDT, R. F., MAYER, D. T., HERMAN, H. A. Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. **Journal of Dairy Science**, v. 36, p. 733-742, 1953.

KOLB, E., Regulação da temperatura corpórea. Fisiologia Veterinária. 4 ed. Editora Guanabara Koogan, 562 p., 1981.

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

LINS, J.G.G. Eficiência anti-helmíntica em ovinos no Alto Sertão da Paraíba. 2017. 43f. **Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária)** – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba.

LINS, J.G.G.; FERREIRA, T.L.A.; SEAL, D.C.M. et al. Caracterização das Práticas de Manejo Reprodutivo da Ovinocultura no Perímetro Irrigado das Várzeas de Sousa – Paraíba. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.40, n.4, p.317-319. 2016.

LINS, J.G.G; SALES, I.C.; SEAL, D.C.M. et al. Consolidação da ovinocultura em região do Semiárido paraibano. In: I SIMPÓSIO DE PESQUISA, INOVAÇÃO E PÓS-GRADUAÇÃO DO INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA PARAÍBA - IFPB. **João Pessoa, Paraíba. Anais...2015.** p.215.

MAIA, M. S.; MEDEIROS, I. M; LIMA, C. A. C. Características reprodutivas de carneiros no Nordeste do Brasil: Parâmetros Seminais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 1704-1711, 2011.

MANN, T. The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract. **1. ed. Londres, Methuen and CO Ltd.**, 1964. 493p.

MAXWELL, W. M. C.; SALOMON, S. Liquid Storage semen: A review. **Reproduction Fertility Development**, v.5, p. 613-638, 1993.

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

MIES FILHO A. **Reprodução dos animais**. 6.ed. Porto Alegre: Sulina, 1987.

MOLINIA, F.; EVANS, G.; MAXWELL, M. Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet freezing ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.42, p.849-858, 1994.

MOTTA, C.C. **TK Tecnologia em congelação Ltda**, Uberaba, Minas Gerais. Comunicação pessoal, 2006.

NEILD, D., CHAVES, G., FLORES, M., MORA, N., BECONI, M., AGÜERO, A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.51, p.721-727, 1999.

ORTEGA A. M.; IZQUIERDO, A. C.; GOMEZ, J. J. H.; OLIVARES – CORICHI, I. M. ; TORRES, V. M. M.; MENDEZ, J. J. V.; Peroxidación lipídica y antioxidante normais em lapreservación de sêmen. **Una revisión.Interciencia**, v. 28, n. 12, p. 699-704, 2003.

PACE, M. M.; GRAHAM, E. F. Components of egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. **Journal of Animal Science**, v.39, p.1144-1 149, 1974.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.

PHILLIPS, P. H. Preservation of bull semen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 130, p.415, 1939.

PHILLIPS, P. H.; LARDY, H. A. A yolkbuffer pabulum for preservation of bull sperm. **Journal of Dairy Science**, v.2, p.399– 404, 1940.

PHILLIPS, P. H.; LARDY, H. A. A yolkbuffer pabulum for preservation of bull sperm. **Journal of Dairy Science**, v.2, p.399– 404, 1940.

POLGE, C. Functional survival of fowl spermatozoa after freezing at -79°C. **Nature**, v. 9, p. 949-950, 1951.

POLGE, C.; ROWSON, L. E. A. Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at -79°C. **Nature**, v. 12, p. 626-627, 1952.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v.164, p.666, 1949.

RODELLO, L. Validação de sistema automatizado de refrigeração e congelação de sêmen ovino. 2006. 70 f. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

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

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Review. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 37, p. 185-249, 1995.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p. 77-111, 2000.

SAMPER, J.C. Evaluation of cryopreserved semen: an alternative assay. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.88, p.59-65, 1992. Suppl.

SILANIKOVE, N. Effect sofheat stress on thewelfareo fextensively managed domestic ruminants. **Livestock Production Science**. v67, p.1–18. 2000.

SILVA, S. V.; SOARES, A. T.; BATISTA, A.M; ALMEIDA, F. C.; GUERRA, M. M. P. Interferência da condição climática na integridade de espermatozoides ovinos submetidos a criopreservação. **Arquivo Brasileira Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 63, n. 6, p. 1309-1314, 2011.

SIMPLÍCIO, A. A.; Estratégias de manejo reprodutivo como ferramenta para prolongar o período de oferta de carnes caprina e ovina no Brasil. **Tecnologia Científica Agropecuária**, v. 2, n. 3, p. 29-39, 2008.

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

WATSON, P. F.; MARTIN, C. A. The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5°C. **Australian Journal of Biological Sciences** 28, 145–152, 1975.

APÊNDICE A – Lista de Tabelas

Observa-se nas tabelas 1, 3, 5 e 7 o número de palhetas avaliadas para cada animal, e os valores de percentual válido para os métodos manual com o meio comercial, manual laboratório, automatizado laboratório, automatizado comercial, respectivamente. As amostras passaram por análise estatística para garantir que todas fossem avaliadas mantendo o mesmo padrão dentro de cada fase e demonstrando a padronização do experimento. Nas tabelas 2, 4, 6, 8 podem-se observar as médias e desvio padrão para os valores de vigor e motilidade pós-descongelamento correspondente ao método manual com o meio comercial e o meio produzido no laboratório e o método automatizado com o meio produzido no laboratório e meio comercial, respectivamente.

Tabela 1 - Número de palhetas avaliadas para cada animal utilizando o método manual com meio comercial.

	Nº de palhetas avaliadas	Percentual avaliado	Percentual válido
Animal 1	14	30,5	30,5
Animal 2	14	30,4	30,4
Animal 3	18	39,1	39,1
Total	46	100%	100%

Tabela 2 - Valores obtidos para vigor e motilidade pós-descongelamento com método da manual e meio comercial aplicado à média e desvio padrão ao grupo de animais.

	Vigor pós-descongelamento	Motilidade pós descongelamento
Média	2,76	58,26
Desvio padrão	1,177	24,134

Tabela 3 - Número de palhetas avaliadas para cada animal utilizando o método manual com produzido no laboratório.

	Nº de palhetas avaliadas	Percentual avaliado	Percentual valido
Animal 1	19	38,8	38,8
Animal 2	17	34,7	34,7
Animal 3	13	26,5	26,5
Total	49	100%	100%

Tabela 4 - Valores obtidos para vigor e motilidade pós-descongelamento com método manual e meio laboratório aplicados à média e desvio padrão ao grupo de animais.

	Vigor pós-descongelamento	Motilidade pós descongelamento
Média	3,47	71,43
Desvio padrão	0,892	16,894

Tabela 5 - Número de palhetas avaliadas para cada animal utilizando o método automatizado em meio produzido no laboratório.

	Nº de palhetas avaliadas	Percentual avaliado	Percentual valido
Animal 1	7	35,0	35,0
Animal 2	7	35,0	35,0
Animal 3	6	30,0	30,0
Total	20	100%	100%

Tabela 6 - Valores obtidos para vigor e motilidade pós-descongelamento com método automatizado em meio produzido em laboratório aplicados à média e desvio padrão ao grupo de animais.

	Vigor pós-descongelamento	Motilidade pós-descongelamento
Média	3,05	65,26
Desvio padrão	1,433	30,252

Tabela 7 - Número de palhetas avaliadas para cada animal utilizando o método automatizado em meio comercial.

	Nº de palhetas avaliadas	Percentual avaliado	Percentual valido
Animal 1	9	34,6	34,6
Animal 2	12	46,2	46,2
Animal 3	5	19,2	19,2
Total	26	100%	100%

Tabela 8 - Valores obtidos para vigor e motilidade pós-descongelamento com método automatizado em meio produzido no laboratório aplicados à média e desvio padrão ao grupo de animais.

	Vigor pós-descongelamento	Motilidade pós-descongelamento
Média	3,54	71,54
Desvio padrão	0,706	11,293

APÊNDICE B – Lista de Gráficos

Nos gráficos 1. e 2 são observados os valores para vigor e motilidade obtidos com o método manual com meio comercial. Os gráficos 3 e 4 demonstra o vigor e motilidade correspondente ao método manual com o meio produzido no laboratório. O gráfico 5 demonstra o vigor e o 6 a motilidade do método automatizado com o meio do laboratório e nos gráficos 7 e 8 apresentam os valores de vigor e motilidade respectivamente do método automatizado com meio comercial.

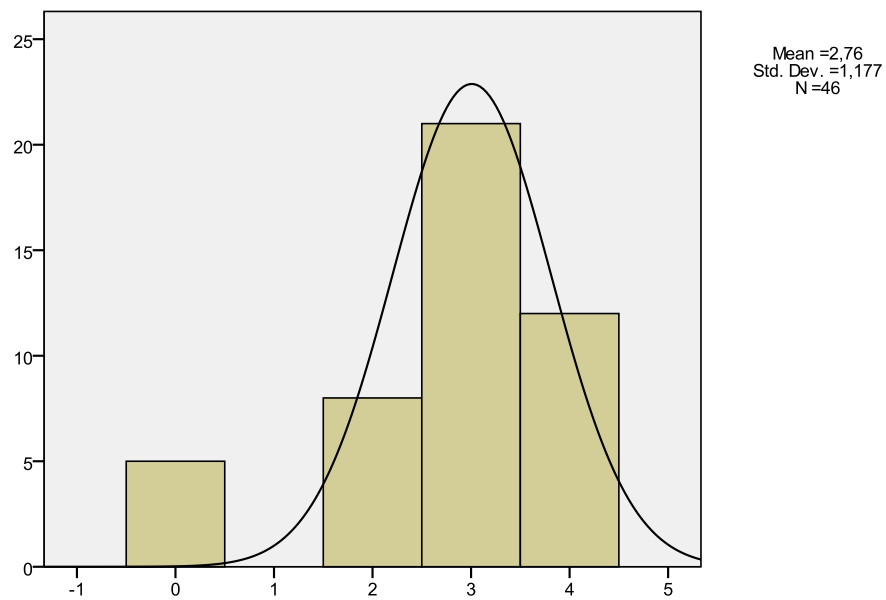


Gráfico 1 - Dados correspondentes ao vigor pós-descongelamento do método manual e meio comercial

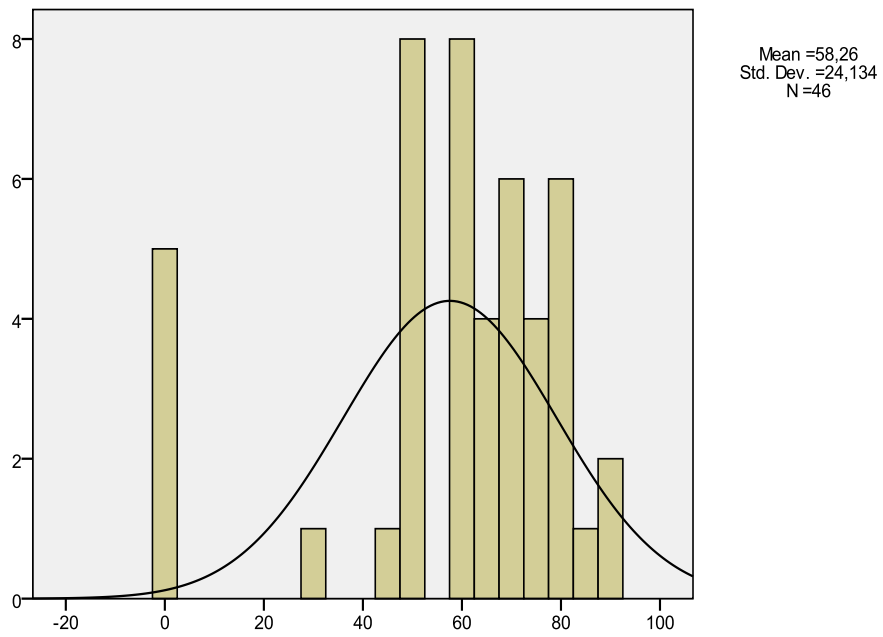


Gráfico 2 - Dados correspondentes a motilidade pós-descongelamento do método manual sendo usado o meio comercial

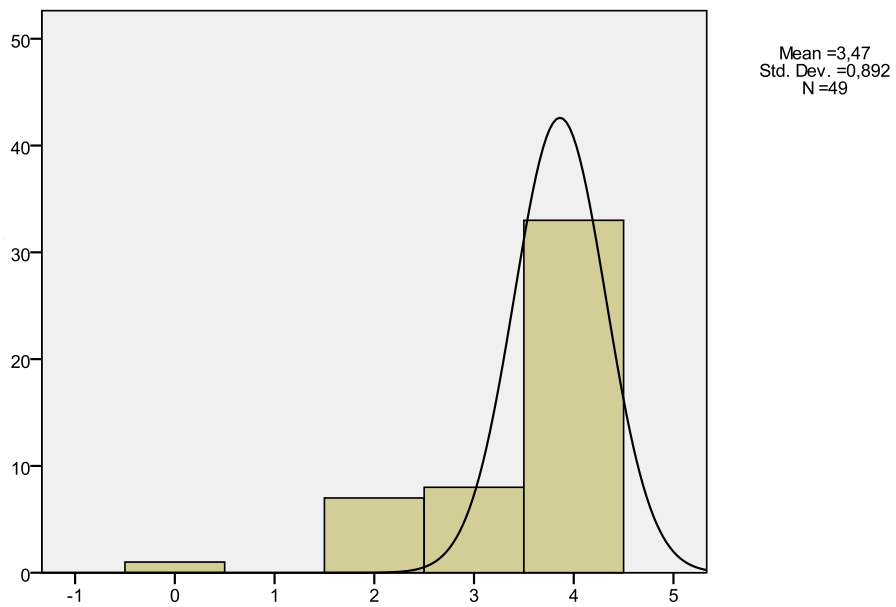


Gráfico 3 - Dados correspondentes ao vigor pós-descongelamento do método manual sendo usado o meio produzido no laboratório.

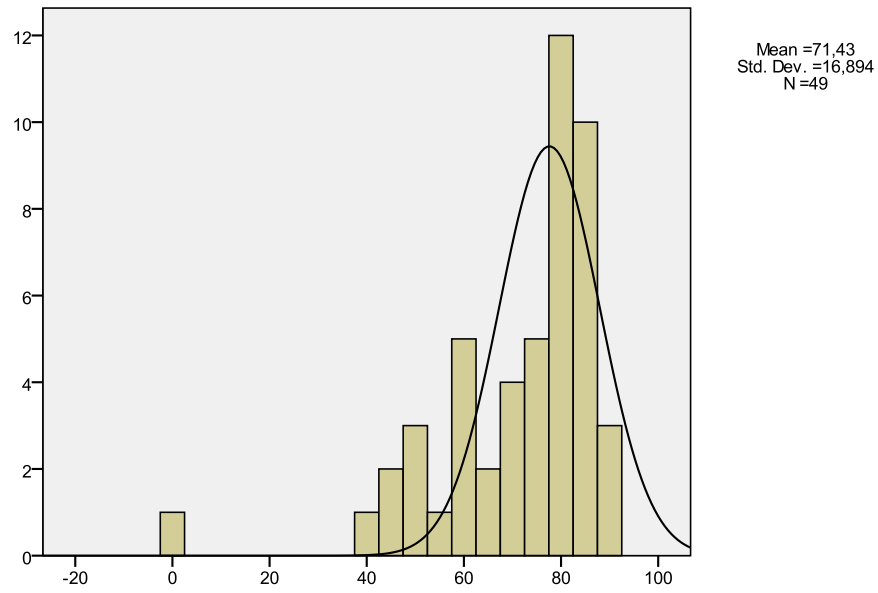


Gráfico 4 - Dados correspondentes ao motilidade pós-descongelamento do método manual sendo usado o meio produzido no laboratório

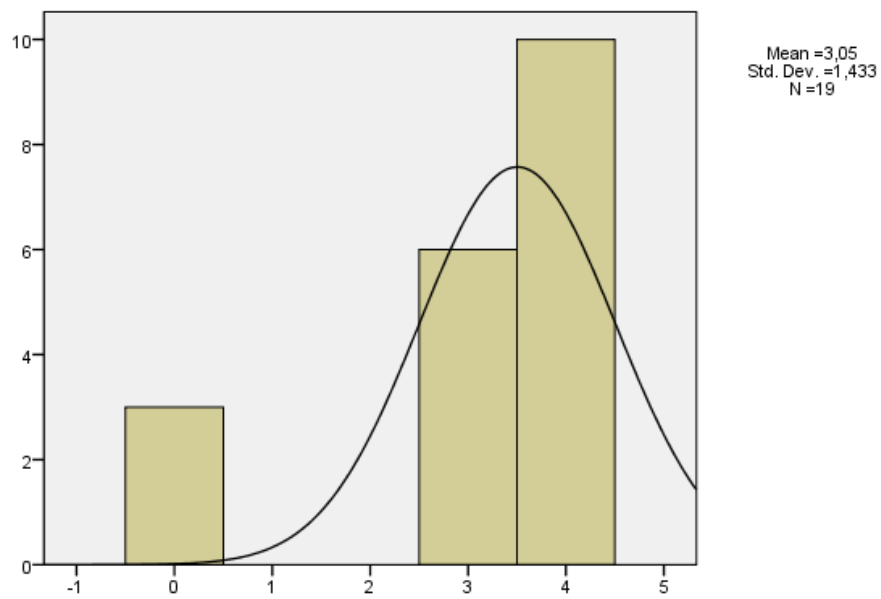


Gráfico 5 - Dados correspondentes ao vigor pós-descongelamento do método automatizado sendo usado o meio produzido no laboratório

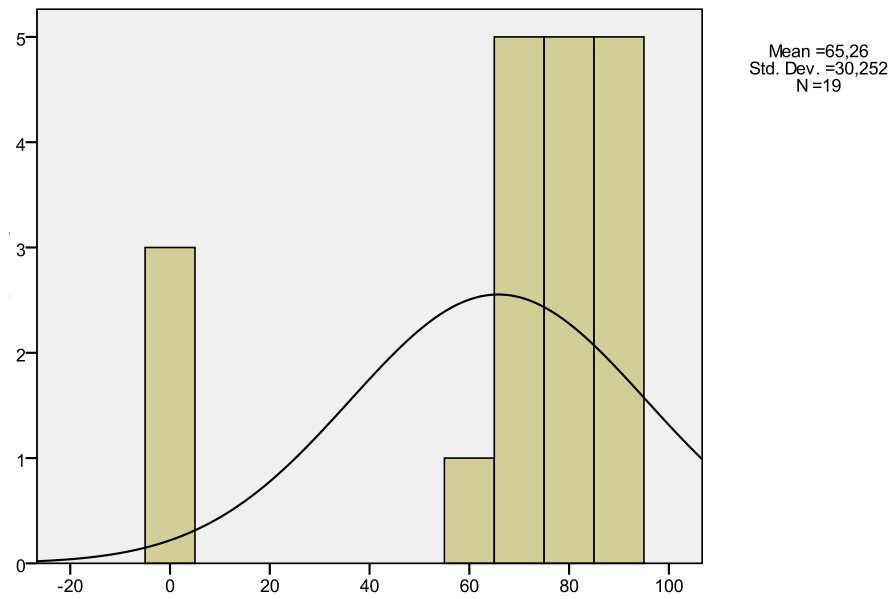


Gráfico 6 - Dados correspondentes ao motilidade pós-descongelamento do método automatizado sendo usado o meio produzido no laboratório

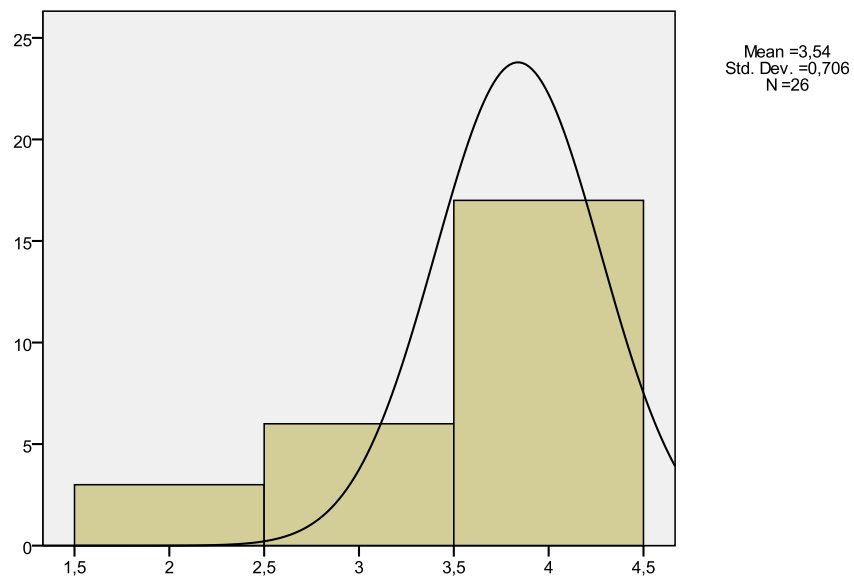


Gráfico 7 - Dados correspondentes ao vigor pós-descongelamento do método automatizado sendo usado o meio comercial.

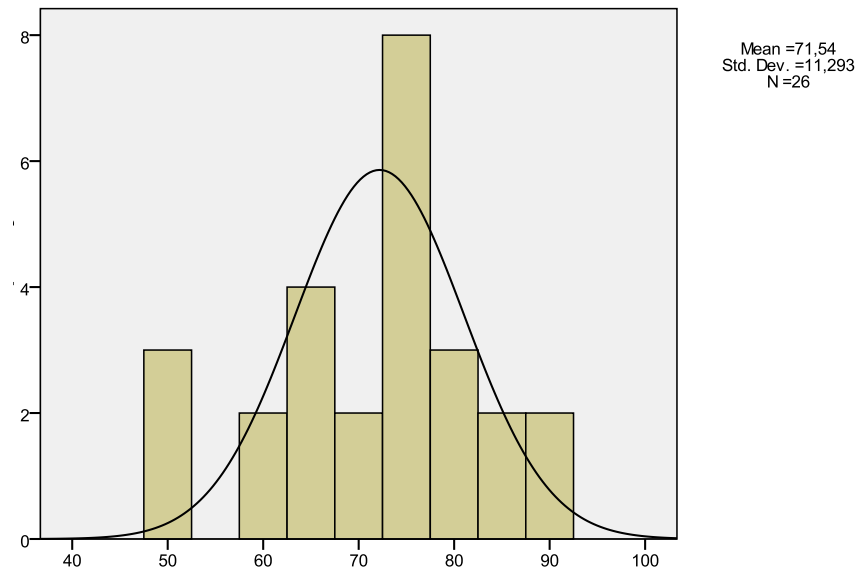


Gráfico 8 - Dados correspondentes ao motilidade pós-descongelamento do método automatizado sendo usado o meio comercial.