

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA
CURSO DE BACHARELADO EM ZOOTECNIA

MONOGRAFIA

Comparação de diferentes diluidores para o resfriamento de sêmen de carneiros
deslanados criados no Sertão pernambucano

Nathaly Cristina de Menezes Sá Souza

2018



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA
CURSO DE BACHARELADO EM ZOOTECNIA

MONOGRAFIA

Comparação de diferentes diluidores para o resfriamento de sêmen de carneiros
deslanados criados no Sertão pernambucano

(Nathaly Cristina de Menezes Sá Souza)
Graduanda

Dr. Jorge André Matias Martins
(Doutor em Ciência Animal pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de
Minas Gerais)

Serra Talhada– PE
Agosto de 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca da UAST, Serra Talhada - PE, Brasil.

S729c Souza, Nathaly Cristina de Menezes Sá

Comparação de diferentes diluidores para o resfriamento de sêmen de carneiros deslanados criados no sertão pernambucano / Nathaly Cristina de Menezes Sá Souza. – Serra Talhada, 2018.
39 f.: il.

Orientador: Jorge André Matias Martins

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharel em Zootecnia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Unidade Acadêmica de Serra Talhada, 2018.

Inclui referências.

1. Ovinos - Sêmen. 2. Ovinos – Inseminação artificial. 3. Reprodução. I. Martins, Jorge André Matias orient. II. Título.

CDD 636



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA
CURSO DE BACHARELADO EM ZOOTECNIA

NATHALY CRISTINA DE MENEZES SÁ SOUZA
Graduanda

Monografia submetida ao Curso de Zootecnia como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Zootecnia.

Aprovado em 17/08/2018

EXAMINADORES

Dr. Jorge André Matias Martins

Dr^a. Ednéia de Lucena Vieira

Dr^a. Ana Paula Gomes Pinto

Dedico essa conquista a Deus que me permitiu ter força e coragem para nunca desistir dos meus objetivos. A minha família que sempre esteve ao meu lado me apoiando, minha avó Eulina (Dóia), aos meus pais Fátima Cristina e Geraldo, aos meus irmãos Nadyne e Jonathan, aos meus tios Luiz Carlos, Antônio e Cristiane e aos meus primos Caio, Camila e Caline.

Dedico ainda, ao meu avô Luiz Quinca, Tia Rosinha, Joãozinho, Tia Cláudia, Udinha e Tio Zuca (in memoriam). Saudades eternas!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me ofertado o dom da vida e a sabedoria para seguir os meus caminhos.

Aos meus pais, Cristina e Geraldo, por serem meus exemplos de amor e honestidade, pelos esforços que fizeram para que eu conseguisse realizar meus objetivos, pela força e apoio em todas as minhas decisões. Amo vocês.

A minha querida e amada avó Eulina (Dóia), por ser a fortaleza e suporte da nossa família, que me deu todo o seu amor e carinho, me fez ter fé para seguir sempre em frente, serei grata por toda a vida, minha guerreira.

Aos meus irmãos, Nadyne e Jonathan, meus primos Caio, Camila e Caline, por sempre estarem comigo, pelo apoio e companheirismo. Vocês são meus presentes.

Aos meus tios, Luiz Carlos, Cristiane e Antônio, por todo o apoio e dedicação durante minha vida.

Ao meu orientador, Dr. Jorge André Matias Martins, por toda a paciência, ensinamentos, força e dedicação. Por ter acreditado em mim, eu serei sempre grata.

Aos meus professores e coordenadores do curso de Zootecnia, que ao longo desses anos me ensinaram bem mais do que matérias, me ensinaram a sempre me dedicar e ter foco.

Aos meus colegas e amigos de curso, Álvaro, Bruno, Caline, Ethiana, João Fernandes, José Weliton, Leandro, Lucinéa e Méry, que estão comigo nessa jornada, agradeço e desejo sorte.

Aos amigos que a vida me deu, Anailza, Aurélia, Brena, Caline, Joyse, Millena, Rafaella e Tamires, por todos os momentos de alegrias e pela força nas horas difíceis.

“Importante não é ver o que ninguém nunca viu, mas sim, pensar o que ninguém nunca pensou sobre algo que todo mundo vê. ”

(Arthur Schopenhauer)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. Panorama da ovinocultura no Brasil e no mundo.....	14
2.2. Raças de ovinos adaptados ao semiárido brasileiro	14
2.3. Seleção de reprodutores visando aumento da eficiência reprodutiva ...	15
2.4. Inseminação artificial de ovinos.....	16
2.4.1. Particularidades na inseminação artificial em ovinos.....	17
2.5. Preservação de sêmen ovino	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Área de estudo e animais experimentais	21
3.2. Colheita e Análise do sêmen	22
3.3. Diluidores	22
3.4. Avaliação da qualidade seminal pós-reaquecimento	23
3.5. Análises Estatísticas	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5. CONCLUSÕES.....	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Composição dos meios diluentes Tris-Gema, Solução de Sacarose, Leite desnatado (Meio Kenney) e Soro fisiológico.....	22
TABELA 2 - Parâmetros seminais dos reprodutores ovinos da estação de agricultura irrigada de Parnamirim (EAIP/UFRPE).....	25
TABELA 3 - Características de sêmen fresco de carneiros, segundo CBRA (2013).....	25
TABELA 4 - Características morfométricas dos reprodutores ovinos da estação de agricultura irrigada de Parnamirim (EAIP/UFRPE)	26
TABELA 5 - Defeitos espermáticos maiores e menores mais frequentes em sêmen de reprodutores ovinos da estação de agricultura irrigada de Parnamirim (EAIP/UFRPE), diluído e resfriado com Tris-gema de ovo	30

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Motilidade espermática do sêmen de ovinos da raça Santa Inês e Dorper resfriado com diferentes tipos de diluentes.....	27
FIGURA 2 – Vigor espermático do sêmen de ovinos da raça Santa Inês e Dorper resfriado com diferentes tipos de diluentes.....	28
FIGURA 3 - Morfologia espermática do sêmen de ovinos da raça Santa Inês e Dorper resfriado com diferentes tipos de diluentes.....	29

RESUMO

Dentre as biotécnicas aplicadas à reprodução de ovinos, a inseminação artificial (IA) promove maior impacto na eficiência produtiva, por sua aplicabilidade e praticidade, além de acelerar o ganho genético no rebanho e controlar a sanidade mais eficientemente. O uso de sêmen resfriado pode se tornar viável ao produtor já que o material utilizado e os procedimentos são mais acessíveis, favorecendo o transporte de material genético entre propriedades. Para isso, meios diluidores de sêmen têm como finalidade melhorar a conservação dos espermatozoides, estendendo sua viabilidade fora do trato reprodutor. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a viabilidade técnica de 4 meios diluidores para o resfriamento de sêmen de ovinos criados no Sertão pernambucano. Nove carneiros foram submetidos a colheita e análise de sêmen, dos quais apenas 6 apresentaram características apropriadas para o resfriamento do sêmen. Os ejaculados dos animais foram divididos em frações iguais e diluídos com soro fisiológico, sacarose, leite desnatado e tris-gema, obtendo, para cada diluidor, 30 milhões de espermatozoide/dose. As amostras diluídas foram refrigeradas em geladeira a 5 °C, por 4 horas, quando então foram acondicionadas em caixas térmicas contendo gelo para o transporte para o laboratório de química da UAST. Todas as amostras foram avaliadas quanto à motilidade, ao vigor e à morfologia espermática após 24, 48 e 72 horas após o resfriamento. O diluidor Tris-gema foi o único capaz de manter os espermatozoides móveis por no mínimo 72 horas, e com motilidade e vigor apropriados para a inseminação por até 48 horas. Além disso, o referido diluidor não alterou a morfologia espermática, apresentando boa capacidade de preservação seminal. Conclui-se que o diluidor tris-gema de ovo é viável tecnicamente para o uso e difusão da inseminação artificial em ovinos criados no Sertão pernambucano.

Palavras-chave: análise de sêmen, eficiência reprodutiva, inseminação artificial

ABSTRACT

Among the biotechniques applied to sheep reproduction, artificial insemination (AI) promotes greater impact on productive efficiency, due to its applicability and practicality, besides accelerating the genetic gain in the herd and controlling sanity more efficiently. The use of chilled semen may become viable to the producer since the material used and the procedures are more accessible, making possible the transport of genetic material between properties. For this purpose, semen extenders aim to improve the conservation of spermatozoa by making longer their viability outside the reproductive tract. Thus, the objective of the present study was to evaluate the technical viability of 4 extenders for the cooling of semen of rams raised in the backwoods of Pernambuco. Nine rams were subjected to semen collection and analysis, of which only 6 presented good semen traits for cooling. Ejaculates were divided into equal fractions and diluted with physiological saline, sucrose, skim milk and tris-egg yolk media, obtaining 30 million sperm/dose for each extender. The diluted samples were chilled in a refrigerator at 5 °C for 4 hours when they were then packed in ice-containing thermal boxes for transportation to the UAST chemistry laboratory. All samples were evaluated for motility, vigor and sperm morphology after 24, 48 and 72 hours of cooling. The tris- egg yolk extender was the only one able to keep sperm motile for at least 72 hours, but with motility and vigor appropriate for insemination for up to 48 hours. Moreover, such extender did not alter the sperm morphology, presenting good sperm preservation. One can conclude that the tris-egg yolk extender is technically feasible for the use and diffusion of artificial insemination in sheep raised in the backlands of Pernambuco.

Keywords: artificial insemination, reproductive efficiency, semen analysis.

1. INTRODUÇÃO

O sucesso da produção animal é dependente da eficiência com que administramos os fatores que podem prejudicar a capacidade reprodutiva. Melhorando taxas de natalidade e diminuindo índices de mortalidade, podemos elevar a produção e os rendimentos obtidos por meio da comercialização dos produtos com qualidade como carne, leite, pele e lã. Para isso, é necessário que os animais nasçam saudáveis e com possibilidades de bom rendimento. A prática do manejo reprodutivo se torna indispensável em qualquer produção, pois envolve diversas áreas da criação, desde alimentação até a seleção de matrizes e reprodutores.

Os animais no Semiárido do Nordeste brasileiro são normalmente criados de forma extensiva fazendo com que os cuidados básicos com a sanidade e reprodução sejam mínimos, dificultando a possibilidade de melhorias no rebanho. Podemos observar os danos causados pela má organização através de partos desuniformes, bem como das elevadas taxas de mortalidade que trazem prejuízos ao criador.

Visando melhorar os processos de produção animal, dispõe-se da utilização de tecnologias voltadas para a reprodução animal que contribuem de maneira positiva para a eficiência reprodutiva e produtiva de um rebanho. Dentre elas, podemos citar a Inseminação Artificial (IA) que tem como objetivo o melhoramento genético animal com a utilização de sêmen fresco, refrigerado ou congelado. A inseminação artificial é considerada a biotecnologia que promove maior impacto na eficiência produtiva, apresentando a maior aplicabilidade e praticidade de uso, bem como suas vantagens como o rápido ganho genético no rebanho e controle sanitário mais eficiente.

O uso do sêmen congelado de ovinos traz diversas vantagens como a facilidade de transporte do material genético entre propriedades, tendo melhor aproveitamento do reprodutor como forma de introduzir qualidade genética no rebanho, além da maior segurança em relação a sanidade dos animais, diminuindo a possibilidade de transmissão de doenças, como também o uso prolongado do sêmen coletado. Entretanto, os resultados da inseminação artificial são variáveis, dependendo da forma como o sêmen é armazenado, bem como do sistema de organização da propriedade e o estado sanitário e nutricional dos animais (principalmente das fêmeas). Outro ponto relevante para o estabelecimento da inseminação artificial, especialmente com o uso de sêmen criopreservados, é o custo de aquisição de material e implementos indispensáveis em

todo o processo, como por exemplo botijões de nitrogênio líquido, o que inibe sua utilização pelos pequenos produtores.

Porém a técnica de refrigeração de sêmen pode se tornar viável ao produtor já que o material utilizado e os procedimentos são mais acessíveis, viabilizando o transporte de material genético entre propriedades, embora a sua viabilidade seja mais curta, demandando manejo reprodutivo estratégico para a implementação da inseminação artificial como forma de acelerar ganhos pelo pequeno produtor. Dessa forma, independente da forma de utilização do sêmen preservado, é necessária a organização do sistema de criação dos pequenos produtores visando bons resultados.

Para melhorar a eficiência no uso de sêmen durante a inseminação artificial são utilizados meios diluidores que tem como finalidade melhorar a conservação dos espermatozoides, estendendo sua viabilidade fora do trato reprodutor e conferindo proteção durante o processo de criopreservação.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a viabilidade técnica de 4 meios diluidores para o resfriamento de sêmen de ovinos criados no Sertão pernambucano.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Panorama da ovinocultura no Brasil e no mundo

A primeira espécie a ser domesticada pelo homem foi a ovina, tendo uma variedade de alternativas que podem propiciar mais fontes de renda aos criadores por ser capaz de se obter diversos produtos como lã, pele, carne e leite (FERNANDES, 1989). Os ovinos são encontrados em praticamente todos os continentes, sua ampla distribuição deve-se principalmente a seu poder de adaptação a diferentes climas, relevos e vegetações. A criação está destinada tanto à exploração econômica como à subsistência das famílias de zonas rurais (VIANA, 2008). No Nordeste essa criação é de grande representatividade, sendo fonte de renda e auxílio para a fixação e permanência do homem ao campo.

A criação de ovinos no Nordeste brasileiro vem crescendo significativamente ao longo dos anos, sendo esses animais explorados economicamente por meio da introdução de raças mais especializadas, melhoramento genético e por técnicas de manejo que elevem a sua produtividade (VIANA, 2008). O efetivo ovino nacional em 2016 foi de 18,43 milhões de cabeças, representando um aumento de 0,1% em relação a 2015; aproximadamente 63,6% se encontram na região Nordeste, sendo a cidade de Casa Nova (BA) possui 408.546 cabeças (2,2% do efetivo nacional; IBGE, 2017). Segundo Gomes (2016) o Sertão do Estado de Pernambuco apresenta aproximadamente 1.109.347 cabeças de ovinos.

Tendo em vista o grande potencial para a economia devido aos seus produtos, são necessárias alternativas que visem melhorar e qualificar a produtividade desses animais, aumentando a lucratividade dessa produção (NEVES, 1990).

As boas condições sanitárias e alimentares são importantes para um bom desempenho na produção, além do bem-estar animal, porém o requisito principal para uma boa qualidade do rebanho é a sua eficiência em relação a reprodução (FONSECA, 2006).

2.2. Raças de ovinos adaptados ao semiárido brasileiro

De acordo com Sousa e Leite (2000) o desempenho reprodutivo considerado satisfatório da raça Dorper, citando a poliestria contínua, fertilidade, precocidade e

prolificidade, encontra-se semelhante ao da raça Santa Inês. Conforme Elias et al. (1985) os ovinos dessa raça não sofrem alterações endócrinas e reprodutivas referente ao fotoperiodismo, devido ao seu mecanismo de captação de luz (eixo hipotálamo- hipófise) não ser influenciado pelas variações de luminosidade do dia.

Os carneiros da raça Dorper podem chegar aos 160 dias de idade com $16,6 \times 10^6$ células sexuais, mostrando que desde jovens apresentam capacidade de fertilização (CLOETE et al., 2000).

A raça Santa Inês se originou por meio de cruzamentos realizados com as raças Morada Nova, Bergamácia e Crioula, tendo sua ausência de lã como característica marcante (FERNANDES JÚNIOR, 2010). São animais que apresentam boas características, como sua dupla aptidão para carne e pele, grande porte, sendo que as fêmeas podem atingir até 60 kg e os machos 120 kg; suas pelagens podem variar entre o preto, vermelho e malhado (FERNANDES JÚNIOR, 2010).

Os ovinos da raça Santa Inês vêm apresentando elevada importância na ovinocultura atual e estão sendo utilizadas como raça pura ou para cruzamentos industriais (PINHEIRO, 2004). De acordo com Corradello (1988) e Silva (1990) essa raça vem apresentando aumento e capacidade de produzir carcaças de boa qualidade, resultando em grande potencial produtivo.

2.3. Seleção de reprodutores visando aumento da eficiência reprodutiva

Os machos têm a capacidade de disseminar mais rapidamente os genes de interesse zootécnico em uma criação, sendo responsáveis por metade da qualidade dos descendentes; assim, a escolha de machos com qualidade superior é importante em uma criação para o melhoramento genético reprodutiva (PACHECO; QUIRINO, 2010).

De acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013) o exame andrológico é recurso capaz de avaliar a qualidade reprodutiva do macho por meio da observação de sua saúde geral, genética e do seu sistema genital, podendo determinar de forma rápida se o animal possui capacidade de se reproduzir naquele momento. Juntamente com a avaliação do sêmen que poderá verificar a qualidade seminal daquele animal, avaliando a motilidade e o vigor espermático naquele momento e mostrar se o animal está apto para a reprodução (GRANADOS et al., 2006).

A escolha de machos para a utilização como reprodutores é considerado um instrumento de grande importância, já que os carneiros com um alto desempenho sexual

provavelmente irão servir um número maior de ovelhas em curto tempo, fazendo com que ocorra o aumento da pressão de seleção e também a dispersão do seu material genético (PACHECO; QUIRINO, 2010). Ainda conforme os mesmos autores, para a escolha de reprodutores algumas características principais são avaliadas como a qualidade seminal, características testiculares e pelo comportamento reprodutivo dos animais. De acordo com Azevêdo et al. (2008) são realizados testes para a avaliação do comportamento reprodutivo que permitem a identificação de ovinos que sejam capazes de reconhecer fêmeas no cio, que manifestem desejo sexual e que tenham habilidade para cobertura, e que são consideradas características importantes, principalmente em sistemas de monta natural.

Vários fatores podem influenciar o comportamento reprodutivo dos ovinos, como por exemplo, raça, idade (BELIBASAKI; KOUIMTZIS, 2000; SNOWDER et al., 2002) e estacionalidade (ROSA et al., 2000), como também os fatores hormonais e sociais (DICKSON; SANFORD, 2005; STELLFLUG; LEWIS, 2007).

Conforme Bench et al. (2001) o contato antecipado dos machos com as fêmeas pode aprimora-los para a execução da cópula e para tornar mais desinibidos animais que são inexperientes. A frequência e duração desses comportamentos irão depender dos reprodutores e suas experiências sexuais adquiridas, sendo então utilizados como critério para a avaliação, classificação e seleção de machos para reprodução (STELLFLUG; LEWIS, 2007).

2.4. Inseminação artificial de ovinos

O uso de tecnologias para o melhoramento genético auxilia na tomada de decisões que irão favorecer no momento de selecionar animais que possam contribuir significativamente para o rebanho, possibilitando a obtenção daqueles com características desejadas segundo os objetivos da criação e que tenham a capacidade de transmiti-las aos seus descendentes (ANDRIOLI, 2002).

Existem diversas biotécnicas reprodutivas que auxiliam no melhoramento da reprodução. Entre elas está a inseminação artificial que tem como objetivo a disseminação de material genético, tendo inúmeras vantagens ao ser realizada, como o controle de doenças dentro do rebanho, o uso de sêmen sem que ocorra o desgaste físico do reprodutor, além da vantagem de aumentar o número de crias sem a presença do macho, evitando possíveis custos com transporte animal, possibilitando também o uso

de sêmen de reprodutores já mortos (CUNHA, 2008). Conforme Bicudo et al. (2003) a inseminação artificial é considerada, dentre as biotécnicas de reprodução, a que mais proporciona resultados dentro dos programas de melhoramento genético animal.

Desde os primeiros estudos sobre a utilização do sêmen congelado, melhorias nos setores reprodutivos e avanços nessa área tem tomado grandes dimensões, mas o objetivo maior é utilização desses recursos por parte dos produtores, popularizando seu uso e trazendo vantagens ao rebanho (MORAES, 2003). No entanto, ainda são escassos os estudos sobre quais os impactos que as inseminações artificiais em pequenos ruminantes podem causar na economia a (MACHADO et al., 1997).

Faz-se, então, necessária uma avaliação dos custos e dos benefícios envolvidos em cada técnica, desde a aquisição de equipamentos, pessoas envolvidas na gestão, compras de medicamentos e hormônios, além de mão-de-obra especializada (SILVA et al., 2007).

Quando ocorre um planejamento afim de se executar o uso de biotécnicas, são necessários investimentos em todos os setores, como o melhoramento da gestão da unidade reprodutiva, além da contratação de pessoal capacitado para a realização do trabalho, como também o uso de animais de genética qualificada para que esse conjunto favoreça o retorno econômico (SIMPLICIO et al., 2007).

2.4.1. Particularidades na inseminação artificial em ovinos

Existem vários métodos para a deposição do sêmen no aparelho reprodutivo da ovelha, como por exemplo vaginal, cervical, transcervical e intra-uterina (DONOVAN et al., 2001; AX et al., 2004).

O método vaginal é considerado mais simples e de maior rapidez, pois o sêmen é depositado fresco e diretamente na vagina do animal sem a necessidade de localizar a cérvix (AISEN, 2004). O uso de sêmen congelado não é indicado, devido sua fertilidade apresentar elevada variabilidade (DONOVAN et al., 2001).

Para a inseminação artificial via cervical é necessária a deposição do sêmen o mais profundo possível dentro da cérvix (CHEMINEAU et al., 1991). Este método é mais utilizado em ovelhas, por apresentar diversas vantagens, sendo de rápida e fácil aplicação, baixos custos e resultados favoráveis (BODIN et al., 1997).

Na tentativa de se obter melhores resultados durante o processo de inseminação artificial, se faz necessário que em ovelhas a deposição do sêmen congelado seja o mais

próximo do local de fertilização. Assim, a inseminação artificial intra-uterina por laparoscopia permite que o sêmen seja depositado direto nos cornos uterinos fazendo com que seja evitada a passagem dos espermatozoides pela cérvix (AISEN, 2004).

A técnica de inseminação artificial intra-uterina transcervical foi desenvolvida com o intuito de reduzir custos e facilitar a utilização de sêmen congelado, sendo de maior aplicabilidade por não ser necessária cirurgias (RABASSA et al., 2007). Essa técnica consiste em pinçar e tracionar caudalmente a cérvix até a entrada da vagina, facilitando a passagem do aplicador pelos anéis e a deposição do sêmen direto no corpo do útero (HALBERT et al., 1990).

A cérvix ovina apresenta uma particularidade anatômica em relação as outras espécies, sendo considerada um problema para a inseminação artificial intra-uterina pelo método transcervical por apresentar lúmen cervical mais estreito, conter de 4 a 7 anéis cervicais desalinhados. Essa particularidade do desalinhamento do segundo anel em relação aos outros limita a passagem do aplicador através da cérvix (KAABI et al., 2006).

2.5. Preservação de sêmen ovino

Juntamente com a inseminação artificial, a preservação de sêmen é considerada fator determinante para que ocorra ampla difusão do material genético de diversos animais de forma mais qualificada possível (TRALDI, 1994). A preservação tem como finalidade estender a atividade de células, tecidos ou embriões por meio de métodos envolvendo diminuição de temperatura (PEGG, 2002).

Segundo Rojero et al. (2009) o sêmen de ovinos, como também de outras espécies animais, pode ser utilizado na inseminação artificial em diferentes formas: fresco, refrigerado ou congelado.

De acordo com Bicudo et al. (2005) o uso de sêmen fresco ou refrigerado é preferível para a inseminação artificial, se comparado com o sêmen congelado, pois requer menor qualificação de mão-de-obra, e apresenta baixo custo com equipamentos, bem como maior facilidade no momento da inseminação, por permitir deposição direto no aparelho genital feminino. Além disso, possibilitando a produção de maior número de doses inseminantes, não inviabilizando a concentração de espermatozoides (VISHWANATH; SHANNON, 2000).

Segundo Câmara e Guerra (2011) o método mais utilizado para armazenamento do sêmen de ovinos é a refrigeração do sêmen diluído, por meio da diminuição da

temperatura até próximo a 0 °C. Após a refrigeração, o tempo de armazenamento do sêmen até sua utilização deverá ser em torno de 48 horas após colheita (ROJERO et al., 2009), contudo, é perceptível uma queda na sua capacidade de fertilização após 24 horas na inseminação artificial cervical (ANEL et al., 2006; O'HARA et al., 2010).

O uso de sêmen congelado para a inseminação artificial é capaz de diminuir ou até evitar que doenças infecciosas sejam inseridas no rebanho, pois a utilização de diluidores contendo antibióticos podem ajudar em um controle microbiológico de forma eficiente (XAVIER et al., 2009). Segundo Carneiro et al. (2007) após a colheita e análise do sêmen para o processo de congelamento, o mesmo deve ser conservado e estocado em nitrogênio líquido a temperatura de -196 °C, tendo capacidade de utilização por tempo indeterminado. Apresentando vantagens em relação a durabilidade quando comparada com os outros métodos de conservação, o que, por sua vez, permite maior flexibilidade na difusão do material genético, inclusive entre continentes, e a possibilidade da formação de um banco de sêmen na propriedade.

Melhorias nos índices de fertilidades por meio do uso de sêmen congelado podem ser obtidos através de avanços nos protocolos de sincronização e com a utilização correta dos diluidores para conservação do sêmen (AISEN et al., 2005; CSEH et al., 2012).

O choque pelo frio promove mudanças nos espermatozoides quando submetidos a uma curva de refrigeração rápida de 38 °C a temperaturas próximas a 5 °C, a qual promove alterações como quedas das taxas de glicólise, respiração e frutólise, elevada degeneração do ácido desoxirribonucleico e perda dos componentes intracelulares durante o processo (WATSON, 2000). O uso dos diluentes tem como objetivo fornecer nutrientes e substrato energético, assegurando que não ocorram efeitos deletérios como a mudança de pH e osmolaridade durante o processo de conservação térmica (CHIRINÉA, 2006).

Conforme Anel et al. (2006) o avanço no estudo de diluidores vem mostrando que é inversamente proporcional a duração da sobrevivência dos espermatozoides em relação as suas atividades metabólicas.

Diluidores a base de Tris (hidroximetil aminometano) (MAIA et al., 2008) e o uso de leite desnatado são os mais utilizados no processo de diluição de sêmen (HAFEZ; HAFEZ, 2004). A gema de ovo também é normalmente adicionada aos diluidores, por apresentar sua fração lipoproteica com baixa densidade e elevado peso molecular, oferecendo proteção e prevenindo os espermatozoides de alterações na

membrana durante o processo de armazenamento (SALAMON; MAXWELL, 2000). Nos diluidores a base de leite desnatado, esse mecanismo de proteção deve-se também à sua fração proteica (MEDEIROS et al., 2002).

Tais resultados demonstram, portanto, a importância da utilização de diluentes para promover suporte energético e habilidade na proteção de baixas temperaturas, além de ser eficiente ao prologar a viabilidade desses espermatozoides (GHALSASI; NIMBKAR, 1996).

Métodos automáticos e manuais devem ser usados para facilitar a diminuição da temperatura de forma constante e homogênea para que seja minimizado as quedas bruscas de temperatura que podem causar choques térmicos e conseqüentemente a redução da capacidade espermática (WATSON, 2000; MEDEIROS et al., 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área de estudo e animais experimentais

O experimento foi conduzido na Estação de Agricultura Irrigada de Parnamirim – EAIP/PE da Universidade Federal Rural de Pernambuco, localizada na cidade de Parnamirim (Altitude: 397 m, latitude: 8°04'30" S, longitude: 39°07'30" W), no Estado de Pernambuco, distante 570 km do Recife. Os animais fazem parte do projeto de extensão **“Difusão e incentivo do controle zootécnico como tecnologia simples para melhoria em rebanhos caprinos e ovinos no município de Parnamirim-PE”**, aprovado no Edital N° 03/2015 – **BEXT/2016** – PROJETO BOLSA DE EXTENSÃO, iniciado em 2016, e do projeto de pesquisa **“Avaliação genética e molecular de caprinos e ovinos da Estação de Agricultura Irrigada de Parnamirim - EAIP/PE”**, aprovado por meio da decisão 0172 do Conselho Técnico Administrativo da UAST. Os animais são saudáveis e reprodutivamente normais, alimentados com pasto nativo do tipo caatinga arbustiva, e recebendo água e sal mineral *ad libitum*.

O experimento foi conduzido em campo no período de março de 2018, onde foram utilizados nove reprodutores ovinos das raças Dorper (n = 6) e Santa Inês (n = 3) da Estação experimental de Parnamirim. Foram registradas informações sobre as características morfométricas por meio de fita métrica, paquímetro e balança para comprimento corporal (CC), perímetro torácico (PT), altura da cernelha (AC), altura da garupa (AG), peso vivo (PV), escore de condição corporal (EC), temperatura retal (TR), e características reprodutivas como a mensuração do perímetro escrotal (PE). Após a colheita do sêmen, foram avaliados os seguintes aspectos quanti-qualitativos do sêmen: volume do ejaculado (VE), turbilhão (TURB), vigor espermático (VIG), motilidade espermática (%mov.), concentração espermática (conc.); bem como a morfologia espermática: percentual de espermatozoides normais (%norm.), percentual de defeitos espermáticos maiores (dmai), por exemplo, cabeça cuneiforme, cabeça piriforme, cauda fortemente enrolada e percentual de defeitos espermáticos menores (dmen), como cabeça destacada normal, cabeça pequena, cauda dobrada e cauda enrolada).

3.2. Colheita e Análise do sêmen

Os reprodutores foram submetidos à colheita de sêmen por meio de eletroejaculação, utilizando equipamento especialmente adaptado para coleta de sêmen de pequenos ruminantes.

Após a colheita do ejaculado dos reprodutores, uma gota de sêmen de cada amostra foi posicionada sobre lâmina de vidro, pré-aquecida a 37 °C e avaliada quando ao TURB. Eram atribuídos valores em escala variando de 0 a 5, sob microscopia óptica (100 x). Um volume de 10 µL de sêmen foi diluído (1:1, v:v) em solução tampão fostato-salino (PBS) pré-aquecido a 37 °C, posicionado em lâmina, e coberto com lamínula, igualmente aquecidas, para avaliação do %mov. e do VIG, atribuindo para o último valores de 0 a 5, sob microscopia óptica (400 x) (MAXWELL et al., 1996). Outra alíquota de sêmen foi diluída (1:400, v:v) em solução de formol salino tamponado (0,54% NaCl, 0,62% Na₂HPO₄, 0,13% KH₂PO₄, 5% formaldeído, pH 7,4) (EVANS; MAXWELL, 1987) para a estimativa da concentração espermática (conc.) em câmara de Neubauer. Após este último processo foram calculadas a quantidade de diluidor necessário para a refrigeração do sêmen.

Alíquotas de sêmen bruto foram utilizadas para a confecção de esfregaços e corados pelo método de Azul de Bromofenol (MEDEIROS et al., 2006) para avaliação da morfologia espermática; eram analisadas 200 células/animal/colheita de sêmen e registrados os percentuais %norm, bem como de dmai e de dmen (COLAS, 1980).

3.3. Diluidores

Foram comparados os diluidores Tris-Gema, Solução de Sacarose, Leite desnatado (Meio Kenney) e Soro fisiológico demonstrados na tabela 1.

Tabela 1: Composição dos meios diluentes Tris-Gema, Solução de Sacarose, Leite desnatado (Meio Kenney) e Soro fisiológico

Tratamento	Diluyente	Composição
A	Soro Fisiológico (controle)	<ul style="list-style-type: none">• NaCl (0,9%)
B	Sacarose	<ul style="list-style-type: none">• Sacarose (10,7 g)• Penicilina (1,0 g)• Água destilada (qsp. 100 mL)

C	Meio Kenney (leite desnatado)	<ul style="list-style-type: none"> • Leite desnatado (2,4 g) • Glicose (4,9 g) • Bicarbonato de sódio (0,75 g) • Penicilina (1,0 g) • Água destilada (qsp. 100 mL)
D	Tris-Gema	<ul style="list-style-type: none"> • Tris-(hidroximetil) aminometano (3,63 g) • Ácido cítrico (1,99 g) • Glicose (0,5 g) • Gema de ovo (15 ml) • Glicerol (0,5 ml) • Penicilina (1,0 g) • Água destilada (qsp. 100 mL)

As amostras de sêmen de cada reprodutor foram divididas em quatro frações com volumes iguais para a diluição nos meios supracitados e mantidos em banho-maria a 37 °C, durante a avaliação da concentração espermática. Posteriormente, volumes iguais dos diluidores foram adicionados a cada fração dos ejaculados dos animais. As amostras foram diluídas visando a obtenção de doses inseminantes contendo 30 milhões de espermatozoides/dose. As amostras diluídas foram então armazenadas em geladeira até atingirem temperatura de 15 °C, quando foram então acondicionadas em caixas térmicas contendo gelo para o transporte para o laboratório de química da UAST, onde permaneceram até o dia seguinte.

3.4. Avaliação da qualidade seminal pós-reaquecimento

No laboratório de microscopia da UAST, alíquotas de cada amostra diluída, nos respectivos diluidores, foram reaquecidas por no mínimo 30 segundos em banho-maria a 37 °C, e em seguida analisadas quanto a % mov. e ao VIG. Outras alíquotas das amostras diluídas foram utilizadas para confeccionar esfregaços de sêmen, os quais foram corados com azul de bromofenol, para a avaliação da morfologia espermática, conforme anteriormente. As avaliações da qualidade seminal pós-reaquecimento foram realizadas 24, 48 e 72 horas após o resfriamento, verificando qual diluidor foi mais eficiente para a conservação dos espermatozoides ovinos.

3.5. Análises Estatísticas

O experimento foi conduzido em um delineamento em blocos ao acaso, sendo cada animal um bloco (SAMPAIO, 2002). Todas as variáveis foram inicialmente avaliadas quanto à normalidade de suas distribuições, pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk e pela avaliação da assimetria e curtose, por meio do procedimento UNIVARIATE com a opção NORMAL do aplicativo estatístico SAS (v. 9.0, 2002). Transformações logarítmicas ($\log(x+1)$) ou angulares ($\arcsin(\sqrt{x/100})$) foram realizadas, quando necessário, para ajuste da distribuição normal.

As variáveis paramétricas foram submetidas à análise de variância, por meio do procedimento GLM do SAS, e suas médias foram comparadas entre os tratamentos (diferentes diluidores) por meio do teste t ou de Tukey, conforme suas instabilidades ($CV\% >$ ou $<$ do que 15%, respectivamente). As variáveis sem distribuição normal ou qualitativas foram comparadas entre os diluidores por meio do teste de Friedman, segundo Ipe (1987). Inicialmente, as variáveis foram submetidas a um ranqueamento por meio do procedimento RANK do SAS, e em seguida foram avaliadas por meio do procedimento GLM do SAS e comparadas pelo método dos quadrados mínimos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados morfométricos corporais e de perímetro escrotal de todos os animais avaliados da raça Dorper e Santa Inês mostrados na tabela 2, indicaram que os mesmos apresentam características corporais condizentes com os padrões estabelecidos pelas raças.

Tabela 2. Características morfométricas dos reprodutores ovinos da estação de agricultura irrigada de Parnamirim (EAIP/UFRPE)

ANIMAL	RAÇA	CC (cm)	PT (cm)	AC (cm)	AG (cm)	PV (kg)	EC (1 – 5)	PE (cm)
1	Dorper	61,0	93,0	78,0	79,0	70,0	4,0	34,5
2	Dorper	62,0	110,0	78,0	87,0	96,0	5,0	38,5
3	Dorper	67,0	110,0	80,0	84,0	85,2	4,0	32,0
4	Santa Inês	65,0	105,0	90,0	90,0	83,2	3,0	32,0
5	Dorper	64,0	93,0	75,0	78,0	77,0	4,0	35,0
6	Santa Inês	65,0	110,0	85,0	95,0	95,0	3,5	34,0
7	Santa Inês	65,0	108,0	91,0	96,0	85,0	3,0	34,0
8	Dorper	76,0	111,0	79,0	83,0	95,0	4,5	38,0
9	Dorper	66,0	105,0	81,0	82,0	88,5	4,5	35,0

CC: comprimento corporal; PT: perímetro torácico; AC: altura de cernelha; AG: altura de garupa; PV: peso vivo; EC: escore corporal; PE: perímetro escrotal.

As características seminais dos nove animais avaliados para o resfriamento do sêmen estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros seminais dos reprodutores ovinos da estação de agricultura irrigada de Parnamirim (EAIP/UFRPE)

Animal	Raça	VE (mL)	%mov	VIG (0 – 5)	Conc (milhões/mL)	dmai (%)	dmen (%)	%normais
1	Dorper	0,47	95	5	2100	1	29,5	69,5
2	Dorper	0,8	90	5	2990	3,5	80,5	16,0
3	Dorper	0,8	80	4	1470	4,5	13,5	82,0
4	Santa Inês	0,7	80	3	3860	9,0	68,5	22,5

5	Dorper	1,0	70	3	1560	12,0	30,5	57,5
6	Santa Inês	0,8	70	4	1140	6,0	26,5	67,5
7	Santa Inês	0,6	40	2	710	2,0	74,0	24,0
8	Dorper	0,5	40	2	710	11,0	25,5	63,5
9	Dorper	0,6	20	2	560	4,0	75,0	21,0

VE: volume do ejaculado; %mov: motilidade espermática; VIG: vigor espermático; Conc: concentração espermática; dmai: percentual de defeitos espermáticos maiores; dmen: percentual de defeitos espermáticos menores; %normais: percentual de espermatozoides morfológicamente normais.

Dos nove animais avaliados, apenas seis apresentaram os parâmetros seminais de motilidade e vigor espermáticos desejáveis para a preservação de sêmen conforme preconiza o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (tabela 4; CBRA, 2013). O sêmen dos demais animais não foram utilizados para preservação, por apresentarem baixo percentual de motilidade e vigor espermáticos, não se adequando aos parâmetros desejáveis.

Tabela 4. Características de sêmen fresco de carneiros, segundo CBRA (2013)

Característica	Valores
Motilidade espermática	$\geq 80\%$
Vigor	≥ 3
Concentração espermática	1 – 3 bilhões/mL

Para verificar a qualidade dos espermatozoides de maneira rápida é utilizado mais comumente a avaliação da motilidade espermática. A motilidade espermática é o percentual de espermatozoides móveis e está diretamente relacionado com a fertilidade animal, porém seus resultados são variáveis (TARTAGLIONE; RITA, 2004).

Os resultados para motilidade espermática após reaquecimento em relação ao diluidor e as horas de resfriamento são mostradas na figura 1.

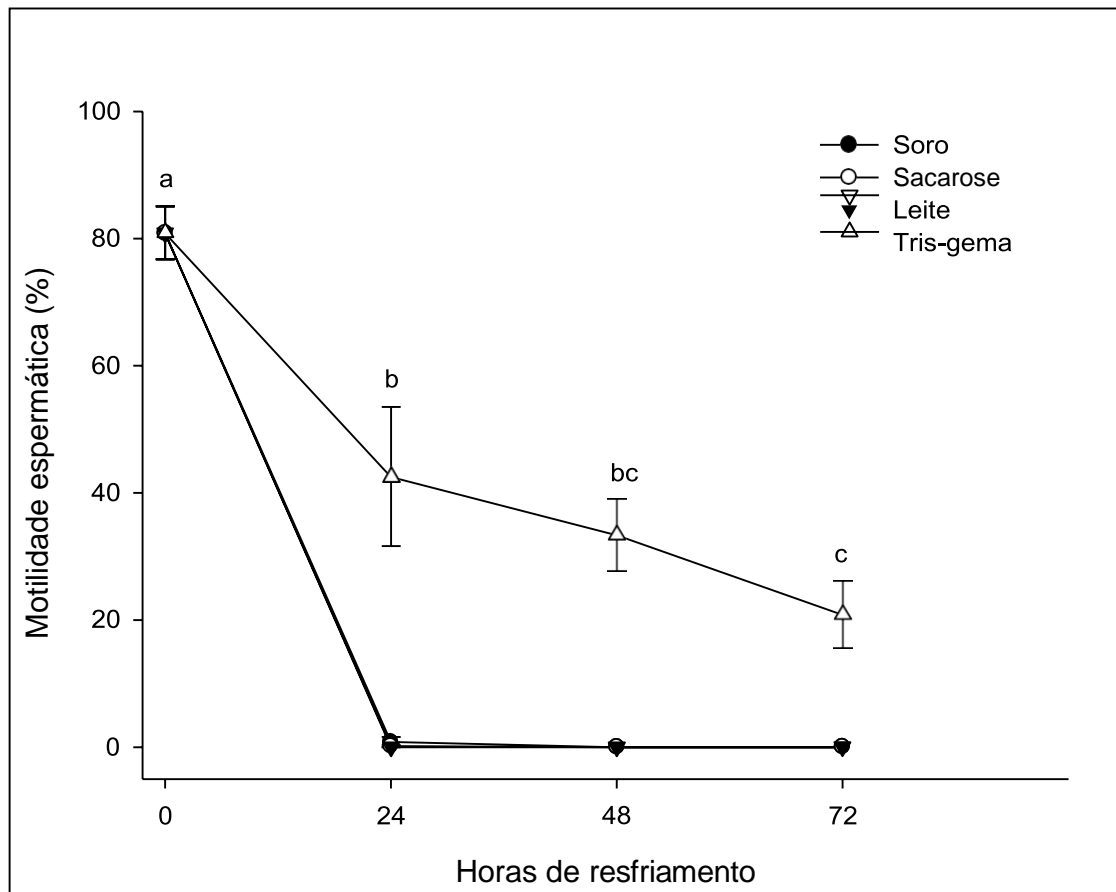


Figura 1 - Motilidade espermática do sêmen de ovinos da raça Santa Inês e Dorper resfriado com diferentes tipos de diluentes.

De acordo com as avaliações o resfriamento utilizando o diluidor Tris-gema foi o único capaz de manter os espermatozoides móveis por no mínimo 72 horas. Após 24 horas, 40% dos espermatozoides estavam móveis, em 48 horas a motilidade decresceu e em 72 horas encontrava-se em 20%. Para os diluidores a base de Soro, Sacarose e Leite os espermatozoides apresentaram 0% de motilidade em todos os tempos avaliados.

Os resultados para vigor espermático após reaquecimento em relação ao diluidor e as horas de resfriamento são mostrados na figura 2.

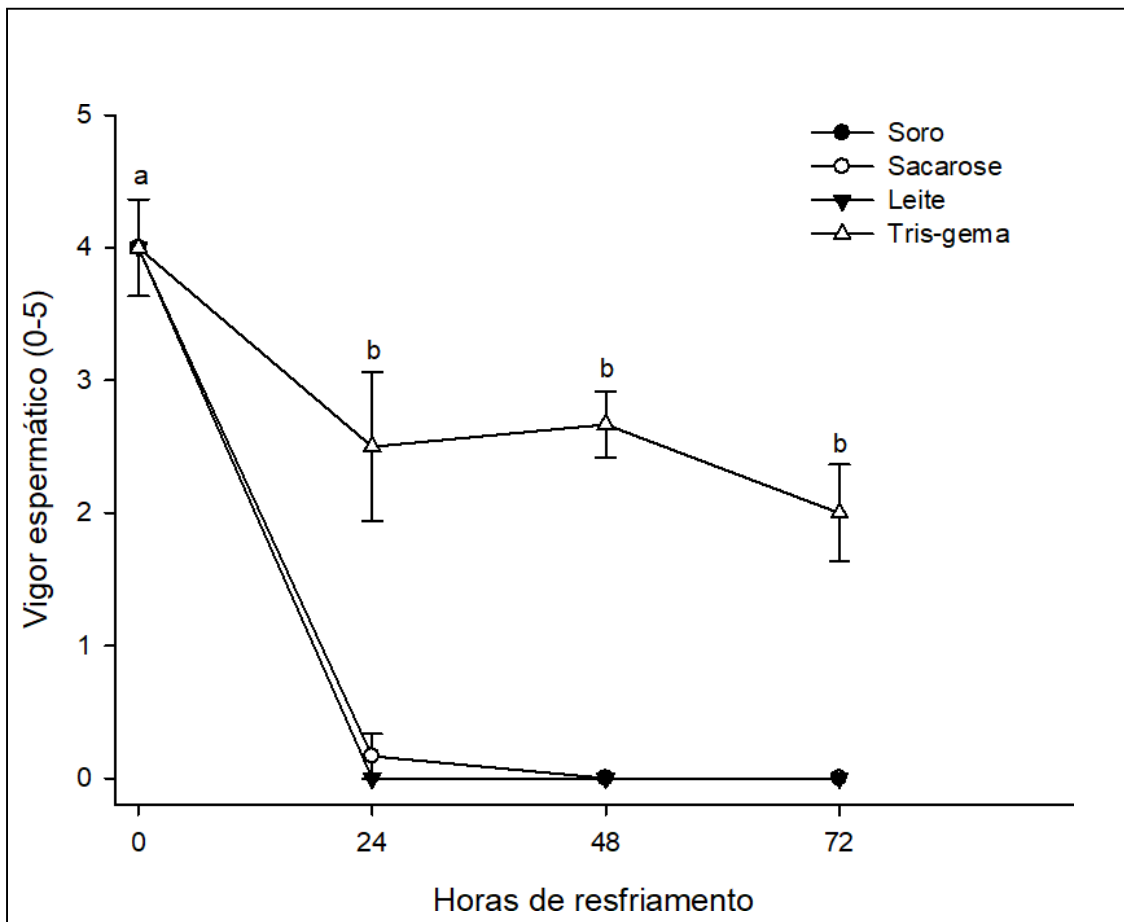


Figura 2 - Vigor espermático do sêmen de ovinos da raça Santa Inês e Dorper resfriado com diferentes tipos de diluentes.

Em relação ao vigor espermático os diluidores a base de Soro, Sacarose e Leite foram inferiores, apresentando 0% de vigor, onde o Tris-gema apresentou os melhores resultados com vigor de 2,5 em 24 horas, 2,8 em 48 e 2 em 72 horas. Dessa forma, foram observadas vantagens no uso do diluidor Tris-gema, em relação aos outros diluentes, nas avaliações realizadas no período de conservação de 24, 48 e 72 horas neste experimento.

Um dos crioprotetores mais utilizados em diversas espécies para a proteção da membrana plasmática do espermatozoide é a gema de ovo. Isto porque os lipídios que estão presentes na gema do ovo protegem a membrana espermática (BITTENCOURT et al., 2013). A interação entre lipídios torna a membrana espermática mais resistente durante o resfriamento (WATSON, 1995).

Conforme Feldman e Nelson (1996) após uma diluição e refrigeração, os espermatozoides podem se manter em condições viáveis por até 24 horas e dependendo dos diluidores utilizados, podem permanecer viáveis, como foi mostrado no presente

trabalho.

Segundo Martin (1968); Maxwell e Watson (1996) os danos que os espermatozoides sofrem após a diluição e o processo de refrigeração não afetam de maneira grave a motilidade, mas dificulta a sobrevivência e a capacidade de fecundação desses espermatozoides no aparelho reprodutivo das fêmeas.

A força e a velocidade com que os espermatozoides se movem é classificado como vigor e possui uma escala que varia de 0 a 5. Onde 0 classifica a ausência de movimentação dos espermatozoides e 5 os movimentos são mais expressivos e velozes (CBRA, 2013).

Para obter sucesso durante o processo de fertilização é necessário que a membrana espermática se mantenha intacta ao chegar na tuba uterina e ultrapassar o oócito, por isso a motilidade e vigor dos espermatozoides são importantes nesse processo (CUNHA; LOPES, 2000).

Em relação à morfologia espermática das amostras preservadas com o diluidor Tris-Gema, a figura 3 mostra que independente do período de refrigeração, a morfologia não se alterou desde a coleta, indicando uma boa capacidade de preservação do referido diluidor.

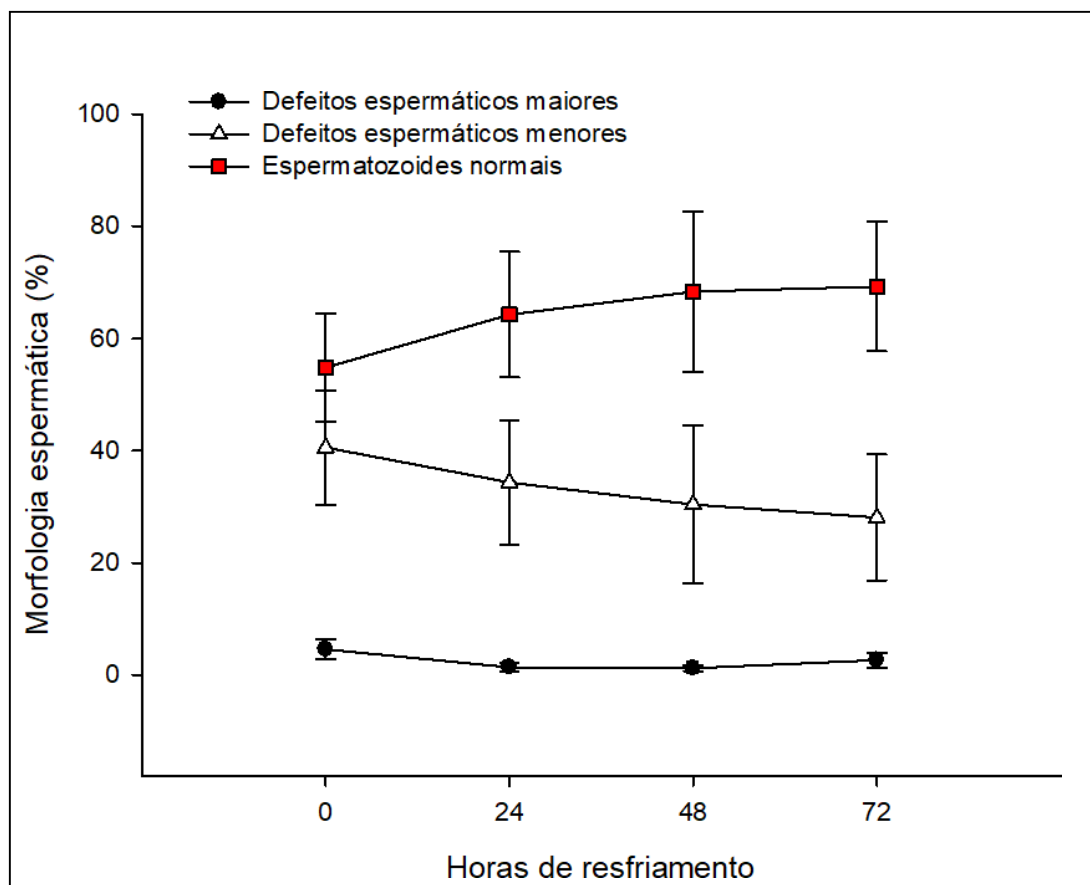


Figura 3 - Morfologia espermática do sêmen de ovinos da raça Santa Inês e Dorper resfriado com diluidor Tris-Gema.

A tabela 5 apresenta o percentual de defeitos espermáticos maiores e menores específicos mais frequentemente encontrados nos ejaculados dos carneiros antes (0 horas) e após refrigeração nos períodos de 24, 48 e 72 horas.

Tabela 5. Defeitos espermáticos maiores e menores mais frequentes em sêmen de reprodutores ovinos da estação de agricultura irrigada de Parnamirim (EAIP/UFRPE), diluído e resfriado com Tris-gema de ovo

Tempo	Defeitos espermáticos maiores (%)				Defeitos espermáticos menores (%)			
	Cabeça cuneiforme	Cabeça piriforme	Cauda fortemente enrolada	Inserção abaxial	Cabeça destacada normal	Cabeça pequena	Cauda dobrada	Cauda enrolada
0	1,3 ± 1,0	1,5 ± 1,1	2,4 ± 0,5	0,9 ± 0,5	6,0 ± 5,0	0,5 ± 0,0	26,5 ± 20,9	8,2 ± 13,4
24	3,5	0,8 ± 0,4	1,0 ± 0,8	1,0 ± 0,7	3,1 ± 3,2	0,5	27,3 ± 19,9	4,3 ± 6,8
48	0,8 ± 0,3	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,3	0,9 ± 0,4	8,8 ± 8,6	0,8 ± 0,4	20,4 ± 25,4	3,2 ± 2,5
72	1,8 ± 2,3	2,5	2,3 ± 3,2	0,7 ± 0,3	1,1 ± 0,7	2,3 ± 2,5	22,8 ± 25,6	2,5 ± 2,9

De acordo com a morfologia espermática, após a refrigeração, não foi observada alterações nesses defeitos, confirmando a capacidade de preservação do diluidor Tris-gema. Segundo Blom (1973) possíveis problemas durante a espermatogênese estão associados aos defeitos maiores, mostrando que a refrigeração não ocasionou danos nos espermatozoides em relação aos seus defeitos maiores. Esse estudo demonstrou que a porcentagem de defeitos mais frequentes foram os defeitos espermáticos menores, dentre eles o que apresentou maior porcentagem em todos os períodos de tempo foi a cauda dobrada.

Paganini et al. (1997) observaram elevada anormalidade na cauda dos espermatozoides após a refrigeração por um período de quatro horas. Conforme Barth e Oke (1989) as causas para esses elevados percentuais de anormalidades deve-se ao estresse pelo frio e a hiposmolaridade das soluções utilizadas para a conservação dos espermatozoides.

De acordo com Aisen (2008) a baixa fertilidade dos reprodutores está associada aos defeitos morfológicos existentes nos espermatozoides. Um dos defeitos morfológicos espermáticos causados pelo efeito brusco da queda de temperatura é a cauda enrolada, isso acontece devido a contração da bainha lipoprotéica, degeneração do acrossoma, tendo como consequência as perdas de enzimas, lipoproteínas, potássio,

fosfolípidios e ATP (MIES FILHO, 1987).

Dessa forma, o referido diluidor é viável tecnicamente para disseminar a prática da inseminação artificial em ovinos no Sertão pernambucano, visando melhorar geneticamente o rebanho da região e aumentar a lucratividade dos sistemas de produção.

5. CONCLUSÕES

Conforme os achados de motilidade, vigor, e morfologia espermática, concluiu-se que o diluidor Tris-Gema foi o único a promover preservação por no mínimo 72 horas nas presentes condições experimentais, sendo aconselhável sua utilização por até 48 horas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANEL, L.; ALVAREZ, M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ANEL, E.; PAZ, P. Improvement strategies in ovine artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 41, supl. 2, p. 30-42, 2006.
- ANDRIOLI, A. Biotécnicas da reprodução e o impacto na produção de caprinos e ovinos. In: SEMINÁRIO NORDESTINO DE PECUÁRIA, 6.; SEMANA DA CAPRINO-OVINOCULTURA BRASILEIRA, 3.; FEIRA DE PRODUTOS E DE SERVIÇOS AGROPECUÁRIOS, 6., 2002, Fortaleza. **Palestras técnicas**. Fortaleza: Federação Agropecuária do Estado do Ceará, 2002. v. 7, p. 61-82.
- AISEN, E. G. **Reproducción ovina y caprina**. Buenos Aires: Inter-Médica, 2004. 216 p.
- AISEN, E.G. **Reprodução ovina e caprina**. 1. ed. São Paulo: MedVet, 2008. v.1. 203 p.
- AX, R. L.; DALLY, M. R.; DIDION, B. A.; LENZ, R. W.; LOVE, C. C.; VARNER, D. D.; HAFEZ, B.; BELLIN, M. E. Inseminação artificial. IN: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. (Ed.) **Reprodução Animal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Manole, 2004. p.381-394.
- AZEVÊDO D. M. M. R.; MARTINS F. R.; ALVES A. A.; ARAÚJO A. A.; LÔBO, R. N. B. Comportamento sexual de ovinos e caprinos machos: uma revisão. **PUBVET**, v.2, n.6, 2008.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa**. 1. ed. Ames: Iowa State University Press, 1989.
- BENCH, C. J.; PRICE, E. O.; DALLY, M. R.; BORGWARDT, R. E. Artificial selection of rams for sexual performance and its effect on the sexual behavior and fecundity of male and female progeny. **Appl Anim Behav Sci**, v.72, p.41-50, 2001.
- BELIBASAKI, S.; KOUIMTZIS, S. Sexual activity and body and testis growth in prepubertal ram lambs of Friesland, Chios, Karagouniki and Serres dairy sheep in Greece. **Small Rumin Res.**, v.37, p.109-113, 2000.
- BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C.; SILVA MAIA, M. S.; SOUSA, D. B.; RODELLO, L. 2005. Aspectos peculiares da inseminação artificial em ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**. 33 (Supl 1): 127-130.
- BICUDO, S. D.; SOUZA, D. B.; TAKADA, L. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado e biotécnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 15, 2003. Porto Seguro – BA. **Anais...** Belo Horizonte - MG: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2003.
- BITTENCOURT, R. F. et al. Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: Diluidores e crioprotetores. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.14, n.4, p. 522-536, out/dez. 2013.
- BODIN, L.; DRION, P. V.; REMY, B.; BRICE, G.; COGNIÉ, Y.; BECKERS, J. F. Anti-PMSG antibody levels in sheep subjected annually to oestrus synchronization. **Reproduction Nutrition Development**, v.37, p.651-660, 1997.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinarmedicin**, v. 25, p. 282-391, 1973.

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**, v. 35, n. 1, p. 33-40, 2011.

CARNEIRO G. F; SILVA S. V; MEDEIROS L. R. D; GOMES N. O; PROCÓPIO O. C. S. Utilização prática de sêmen congelado. In: ASSIST (Simpósio Brasileiro de Reprodução Assistida em Caprinos e Ovinos), 1, 2007. **Anais...** Gravatá, PE: ASSIST, 2007. CD-ROM.

CORRADELLO, E. F. A. **Criação de ovinos: antiga e contínua atividade lucrativa**. São Paulo: ÍCONE: 1988. 124 p.

COLAS, G. Seasonal variations of the quality of sperm in the Ile-de-France ram. I. Study of the cellular morphology and massal motility. **Reprod Nutr Dev**, v. 20, n. 6, p. 1789-99, 1980.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). **Manual de exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3.ed. 2013. 104p.

CLOETE, S. W. P.; SNYMAN, M. A.; HERSELMAN, M. J. Productive performance of Dorper sheep. **Small Rumin. Res.**, Amsterdam, v. 36, n. 2, p. 119-135, 2000.

CHEMINEAU, P.; COGNIÉ, Y.; GUÉRIN Y.; ORGEUR, P.; VALLET, J. C. **Training manual on artificial insemination in sheep and goats**. Animal Production and Health, Rome: FAO, n.83, 1991. 222p.

CHIRINÉA, V. H. Características morfofuncionais do sêmen canino refrigerado e congelado, usando dois diferentes meios diluentes. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 4, p. 407-415, out/dez, 2006.

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

CUNHA, I. C. N. Exame andrológico do cão. **Jornal brasileiro de ciência animal**, v. 1, n. 1, p. 49-65, 2008.

CUNHA, I. C. N.; LOPES, M. D.; Estudo do processo de refrigeração do sêmen canino utilizando-se diluidores a base de leite e glicina-gema. **Ver. Educ. Contin.**, CRMV/SP, v.3, p.37-42, 2000.

DICKSON, K. A; SANFORD, L. M. Breed diversity in FSH, LH and testosterone regulation of testicular function and in libido of young adult rams on the southeastern Canadian prairies. **Small Rumin Res.**, v.56, p.189-203, 2005.

DONOVAN, A.; HANRAHAN, J. P.; LALLY, T.; BOLAND, M. P.; BYRNE, G. P.; DUFFY, P.; LONERGAN, P.; O'NEILL, D. J. AI for sheep using frozen-thawed semen. In: **End of Project Report: Sheep Series N° 11**, ISBN: 1 84170 152 1, 2001.

- ELIAS, E.; COHEN, D.; DAYENOFF, P. Characteristics and indices of reproduction in Dorper sheep. **J./S. Af. Vet. Assoc**, Pretoria, v. 56, n.3, p. 127- 130, 1985.
- EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. **Butterworth-Heinemann**, 1987. 208 ISBN 0-409-49177-2.
- FELDMAN, E.C., NELSON, R.W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. 487p.
- FERNANDES, F. M. N. Situação da Ovinocultura de São Paulo. In: SIMPÓSIO PAULISTA DE OVINO-CULTURA, 1, 1988, Botucatu. **Anais...** Campinas, Fundação Cargil, 1989.
- FERNANDES JÚNIOR, G. A. **Desempenho produtivo e qualidade da carne de ovinos terminados em pastagem irrigada no Semiárido nordestino**. 2010. 88 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
- FONSECA, J. F. Otimização da eficiência reprodutiva em caprinos e ovinos. In: Anais do I ENCAPRI, 2006, Campina Grande, **Anais...** Campina Grande, 2006.
- GOMES, B. V. **Conjuntura Trimestral Caprino-ovinocultura Pernambuco**. Conab, 2016. 9 p.
- GHALSASI, P. M.; NIMBKAR, C. Evaluation of laparoscopic intrauterine insemination in ewes. **Small Rumin Res.**, v. 23, p. 69-73, 1996.
- GRANADOS, L. B. C.; DIAS, A. J. B.; SALES, M. P. **Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos**. In: Capacitação dos técnicos e produtores do Norte e Noroeste Fluminense em Reprodução de Caprinos e Ovinos. 1.ed. Campos dos Goyatacazes: 2006. 54p.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7. ed., Barueri-SP: Manole, p. 513, 2004.
- HALBERT, G. W.; DOBSON, H.; WALTON, J. S.; SHARPE, P.; BUCKRELL, B. C. Field evaluation of a technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. **Theriogenology**, v.33, 1231-1244, 1990.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Pecuária Municipal. 2017. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/quadros/brasil/2016>>. Acesso em: 26 de Março de 2018.
- IPE, D. Performing the Friedman test and the associated multiple comparison test using PROC GLM. In. SAS USERS GROUP INTERNATIONAL CONFERENCE. 20., 1987 Dallas, Texas, EUA. **Proceedings...**, SAS Institute, v.12, p. 1146-1148, 1987.
- KAABI, M.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; CHAMORRO, C. A.; BOIXO, J. C.; PAZ, P.; ANEL, L. Influence of breed and age on morphometry and depth of inseminating catheter penetration in the ewe cervix: A postmortem study. **Theriogenology**, v.66, p.1876-1883, 2006.
- MACHADO, R.; ZAGATTO, L. C. A. G.; AZEVEDO, H. C.; SIMPLÍCIO, A. A. Viabilidade econômica da inseminação artificial em caprinos. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v.35, n.3, p.141-149, 1997.

- MAIA, M. S.; BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C. A.; SOUSA, D. B.; RODELLO, L.; MEIRA, C. Efeito da adição de lauril sulfato de sódio (OEP) ao diluidor na viabilidade do sêmen congelado de ovinos Santa Inês. **Veterinária e Zootecnia**. Botucatu, v. 15, n. 3, p. 521-530, 2008.
- MARTIN, I. C. A. Milk and synthetic diluents for ram semen. In: VI CONG. INTER. REPROD. ANIM. INSEM. ARTIF. (vol 2: 1968: Paris). **Proceedings...** Paris, 1968. p. 1619-1622.
- MAXWELL, W. M. C.; WATSON, P. F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 55-65, 1996.
- MEDEIROS, A. A.; ARAUJO, A. A.; MOURA, A. A. A.; CAVALCANTE, J. M. M.; FIGUEIREDO, E. L.; RODRIGUES, L. F. S. Utilização do azul de bromofenol conservado a 4 °C e 29 °C, como método de coloração vital para avaliação do espermatozoide ovino. **Rev. ciênc. agrár.**, Belém, n. 46, p.287-297, jul./dez. 2006.
- MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, p. 327-344, 2002.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais**. 6.ed. Porto Alegre: Sulina, 1987. V.2. 750p.
- MORAES, J. C. F. Perspectivas da utilização do sêmen congelado em programas de reprodução assistida em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.4, p.613-619, 2003.
- NEVES, J. P. Novas técnicas de inseminação artificial em ovinos. In: **Caprinocultura e Ovinocultura**, Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1990. p. 57-67.
- O'HARA, L.; HANRAHAN, J. P.; RICHARDSON, L.; DONOVAN, A.; FAIR, S.; EVANS, A. C. O.; LONERGAN, P. Effects of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. **Theriogenology**, v. 73, p. 541-549, 2010.
- PACHECO, A.; QUIRINO, C. R. Comportamento sexual em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal Belo Horizonte**, v.34, n.2, p.87-97, abr./jun. 2010.
- PAGANINI FILHO, P.; BICUDO, S. D.; SOUZA, M. I. L.; SOUSA, D. B. Viabilidade do sêmen ovino frente a três diluidores em temperaturas de 37°C e sob refrigeração. In: XII CONG. BRAS. REPR. ANIM. (21: 1997: Belo Horizonte). **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 1997. p. 61.
- PALHÃO, M. P.; BISPO, C. A. S.; FURST, R.; ROVAY, H.; CARVALHO, G. R.; BISPO, M. S. Efeito de diferentes curvas de resfriamento e diluentes na conservação do sêmen caprino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 571-571, 2006.
- PEGG, D. E. The History and Principles of Cryopreservation. **Seminars in Reproductive Medicine**, v.20, n.1, p.05-14, 2002.
- PINHEIRO, J. H. T. **Parâmetros reprodutivos de ovelhas da raça Santa Inês Criadas no Sertão do Ceará**. 2004. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2004.

- RABASSA, V. R.; TABELÃO, V. C.; PFEIFER, L. F. M.; SCHNEIDER, A.; ZIGUER, E. A.; SCHOSSLER, E.; SEVERO, N. C.; PINO DEL, F. A. B.; CORRÊA, M. N. Efeito das técnicas transcervical e laparoscópica sobre a taxa de prenhez de ovelhas inseminadas em tempo-fixo. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, n.1, p.127-133, 2007.
- ROJERO, R. D. M.; REYNASANTAMARIA, L.; MICHEL-ACEVES, A. C.; MASTACHELAGUNAS, A. A.; et al. Cervical or intrauterine artificial insemination in pelibuey ewes, with chilled semen. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 8, n. 12, p. 2621-2625, 2009.
- ROSA H. J. D.; JUNIPER D. T; BRYANT M. J. The effect of exposure to oestrous ewes on rams' sexual behaviour, plasma testosterone concentration and ability to stimulate ovulation in seasonally anoestrous ewes. **Appl Anim Behav Sci.**, v.67, p.293-305, 2000.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 77-111, 2000.
- SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2. ed., Belo Horizonte, Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265 p.
- SILVA, A. S.; COSTA E SILVA, E. V.; NOGUEIRA, E.; ZÚCCARI, C. E. S. N. **Avaliação do custo/benefício da inseminação artificial convencional e em tempo fixo de fêmeas bovinas pluríparas de corte**. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.4, p.443-455, 2007. (2): 234-246.
- SIMPLICIO, A. A.; FREITAS, V. J. F.; FONSECA, J. F. 2007. Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. 31(2): 234-246.
- SILVA, F. L. **Efeito de fatores genéticos e de ambiente sobre o desempenho de mestiços Santa Inês, no Estado do Ceará**. 1990. 93 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1990.
- SNOWDER, G. D.; STELLFLUG, J.N.; VAN VLECK, L.D. Heritability and repeatability of sexual performance scores of rams. **J Anim Sci**, v.80, p.1508-1511,2002.
- SOUSA, W. H., LEITE, P. R. M. **Ovinos de corte: A raça Dorper**. João Pessoa: EMEPA-PB, 2000. 76p.
- STELLFLUG, J. N.; LEWIS, G. S. Effect of early and late exposure to estrual ewes on ram sexual performance classifications. **Anim Reprod Sci.**, v.97, p.295-302, 2007.
- TARTAGLIONE, C. M.; et al. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.62, p.1245-1252, 2004.
- TRALDI, A. S. Tópicos em reprodução e inseminação artificial em caprinos. In: **Manual Técnico**. São Paulo, p. 54, 1994.
- VARAGO, F. C.; MOUSTACAS, V. C.; CRUZ, B. C. et al. Biotécnicas da Reproducao Aplicadas a Pequenos Ruminantes. In.: VII Congresso Brasileiro de Buiatria, 2009, Belo Horizonte. **Anais...** Minas Gérias.

VIANA, J. G. A. Panorama Geral da Ovinocultura no Mundo e no Brasil. [Editorial]. **Revista Ovinos**, Ano 4, N° 12, Mar, 2008.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-3, p. 23–53, 2000. 13.

XAVIER, M. N.; MOUSTACAS, V. S.; CARVALHO JÚNIOR, C. A. et al. Avaliação de diferentes antibióticos na inibição do crescimento de *Brucella ovis* em sêmen ovino congelado. In: XVIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2009, Belo Horizonte, MG. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2009. (CD-ROM). ISSN1984-871.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60/61, p.481-492, 2000.

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