

USO DE PLACA AQUECEDORA VISANDO A INCUBAÇÃO DO ESPERMATOZOIDE OVINO APÓS CRIOPRESERVAÇÃO

(Use of heating plate aiming at the ovine sperm incubation after cryopreservation)

Wildelfrancys Lima de SOUZA¹; Elenice Andrade MORAES¹;
Lina Raquel Santos ARAÚJO²; Ricardo TONIOLLI²

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Rodovia 407 Km 12, Petrolina/PE. CEP: 56.300-000; ²Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen (FAVET/UECE). *E-mail: wilde@zootecnista.com.br

RESUMO

Objetivou-se avaliar a utilização da placa aquecedora, em substituição ao banho-maria, no teste de termorresistência (TTR) de espermatozoides de carneiros após a criopreservação. Foram coletados 10 ejaculados de três carneiros adultos (n=30), por meio de vagina artificial para ovinos. Em seguida, foram diluídos em Tris-Gema de ovo, a uma concentração final de 200×10^6 spz/mL, e submetidos à curva de resfriamento, para posterior criopreservação em palhetas em nitrogênio líquido. Após descongelamento, as amostras foram analisadas quanto à integridade de membrana, de acrossoma e atividade mitocondrial. O sêmen então foi dividido em dois tubos e submetido ao TTR, um em banho-maria e outro em placa aquecedora, e, ainda, avaliado a cada 30 minutos, do tempo zero (pós-descongelamento) até 90 minutos de incubação, a 37 °C, quanto à motilidade espermática e à motilidade progressiva. As variáveis foram submetidas à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Após o processo de congelamento/descongelamento, os espermatozoides apresentaram baixo percentual de integridade de membrana e elevado percentual de atividade mitocondrial e integridade do acrossoma. Não foi observada diferença na motilidade espermática nem na motilidade progressiva ao longo do TTR, quando comparados os espermatozoides que foram incubados em banho-maria aos incubados em placa aquecedora durante o período de 90 minutos. A placa aquecedora pode ser utilizada como meio de incubação dos espermatozoides de carneiros em substituição ao banho-maria.

Palavras-chave: CASA, placa aquecedora, congelamento, carneiro.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the use of the hot plate to replace the water bath in the thermo resistance test of ovine sperm after cryopreservation. Ten ejaculates were also collected from three adult sheep (n=30), by means of artificial sheep vagina. The collected samples were diluted in Tris-Egg Yolk, at a final concentration of 200×10^6 spz/mL and subjected to a cooling curve for subsequent cryopreservation in liquid nitrogen straws. Immediately after thawing, the samples were analyzed for membrane and acrosome integrity, and mitochondrial activity. The semen was then divided into two tubes and submitted to TTR, one in a water bath and the other in a hot plate, and evaluated every 30 minutes, from time zero (post-thaw) until 90 minutes of incubation at 37 °C, for sperm motility and progressive motility. The variables were subjected to analysis of variance and the means were compared using the Tukey test at 5% probability. After the freeze/thawing process, sperm showed a low percentage of membrane integrity, high percentage of mitochondrial activity, in addition to maintaining the integrity of acrosome. No difference was observed in sperm motility nor progressive motility, along the TTR, when comparing the sperm that were incubated in a water bath in relation to those incubated in a hot plate during the period of 90 minutes. The heating plate can be used as a means of incubating sheep sperm in replacement of the water bath.

Key words: CASA, hot plate, freezing, lamb.

INTRODUÇÃO

A inseminação artificial é uma biotécnica de importância fundamental para os programas de melhoramento genético de ovinos. Sua utilização com sêmen congelado permite

uma difusão em larga escala do sêmen de diferentes reprodutores, proporcionando trocas genéticas entre rebanhos distantes (LEBOEUF et al., 2000), além de permitir a estocagem do sêmen de forma viável por tempo indefinido (BERGSTEIN-GALAN et al., 2017; SILVA, 2008).

Entretanto, a obtenção de bons resultados com a criopreservação é parcial, uma vez que, no processo de congelação/descongelação, os espermatozoides são submetidos a mudanças bruscas de temperatura, resultando em alterações na sua estrutura e funcionalidade (FANG *et al.*, 2016). Essas mudanças danificam grande parte das células espermáticas (LIMA *et al.*, 2010), levando a uma conseqüente redução da fertilidade, quando comparada com sêmen refrigerado, em função da morte celular e dos danos na capacidade funcional dos espermatozoides sobreviventes (BITTENCOURT *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2018; ARANDO *et al.*, 2019).

Dessa forma, para conseguir penetrar a zona pelúcida, chegar até o oócito e realizar a fecundação, os espermatozoides precisam apresentar uma capacidade de deslocamento, sendo a motilidade elemento indispensável para o desempenho dessa função (ARANDO *et al.*, 2019). Diversos são os métodos que permitem uma boa avaliação espermática, podendo ser o método subjetivo ou com utilização do Sistema de Análise Computadorizada - CASA (KARAGEORGIU *et al.*, 2016; NUNES *et al.*, 2019).

Com essa finalidade, provas de exaustão espermática a diversas temperaturas ainda são preconizadas, visando-se correlacionar a capacidade dos espermatozoides em manter a motilidade, após longos períodos de incubação a uma determinada temperatura, com os resultados de fertilidade. Desse modo, a análise do teste de termorresistência (TTR) vem sendo utilizada, avaliando a motilidade dos espermatozoides incubados em banho-maria, em diferentes tempos, na tentativa de se testar o que aconteceria com os espermatozoides após ejaculação ou inseminação artificial (MARTINEZ *et al.*, 2018).

Considerando o acima exposto, a utilização da placa aquecedora pode ser uma alternativa segura e prática de manutenção da temperatura das amostras de sêmen durante o TTR, podendo evitar riscos de perda da amostra. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a utilização da placa aquecedora, em substituição ao banho-maria, na incubação dos espermatozoides de carneiros após a descongelação.

MATERIAL E MÉTODOS

Local, animais e período de execução

O experimento foi conduzido durante os meses de maio a julho de 2014, no setor de Ovinocultura e no Centro de Pesquisa em Suínos, Espécies Nativas e Silvestre (CPSENS), localizados no Campus de Ciências Agrárias da UNIVASF, situados no município de Petrolina-PE (latitude 09°23'55" Sul e a uma longitude 40° 30' 03" Oeste), estando a uma altitude de 376 metros, com precipitação média anual em torno de 300mm. A região apresenta temperatura média anual em torno dos 27 °C e clima do tipo semiárido quente ou segundo a classificação de Köppen-Geiger (2007). O presente estudo foi realizado após a aprovação institucional da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), sob o protocolo

nº 0002/110414, de 11 de abril de 2014, estando de acordo com os princípios éticos de experimentação animal do Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas da UNIVASF.

Foram utilizados três carneiros adultos, sendo um da raça Santa Inês e dois da raça Dorper, com idades entre 2 e 4 anos, em trabalho rotineiro de coletas de sêmen. Os animais estavam confinados em uma instalação contendo acesso à iluminação natural, com temperatura e umidade relativa média de 27,3 °C e 47,5%, respectivamente. Os animais recebiam água *ad libitum* e alimentação fornecida duas vezes ao dia, com dieta composta de capim elefante (*Penisetum purpureum*) picado, além de suplementação concentrada à base de farelo de milho, farelo de soja e mistura mineral. A relação volumoso/concentrado foi de 60:40 na forma de dieta total misturada, de acordo com as exigências para animais dessa categoria segundo o National Research Council (NRC, 2007).

Coleta e processamento do sêmen

Foram coletados 10 ejaculados de cada reprodutor (n=30), por meio de vagina artificial para ovinos (Vargina artificial[®], Minitub, Alemanha), onde era colocada água a uma temperatura de 50 °C, sendo acoplada a um tubo de ensaio com capacidade para 50mL. As coletas foram realizadas três vezes por semana, em intervalos de 48 horas, durante 4 semanas. Logo em seguida à coleta, o ejaculado foi transportado em caixa térmica para o CPSENS. Uma vez chegando ao laboratório, o ejaculado *in natura* foi mantido em banho-maria a 32 °C, enquanto era avaliado quanto a possíveis alterações macroscópicas (presença de urina, pus ou sangue) e selecionado segundo análises de motilidade e vigor espermático. Foram utilizados no experimento, apenas ejaculados que atendiam aos padrões considerados normais pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, com os seguintes valores: movimento de massa $\geq 3,0$; motilidade espermática $\geq 80\%$; e vigor espermático $\geq 3,0$ (CBRA, 2013).

Após avaliação inicial, os ejaculados foram diluídos em Tris-Gema de ovo e glicerol (DORADO *et al.*, 2007; CÂMARA *et al.*, 2018), em um tubo de ensaio, totalizando 3mL a uma concentração final de 200×10^6 sptz/mL e mantido em banho-maria a 32 °C por 15 minutos. Após a diluição, os tubos de ensaio com o sêmen diluído foram colocados dentro de um Becker com água aquecida a 32 °C, ficando o nível da água do Becker acima da coluna de sêmen do tubo. Em seguida, foi colocado em câmara fria a 5 °C, por um período de 2 horas. Após esse tempo, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5mL, lacradas com seladora (UltraSeal[®], Minitub, Alemanha), que, em seguida, foram submetidas, em rampa de congelamento, aos vapores do nitrogênio (-60 a -70 °C), a 8cm da superfície líquida, por 15 minutos. Após esse tempo, as palhetas foram congeladas, através da imersão em nitrogênio líquido (-196 °C), e estocadas em botijão criogênico para posteriores análises.

A descongelamento do sêmen foi feita colocando-se as palhetas no descongelador automático (Cryofarm[®], IMV, França) a uma temperatura de 37 °C, durante 30 segundos.

Procedimento inicial visando as avaliações

Após descongelamento, o conteúdo de três palhetas foi transferido para tubos de ensaio e incubados a 37 °C para análises de integridade estrutural da célula espermática (membrana plasmática, acrossoma e mitocôndria). Esse procedimento teve por finalidade verificar se os

espermatozoides, após o processo de criopreservação, apresentavam as condições de ordem estrutural, antes da prova de exaustão pelo teste de termorresistência nos dois diferentes métodos de incubação.

Membrana plasmática

Optou-se pelo teste supravital (vivos e mortos) do sêmen descongelado, para avaliar a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, pela coloração de Eosina-Nigrosina (E/N) (SANTOS *et al.*, 2015). Para tanto, 10µL de cada amostra foi colocado em microtubo de eppendorf, juntamente com 10µL do corante. Logo após a homogeneização, 8µL da mistura foi colocado entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37 °C e um total de 200 espermatozoides foi contado em microscópio óptico (DM 750R, Leica Microsystems, Heerbrugg, Suíça), em aumento de 100x. As células com membrana plasmática lesada apresentavam o núcleo corado em rosa da Eosina e aquelas com a membrana plasmática intacta núcleo corado em escuro da Nigrosina.

Membrana acrossomal:

O corante simples de Pope (POPE *et al.*, 1991) foi utilizado para verificar a integridade do acrossoma. Para tanto, a alíquota de 10µL, de cada amostra descongelada, foi diluída com 90µL de solução de diidrato citrato de sódio a 2,9%, em microtubo de eppendorf. Em seguida, foi adicionado ao microtubo 10µL de corante simples, composto de 1% do corante *Fast Green* e do Rosa Bengala, homogeneizado e incubado a uma temperatura ambiente de 22 °C, por 70 segundos. Após incubação, 10µL da mistura foi colocado em lâminas e feito esfregaço, sendo em seguida cobertas com lamínula. Foram contados 200 espermatozoides por lâmina em microscópio óptico, em aumento de 100x. Esses foram classificados em: a) acrossoma íntegro: região acrossomal de coloração lilás, levemente mais escura na região pós-acrossomal; b) acrossoma danificado: região acrossomal de coloração rosa, levemente mais clara na região pós-acrossomal.

Atividade mitocondrial

Ela foi determinada utilizando a sonda Rodamina 123 (R123). A sonda fluorescente é transportada e acumulada no interior das mitocôndrias com respiração ativa (mitocôndrias funcionais), emitindo fluorescência verde (HOLT *et al.*, 1988). Alíquotas de 10µL foram colocadas em microtubo eppendorf de 1,5mL, juntamente com 2µL de R123 e então incubadas em banho-maria, a 37 °C, durante 8 minutos. Em seguida, 10µL da mistura foi colocado entre lâmina e lamínula, pré-aquecidas a 37 °C, e avaliado em microscópio de fluorescência (AXIO Image A2R, Carl Zeiss, Berlim, Alemanha), utilizando filtro de fluoresceína de excitação de 400-570 e de emissão de 460-610nm. Foi contado um total de 200 espermatozoides/ amostra em campos aleatórios da lâmina. Espermatozoides que emitiam fluorescência de cor verde eram considerados células com atividade mitocondrial presente.

Incubação dos espermatozoides descongelados

O sêmen descongelado de cada ejaculado foi dividido em dois tubos de ensaio para serem submetidos ao teste de termorresistência (TTR). Cada tubo foi direcionado para um dos

métodos de incubação testado (banho-maria ou banho úmido e placa aquecedora ou banho seco). Após as avaliações estruturais de cada ejaculado, um tubo de ensaio permaneceu em banho-maria (BM) e outro foi colocado em placa aquecedora (Master Digital AS-300, Champion/Eletronics), a qual possuía orifícios de acoplamento para tubos, garantido, assim, que a temperatura estivesse em torno de todo o conteúdo da amostra. Em ambos os tratamentos, o sêmen encontrava-se a 37 °C. A avaliação consistiu na incubação do conteúdo do tubo de ensaio em banho-maria e em placa aquecedora, a 37 °C, por 90 minutos. Amostras de 10µL de cada tubo foram tiradas em diferentes tempos de incubação, com intervalos de 30 minutos (T0, T30, T60 e T90) para avaliação da motilidade total e progressiva no CASA (KARAGEORGIU *et al.*, 2016; NUNES *et al.*, 2019).

Para avaliação da motilidade espermática (total e progressiva), foi utilizado o sistema de análise computadorizada (CASA[®], Minitub, Alemanha), equipado com o SpermVision[®]. Alíquotas de 8µL foram analisadas, individualmente, entre lâmina e lamínula, pré-aquecidas a 37 °C. Os resultados da motilidade espermática no T0 foram utilizados como resultado dessa característica para o sêmen descongelado.

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso. Todas as variáveis foram submetidas aos testes de normalidade (Teste de Lilliefors) e homocedacidade (Teste de Cochran e Bartlett). A análise estatística foi feita pela avaliação das médias e desvios padrões, com as variáveis de distribuição normal sendo submetidas à análise de variância. As médias foram comparadas pelos testes de Mann Whitney, Tukey e Qui-quadrado, com nível de significância de 5%, utilizando o programa *Statistical Analysis System* (SAS 9.2. 2002-2008 by SAS Institute Inc. - Cary, NC, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os percentuais da avaliação da integridade estrutural espermática, logo após a descongelação dos espermatozoides (T0), estão apresentados na Tab. 01. Observa-se que, após a de congelação/descongelação, os espermatozoides apresentaram elevado percentual de atividade mitocondrial, além de manter uma boa integridade acrossomal. No tempo zero, não foram observadas diferenças no percentual de motilidade espermática nos diferentes métodos de incubação aos quais os espermatozoides descongelados foram submetidos.

Tabela 01: Avaliação de integridade estrutural de espermatozoides ovinos pós-descongelação, no tempo zero.

Características avaliadas (%)	(X±DP)	CV
Integridade de membrana plasmática	40,0±0,35	0,03354
Integridade acrossomal	90,2±1,81	0,02015
Atividade mitocondrial	87,5±1,25	0,01433

Os resultados do teste de termorresistência, nos diferentes métodos de incubação sobre os espermatozoides descongelados, estão apresentados nas Fig. 01 e 02. Não foi observada diferença na motilidade espermática ao longo do TTR, quando comparados os espermatozoides que foram incubados em BM aos incubados em PA, durante o período de 90 minutos do TTR ($p>0,05$).

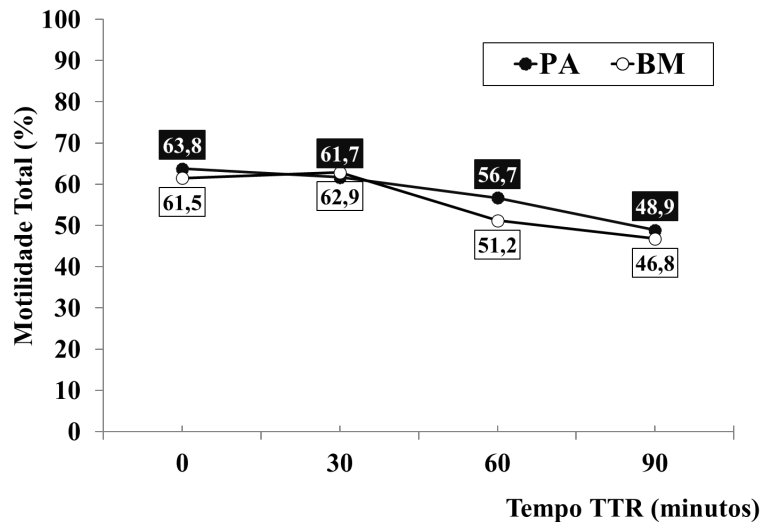


Figura 01: Motilidade total de espermatozoides incubados, durante 90 minutos (TTR) a 37 °C, em banho-maria (BM) e placa aquecedora (PA), após descongelação.

Após a etapa de descongelação das amostras seminais, para posteriores avaliações *in vitro*, elas foram incubadas em banho-maria a 37 °C, para manter a atividade da célula espermática após a descongelação. No entanto, esta etapa de incubação tem sua praticidade operacional muitas vezes questionada, em termos de segurança das amostras, quando utilizada a campo. Dessa forma, este estudo observou a alternativa de incubação para os espermatozoides utilizando a placa aquecedora, sendo verificada a sua eficácia incubando amostras seminais nas mesmas condições que as amostras em banho-maria, após submetê-las ao teste de termorresistência.

Anteriormente à incubação das amostras seminais para o teste de termorresistência, essas foram avaliadas quanto aos danos estruturais após o processo de criopreservação. Desse modo, através dos valores percentuais observados, as amostras seminais utilizadas mantiveram a estrutura do acrossoma intacta, bem como apresentaram alta atividade mitocondrial, evento necessário que contribui para uma maior motilidade espermática (SOUZA *et al.*, 2016; BORGES *et al.*, 2020). No entanto, em relação ao baixo valor percentual observado para integridade da membrana plasmática, esse pode ser atribuído às injúrias causadas à membrana plasmática pela formação de cristais de gelo durante o processo de criopreservação, uma vez que as demais estruturas apresentaram-se íntegras (BITTENCOURT *et al.*, 2013; ARANDO *et al.*, 2017 e 2019). A integridade de membrana plasmática se correlaciona moderadamente com a motilidade espermática (DIAS *et al.*, 2015), dessa forma, observou-se valores aproximados entre as variáveis motilidade progressiva

espermática e percentual de integridade de membrana plasmática de espermatozoides, no tempo zero.

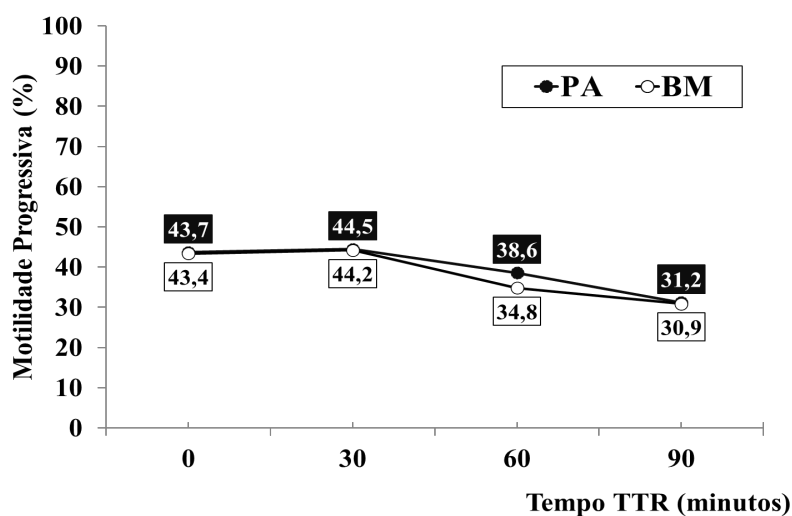


Figura 02: Motilidade progressiva de espermatozoides incubados, durante 90 minutos (TTR) a 37 °C, em banho-maria (BM) e placa aquecedora (PA), após descongelação.

Durante a avaliação dos espermatozoides incubados pelo teste de termorresistência, não foi observada diferença na motilidade espermática entre os métodos de incubação. Entretanto, pode-se observar que, durante os primeiros 30 minutos de incubação, em ambos os métodos a motilidade espermática permaneceu constante, porém, após o período de 30 minutos de incubação, a motilidade espermática iniciou uma redução no seu percentual, sendo observada até o tempo de 90 minutos, nas duas formas de incubação. Observou-se uma redução da motilidade espermática, do tempo 0 até os 90 minutos de incubação, de 23,3% e 23,9% para o sêmen incubado em placa aquecedora e banho-maria, respectivamente, representando um bom parâmetro para o sêmen ovino descongelado (MARTINEZ *et al.*, 2018). Da mesma forma, Silva *et al.* (2018) observaram decréscimo na motilidade, a partir de 60 minutos de incubação utilizando placa aquecedora.

Essa redução na motilidade total e progressiva, observada nas amostras seminais durante o teste de termorresistência, pode ser atribuída ao declínio no metabolismo de energia dos espermatozoides. Acredita-se que, quando os espermatozoides são submetidos a um longo período de incubação, possa ocorrer um déficit de energia pela elevação do metabolismo celular e uma rápida utilização dos constituintes do diluente (SOUZA *et al.*, 2018). Esse fato implica em danos diretos às organelas envolvidas na movimentação espermática, como a mitocôndria, prejudicando a atividade da cadeia de transporte de elétrons e, conseqüentemente, provocando a redução na motilidade (DU, 2009). No entanto, esse teste avalia a capacidade de sobrevivência das células espermáticas a uma temperatura similar àquela do trato genital da fêmea (37 a 38 °C), constituindo um parâmetro importante para o sêmen criopreservado (LIMA *et al.*, 2010; MARTINEZ *et al.*, 2018).

Os resultados apresentados neste trabalho revelaram o sêmen com valores de motilidade espermática superiores a 30%, estando acima do mínimo exigido pelo CBRA (CBRA, 2013), inferindo, assim, uma boa capacidade de fertilização. Dessa forma, a

similaridade nos resultados obtidos demonstra que a placa aquecedora pode ser utilizada como forma de incubação de amostras seminais para o teste de termorresistência.

CONCLUSÕES

Em conclusão, este estudo demonstrou que a placa aquecedora pode ser utilizada como sistema de incubação dos espermatozoides de carneiros, em substituição ao banho-maria, reduzindo, assim, os riscos acidentais com água nas amostras.

REFERÊNCIAS

- ARANDO, A.; GONZÁLEZ, A.; DELGADO, J.V.; ARREBOLA, F.A.; PÉREZ-MARÍN, C.C. Storage temperature and sucrose concentrations affect ram sperm quality after vitrification. *Animal Reproduction Science*, v.181, n1, p.175-185, 2017.
- ARANDO, A.; DELGADO, J.V.; ARREBOLA, F.A.; LEÓN, J.M.; ALCALÁ, C.J.; PÉREZ-MARÍN, C.C. Vitrification induces critical subcellular damages in ram spermatozoa. *Cryobiology*, v.87, p.52-59, 2019. doi: 10.1016/j.cryobiol.2019.02.005. Epub 2019 Mar 1.
- BERGSTEIN-GALAN, T.G.; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.E.; BICUDO, S.D. Espermatozoides epididimários: refrigeração e criopreservação. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.41, n.3, p.659-664, 2017.
- BITTENCOURT, R.F.; OBA, E.; RIBEIRO FILHO, A.L.; CHALHOUB, M.; AZEVEDO, H.C.; BICUDO, S.D. Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: diluidores e crioprotetores. *Ciência Animal Brasileira*, v.14, n.4, p.522-536, 2013.
- BORGES, M.S.; TEIXEIRA, A.C.S.; DELL'AQUA, C.P.F.; CONTI, L.M.; BORN, J.L.B.; MONTEIRO, F.M.; PEIXOTO JÚNIOR, K.C.; CRESPILO, A.M. Cinética e integridade de espermatozoides caprinos criopreservados utilizando Red Cushion® como estratégia de proteção espermática durante a centrifugação do sêmen. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.44, n.1, p.32-38, 2020.
- CÂMARA, T.S.; NUNES, T.G.P.; TONIOLLI, R. Diluentes seminais para pequenos ruminantes, *Revista Ciência Animal*, v.28, n.2, p.67-83, 2018.
- CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3ª ed., Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2013. 104p.
- DIAS, J.C.O.; SANTOS, M.C.R.; PENITENTE FILHO, J.M.; OLIVEIRA, G.D.; MENDES, V.R.A.; MANCIO, A.B. Características do sêmen caprino descongelado após a adição de ringer lactato, citrato de sódio e solução tris. *Ciência Animal Brasileira*, v.16, n.2, p.243-250, 2015.
- DORADO, J.; RODRIGUEZ, I., HIDALGO, M. Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two based extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology*, v.68, n.2, p.168-177, 2007.

DU, L. Antioxidation of melatonin on boar semen preservation. *Jiangsu, Journal of Agricultural Science*, v.25, n.3, p.315–319 2009.

FANG, Y.; BLAIR, H.; ZHONG, R.; SUN, H.; ZHOU, D. Optimizing the freezing rate for ovine semen cryopreservation: Phospholipid profiles and functions of the plasma membrane and quality and fertilization of spermatozoa. *Small Ruminant Research*, v.139, n.1, p.46-51, 2016.

HOLT, W.V.; MORRIS, G.J.; COULSON, G.; NORTHM, R.D. Direct observation of cold-shock effects in ram spermatozoa with the use of a programmable cryomicroscope. *Journal of Experimental Zoology*, v.246, n.3, p.305-314, 1988.

KARAGEORGIU, M.A.; TSOUSIS, G.; BOSCOS, C.M.; TZIKA, E.D.; TASSIS, P.D.; TSAKMAKIDIS, I.A. A comparative study of boar semen extenders with different proposed preservation times and their effect on semen quality and fertility. *Acta Veterinária Brunensis*, v.85, n.1, p.23-31, 2016.

KÖPPEN-GEIGER, P.M.C.; FINLAYSON, B.L.; MCMAHON, T.A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology Earth System Science*, v.11, n.5, p.1633-1644, 2007.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, v.62, n.1-3, p.113-141, 2000.

LIMA, L.F.; MOURA, P.; PASSOS, P.I.B.; LEAL, D.R. Influência de sistemas de refrigeração sobre a qualidade do sêmen ovino criopreservado em palhetas. *Ciência Animal Brasileira*, v.11, n.4, p.835-844, 2010.

MARTINEZ, A.C.; PINTO NETO, A.; PEREIRA JÚNIOR, C.M.; ALMEIDA, A.R. G.; RIBEIRO, R.N.; BECKER, B.G.; OLIVEIRA, W. Resfriamento pré-congelação e viabilidade seminal de carneiros. *Scientific Electronic Archives*, v.11, n.6, p.56-60, 2018.

NRC. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. National Requirement Council. 1^a ed., National Academy of Science, Washintgton, DC, 2007. 347p.

NUNES, T.G.P; GUIMARÃES, D.B.; COSTA, J.M.S.; SILVA, H.V.R.; DANTAS, R.A.A.; TONIOLLI, R. Uso do extrato de Aloe vera na criopreservação do sêmen suíno. *Revista Ciência Animal*, v.29, n.2, p.22-35, 2019.

POPE, C.E., ZHANG, Y.Z., DRESSER, B.L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v.22, n.1, p.87-95, 1991.

SANTOS, M.A.M.; GRADELA, A.; MORAES, E.A.; SOUZA, W.L.; ALVES, N.G.; COSTA, J.M.S.; MATOS, W.C.G. Características do sêmen a fresco e descongelado de garanhões da raça Nordestina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.35. n.11, p.925-932, 2015.

SAS. System for windows (Statistical analysis system), versão 9.2. Cary, USA: SAS Institute Inc, 2002-2008.

SILVA, S.V. Criopreservação de Sêmen Ovino. Viçosa, AL, 2018. In: Semana de Medicina Veterinária-SEMVET, 5, 2018. Anais... Viçosa: UFAL, v.1, 9p., 2018.

SILVA, M.R.; OLIVEIRA, F.G.; SANTOS, C.M.; BRANCO, M.A.C.; SOUSA JÚNIOR, A.; COSTA, I.R.; SILVA, J.H.L.; BRANCO, Y.N.T.C.C. Longevidade do sêmen ovino criopreservado em diluidor trisgema supelmentado com ácido linoléico conjugado (CLA). Goiânia, GO, 2018. In: Congresso Brasileiro de Zootecnia, 28, 2018. Anais... Goiânia: SBZ, v.28, 5p., 2018.

SOUZA, W.L.; COSTA, J.M.S.; MORAES, E.A.; COELHO, V.G.; MAGALHAES, L.M.V.; LIMA, D.I.B. Efeito da dimetilformamida associada ou não ao glicerol sobre a longevidade espermática de caprinos após o resfriamento e descongelamento. Ciência Veterinária nos Trópicos, v.18, n.2, p.337-339, 2015.

SOUZA, W.L.; MORAES, E.A.; COSTA, J.M.S.; SOUSA, P.H.F.; LOPES JUNIOR, E.S.; OLIVEIRA, R.P.; TONIOLLI, R. Efeito de diferentes concentrações de melatonina em espermatozoides de carneiros sobre estresse oxidativo após criopreservação. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.36, n.7, p.657-664, 2016.

SOUZA, W.L.; MORAES, E.A.; TONIOLLI, R. Antioxidantes e crioprotetores na criopreservação do sêmen de ovinos. Nutrime, v.15, n.1, p.8051-8064, 2018.