ISSN: 2674-9270
Volume. 7, n. 2, ago./dez. 2025

ARTIGO

Recital
Revista de Educação, Ciência e Tecnologia de Almenara/MG.

Efeito do tempo de equilíbrio no sêmen ovino sobre sua congelabilidade

Fernanda Cristine Figueiredo Fernandes
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais
E-mail: nandah_crisvet@hotmail.com

Natan Dias de Oliveira
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais
E-mail: ndias404@gmail.com

Anne Karoline Mendes da Silva
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais
E-mail: annemendes300@gmail.com

Júlio César Oliveira Dias
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais
E-mail: julio.dias@ifnmg.edu.br

DOI: *https://doi.org/10.46636/recital.v7i2.296*

Recebido: *01 Set. 2022*

Aceito*: 24 Nov. 2025*

Como citar este artigo: FERNANDES, Fernanda Cristine Figueiredo; DIAS, Júlio César Oliveira; OLIVEIRA, Natan Dias de; SILVA, Anne Karoline Mendes da. Efeito do tempo de equilíbrio no sêmen ovino sobre sua congelabilidade. **Recital - Revista de Educação, Ciência e Tecnologia de Almenara/MG**, v. 7, n. 2, p. 401–411, 2025. DOI: 10.46636/recital.v7i2.296. Disponível em: https://recital.almenara.ifnmg.edu.br/recital/article/view/296.

Está obra está licenciada sobre uma Creative Commons Attribution 4.0 International License. Nenhuma parte desta revista poderá ser reproduzida ou transmitida, para propósitos comerciais, sem permissão por escrito. Para outros propósitos, a reprodução deve ser devidamente referenciada. Os conceitos emitidos em artigos assinados são de responsabilidade exclusiva de seus autores.

Efeito do tempo de equilíbrio no sêmen ovino sobre sua congelabilidade

RESUMO

A criopreservação de sêmen é uma importante biotécnica reprodutiva, tendo em vista que promove a conservação do germoplasma masculino por tempo indeterminado. O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes tempos de resfriamento pré-congelamento na viabilidade espermática do sêmen descongelado de ovinos. Foram realizadas vinte e quatro coletas de sêmen com o auxílio de eletroejaculador, em três carneiros sadios, da raça Santa Inês, com idade média de três anos, com fertilidade comprovada por monta natural e exame andrológico. As características físicas (movimento de massa, motilidade, vigor, defeitos maiores e totais) do ejaculado fresco e, após descongelado, foram avaliadas. As amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 ml e, em seguida, mantidas em geladeira a 5 ºC e divididas em seis tratamentos, conforme os tempos de resfriamento pré-congelamento: uma, duas, três quatro, cinco e seis horas. Após o tempo de equilíbrio, foi realizado o processo de congelação em vapor de nitrogênio líquido por vinte minutos, seguido de imersão em nitrogênio. Os resultados das análises demonstraram diferenças significativas após o descongelamento ($P < 0,05$), sendo considerado o período de resfriamento pré-congelamento de duas horas, a 5 ºC, o mais indicado para congelamento de sêmen ovino.

Palavras-chave: Criopreservação. Ejaculado. Espermatozoide. Reprodução. Ovino.

Effect of equilibrium time in sheep semen on its freezability

ABSTRACT

Semen cryopreservation is an important reproductive biotechnique, as it promotes the conservation of male germplasm indefinitely. The objective of this study was to evaluate different pre-freezing cooling times on the sperm viability of thawed sheep semen. Twenty-four semen collections were performed using an electroejaculator on three healthy Santa Inês rams, with an average age of three years, whose fertility was confirmed by natural mating and andrological examination. The physical characteristics (mass movement, motility, vigor, major and total defects) of the fresh ejaculate and after thawing were evaluated. The samples were packaged in 0.25 ml straws and then kept refrigerated at 5 °C and divided into six treatments, according to the pre-freezing cooling times: one, two, three, four, five, and six hours. After the equilibration time, the freezing process was carried out in liquid nitrogen vapor for twenty minutes, followed by immersion in nitrogen. The results of the analyses showed significant differences after thawing ($P < 0.05$), with the pre-freezing cooling period of two hours at 5 ºC being considered the most suitable for freezing ovine semen.

Keywords: Cryopreservation. Ejaculate. Sperm. Reproduction. Sheep.

INTRODUÇÃO

O congelamento de sêmen em nitrogênio líquido (-196 °C) permite o armazenamento das células espermáticas por longos períodos com o objetivo de comercializar material genético de excelência, bem como preservar a genética de raças nativas sob risco de extinção. O sêmen criopreservado pode ser utilizado em outras biotecnologias de reprodução como a produção de embriões *in vitro* (PIV), injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) e, principalmente, a inseminação artificial (IA) (Leboeuf; Restall; Salamon, 2000).

No entanto, o processo de criopreservação (refrigeração e congelação) pode ser deletério às células reprodutivas. Quando o sêmen é exposto a baixas temperaturas, ocorrem diversas alterações espermáticas, como modificações estruturais nas membranas plasmáticas dos espermatozoides, variações osmóticas e formação de cristais de gelo intra e extracelular. Essas alterações podem ser reduzidas, utilizando-se curvas de congelamento apropriadas a cada espécie, associadas à adição de diluentes que contenham substâncias crioprotetoras, capazes de proteger efetivamente os espermatozoides (Oliveira, 2016).

Antes do processo de congelamento (-196 °C) em nitrogênio líquido, o sêmen deve permanecer refrigerado a 5 ºC por, no mínimo, uma hora, a fim de propiciar o equilíbrio osmótico entre os meios intra e extracelular. Tal período, denominado “tempo de equilíbrio”, é necessário tanto para favorecer a interação dos espermatozoides com o diluente, criando assim, maior resistência aos eventuais danos provocados pela criopreservação; quanto para evitar a formação de cristais de gelo, o que inviabilizaria o uso do sêmen (Bittencourt *et al*., 2006).

Na refrigeração, os espermatozoides são submetidos a baixas temperaturas, induzindo reversivelmente o metabolismo celular, o que mantém a viabilidade celular espermática por até quarenta e oito horas. Esse procedimento, além de prático, simples e de baixo custo, mantém a concentração espermática e permite a obtenção de mais doses por ejaculado (Palhão *et al*., 2006). Não obstante, a viabilidade do sêmen submetido a esse modo de conservação é limitada a horas ou dias, além de apresentar diminuição na qualidade do ejaculado e dos diluentes empregados (Severo, 2009).

Consoante Yániz *et al. (*2005) e Druart *et al.* (2009), a exposição brusca, em temperaturas baixas, faz com que o sêmen passe rapidamente do estado fluido para o gelificado quando o material atinge temperaturas de 20 e 5 ºC. O sêmen, ao ser exposto, bruscamente, a temperaturas baixas, ocorre uma reação na membrana do espermatozoide, passando do estado fluido para o gelificado rapidamente entre as temperaturas de 20 e 5 ºC. Isso diminui a motilidade das células e a atividade metabólica, além de aumentar a permeabilidade da membrana plasmática; elevando, assim, o número de espermatozoides com movimentos circulares e lesões acrossômicas pós-descongelação.

A cada redução de 10 ºC na temperatura seminal, o metabolismo espermático diminui em cerca de 50%, sendo necessários apenas 10% de atividade metabólica para a manutenção da sobrevivência do espermatozoide em sêmen resfriado. Nos caprinos, o sêmen, mantido à temperatura de 4 ºC, apresenta qualidade superior se comparado ao mesmo material submetido a congelamento (Gonçalves; Figueiredo; Freitas, 2001).

Um dos constituintes presentes na membrana celular dos espermatozoides é o colesterol, que auxilia na refrigeração. Assim, quanto maior a relação dessa substância com as enzimas fosfolipídicas, maior será a resistência da célula quando submetida ao processo (Henry; Echeverri, 2013).

É importante ressaltar que inúmeros métodos podem ser utilizados com a finalidade de promover o declive de temperatura desde que não provoquem oscilações bruscas (Medeiros *et al.,* 2002). Trabalhos realizados por Rodello *et al*. (2006) e Moscardini *et al*. (2014) citam aparelhos eficientes para refrigeração de sêmen, tais como geladeira, caixa térmica e equipamentos automatizados. Segundo os autores, esses equipamentos mantêm os parâmetros de qualidade dentro da faixa desejável. Em uma das técnicas utilizadas, recomenda-se que o sêmen diluído, inicialmente, na temperatura de 30 ºC, seja refrigerado em geladeira ou caixa térmica até atingir 5 ºC. Nessa perspectiva, Neves *et al*. (2008), asseguram que tal processo deve ocorrer de forma gradativa, em um período de duas ou três horas, a fim de se evitar oscilações súbitas de temperatura.

Outra forma de refrigeração é manter o material em geladeira por no mínimo 45 minutos dentro de um tubo, inserido em um béquer ou copo contendo água ou álcool etílico até atingir uma temperatura de 4 a 5 ºC (Gonçalves; Figueiredo; Freitas, 2001). No entanto, de forma geral, a técnica de refrigeração mais utilizada assegura a viabilidade seminal por até quarenta e oito horas e consiste na conservação em geladeira à temperatura de 5º C, alcançada no decorrer de uma hora (Aisen, 2008).

Dada a variabilidade de tempos ideais de resfriamento recomendados pela literatura, este trabalho teve como objetivos verificar a influência do tempo de equilíbrio na manutenção da viabilidade espermática do sêmen ovino após o processo de congelamento-descongelamento, bem como colaborar com o desenvolvimento de um protocolo de criopreservação.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Setor de Ovinocultura do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais – *Campus* Salinas, situado a 513 metros de altitude, Latitude: 16° 8' 36'' Sul, Longitude: 42° 18' 11'' Oeste. Três carneiros da raça Santa Inês, clinicamente sadios, com idade média de três anos e com fertilidade comprovada por monta natural, foram confinados em apriscos individuais, mantidos sob iluminação natural, sem a implementação de luz artificial, alimentados com volumoso, composto de silagem de milho, concentrado proteico e energético, bem como sal mineral e água *ad libitum*, atendendo às exigências nutricionais da categoria. Antes do início do período experimental, os animais passaram por avaliação física geral e exame andrológico, conforme preconizado pelo Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

Foram realizadas oito coletas em cada ovino (vinte e quatro coletas no total), no período da manhã, utilizando eletroejaculador e tubo de centrífuga graduado de plástico (tubo tipo Falcon® – 15 ml), revestido com papel alumínio. Após o procedimento, o tubo foi encaminhado ao Laboratório de Reprodução Animal do Hospital Veterinário do IFNMG – *Campus* Salinas, onde permaneceu em temperatura ambiente com o diluente de congelamento Botubov® (Botupharma), o qual foi retirado do banho-maria a 37 °C. Todos os materiais utilizados foram previamente aquecidos em placa aquecedora à temperatura de 37 °C.

O movimento de massa foi avaliado por meio da deposição de uma gota de sêmen (10 µL) em uma lâmina, observado em microscópio óptico com contraste de fase (NO217B®), no aumento de 100X, para posterior classificação em uma escala de 0 a 5, admitindo-se zero como ausência deste parâmetro e cinco como o valor máximo. Em uma lâmina escavada,

foram homogeneizados 10 µL do sêmen fresco e 100 µL do diluente Botubov®, como também retirada uma alíquota de 10 µL para realizar a avaliação da motilidade progressiva e do vigor. A observação foi feita em microscópio óptico com contraste de fase, no aumento de 200X. Para a avaliação de motilidade, foram atribuídas notas percentuais de 0 a 100% em relação à quantidade de espermatozoides móveis totais; enquanto para o vigor, os valores de zero a cinco foram atribuídos conforme a intensidade e velocidade de movimentação.

Para a análise morfológica, foram empregados 50 µL de sêmen fresco, inseridos em microtubos tipo eppendorf contendo 1 ml de formol-salino tamponado e reservados para posterior análise em microscopia de contraste de fase (aumento de 1.000X). Foram contabilizadas duzentas células em cada ejaculado, verificando-se os percentuais de defeitos espermáticos segundo os critérios adotados por Blom (1973).

O sêmen fresco foi diluído em meio Botubov®, a uma concentração de $200x10^6$ espermatozoides/ml e acondicionado em unidades de 0,25 ml. Para a fase de resfriamento, as palhetas foram introduzidas em tubos de ensaio de vidro (25 ml) fechados, os quais foram acondicionadas em recipientes plásticos (240 ml), contendo 130 ml de álcool absoluto, mantidos à temperatura ambiente. O conjunto foi levado ao interior de uma geladeira, permanecendo à temperatura de 5 °C. Os períodos variáveis de permanência na geladeira (tempo de equilíbrio) foram de uma a seis horas: uma (Tratamento 1), duas (Tratamento 2), três (Tratamento 3), quatro (Tratamento 4), cinco (Tratamento 5) e seis (Tratamento 6).

Após a fase de equilíbrio, foi realizada a congelação em vapor de nitrogênio líquido, momento em que as palhetas foram colocadas em suporte de inox, por vinte minutos, a uma altura de 5 cm do nitrogênio líquido. Em seguida, as unidades foram imersas em nitrogênio e acondicionadas em seis *canisters*, devidamente identificados, para serem armazenadas em um botijão criogênico (- 196º C).

As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37 °C, por trinta segundos e enxutas em papel toalha. O conteúdo da palheta (0,25 ml) foi transferido para um microtubo tipo *eppendorf* de 1,5 ml, imerso em banho-maria a 37° C e retiradas alíquotas de 10 µL para as análises de motilidade, vigor e morfologia espermática do sêmen descongelado. Esses três parâmetros foram analisados da mesma forma que o sêmen fresco.

As análises descritivas foram realizadas quanto às médias e desvios-padrões para todas as características, bem como verificado a normalidade dos dados obtidos das variáveis por meio dos testes de Wilcoxon ou Dunn, com nível de significância de 0,05.

Todos os procedimentos de manuseio foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais do Instituto Federal do Norte de Minas Gerais (Processo Nº 023/2018) e realizados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CBEA), como também pela legislação vigente.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Na Tabela 1, podem ser observados os valores de referência das características do sêmen fresco de ovino e os valores médios encontrados nas coletas dos animais amostrados.

Tabela 1 – Faixa de referência e valores médios das características do sêmen fresco dos animais coletados.

Características seminais	Valores referência*	Valores médios
Volume	0,5 – 3 ml	0,97 ml
Aspecto	Claro, turvo, leitoso, creme Fino, creme e creme grosso	Leitoso
Cor	Branco ou amarelo-marfim	Amarelo – marfim
Odor	*sui-generis*	*sui generis*
Movimento de massa	≥ 3	2,65
Motilidade progressiva	≥ 80%	78,12
Vigor	≥ 3	2,64
Concentração	1 -3 x 10^9/ml	2,46 x 10^9/ml
Anormalidades espermáticas		
Defeitos maiores	≤10%	6,00
Defeitos totais	≤20%	21,16

* CBRA, 2013.

Segundo Mies Filho (1987), Chemineau *et al.* (1991) e Hafez, Hafez (2004), o aspecto e a coloração do sêmen de ruminantes podem ser influenciados pela concentração de espermatozoides no ejaculado. Neste caso, quanto mais cremoso e branco, maior é a concentração espermática.

Verificou-se que os resultados da análise de sêmen fresco dos ovinos do experimento quanto aos itens volume, aspecto, cor, odor, concentração e defeitos maiores foram equivalentes àqueles presentes na faixa de referência disponibilizada pelo CBRA. Todavia, os valores de movimento de massa, motilidade progressiva e vigor ficaram abaixo do esperado, sendo importante considerar que fatores como raça, idade, estado nutricional, estação do ano, estação reprodutiva, falhas durante o processo de coleta e temperatura podem interferir nas características do ejaculado (Santos *et al*., 2017).

É possível que os resultados auferidos tenham sido influenciados pelo efeito da luz sobre a reprodução ovina (Simplício; Santos, 2005), uma vez que os mesmos foram obtidos durante e depois do fotoperíodo de maior resposta reprodutiva dos animais. Quanto ao percentual de defeitos maiores, Barbosa e Storillo (2016) afirmam que o percentual não pode ultrapassar 5% e que os de defeitos totais devem ser inferiores a 15%. Para Rovai (2017), os valores médios obtidos para defeitos totais foram maiores que o recomendado, colocando em xeque a fertilidade dos animais experimentados.

Na tabela 2, estão descritos os valores médios das características avaliadas após a exposição do sêmen a períodos diferentes de resfriamento e descongelamento.

Tabela 2 - Motilidade progressiva (média ± epm*), vigor espermático (mediana ± primeiro e terceiro quartis) e anormalidades espermáticas (média ± epm) dos ovinos após o descongelamento.

Tratamentos	Motilidade progressiva (%)	Vigor espermático (0-5)	Anormalidades espermáticas	
			Defeitos maiores (n)	Defeitos totais (n)
T1	19,4 ± 2,50 ^{E}	0,5 (0,5 – 1,375) ^{D}	4,54 ± 0,66 ^{A}	23,23 ± 2,10 ^{A}
T2	52,92 ± 3,05 ^{A}	2 (1,5 – 2,0) ^{A}	5,44 ± 0,77 ^{AB}	25,54 ± 1,68 ^{A}
T3	49,17 ± 3,76 ^{A}	1,5 (1,0 -2,0) ^{BC}	4,06 ± 0,60 ^{A}	26,35 ± 1,81 ^{A}
T4	45,20 ± 3,60 ^{B}	1 (1,0 – 1,5) ^{BCD}	5,42 ± 0,66 ^{AB}	30,17 ± 1,97 ^{B}
T5	41,67 ± 3,21 ^{C}	1 (0,5 – 1,375) ^{CD}	6,69 ± 0,73 ^{B}	33,08 ± 1,81 ^{CD}
T6	36,67 ± 2,92 ^{D}	0,5 (0,5 – 1,0) ^{D}	6,42 ± 0,62 ^{B}	34,06 ± 1,83 ^{D}

Letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística (P < 0,05) pelo teste de Wilcoxon (motilidade e anormalidades) ou pelo teste de Dunn (vigor); T1: uma hora na geladeira na fase de equilíbrio; T2: duas horas na geladeira na fase de equilíbrio; T3: três horas na geladeira na fase de equilíbrio; T4: quatro horas na geladeira na fase de equilíbrio; T5: cinco horas na geladeira na fase de equilíbrio; T6: seis horas na geladeira na fase de equilíbrio.

* epm = Erro Padrão da Média

O material submetido ao tratamento 1 experimentou menor período de resfriamento a 5º C e, consequentemente, tornou-se mais vulnerável aos efeitos danosos do choque térmico e osmótico (Bittencourt, 2006), o que poderia explicar as menores médias de motilidade progressiva e de vigor espermático encontradas; equivalente ao tratamento 6 nesse último quesito.

Almeida (2006) e Fürst (2006) alertam que, durante o processo de criopreservação, os espermatozoides são submetidos a diversas condições desfavoráveis que alteram e/ou danificam as membranas plasmáticas antes mesmo de afetar a motilidade e a integridade morfológica, principalmente, quando ocorrem longos períodos de resfriamento. Ademais, no que tange a tratamentos com períodos maiores de resfriamento como o T6, faz-se necessário ponderar que a exposição prolongada à temperatura de 5º C também pode levar ao acúmulo de produtos do metabolismo, sobretudo, radicais livres (espécies reativas de oxigênio – ROS), que diminuem a sobrevivência dos espermatozoides no pós-congelamento (Salamon; Maxwell, 2000; Aisen, 2008).

Ainda no que concerne ao vigor, cumpre destacar que os tratamentos 3, 4, 5 e 6 não atenderam ao padrão estabelecido pelo CBRA (2013), além de demandarem mais tempo de equilíbrio na geladeira, o que é tecnicamente inviável, ao passo que os tratamentos 2 e 3 apresentaram maior viabilidade espermática após o descongelamento, considerando o menor impacto na redução na motilidade e no vigor, em relação ao sêmen fresco. Assim como, após o descongelamento, a motilidade do sêmen ovino deve ser ≥ 30% e o vigor ≥ 2, por conseguinte, somente o tratamento 2 seria classificado como satisfatório.

Das e Rajkonvar (1995) observaram que o sêmen ovino mantido por um tempo de equilíbrio de três horas obteve melhores índices de motilidade (47,4%) pós-descongelação em relação ao sêmen submetido a uma hora de equilíbrio. Tal percentual foi semelhante ao obtido após um período de três horas (49,2%) e inferior ao do melhor tratamento (T2: duas horas – 52,9%) apontado por este trabalho. No entanto, Bittencourt *et al*. (2006), após avaliar diferentes tempos de equilíbrio (1, 2, 3 e 4 horas), concluíram que para criopreservar sêmen

caprino (34,28%, 43,57%, 41,42% e 45,0%, respectivamente), o tempo de quatro horas apresentou melhor resultado.

Outras alterações que ocorreram durante o processo de criopreservação foram a desestabilização e até mesmo ruptura da membrana, provocadas pela transição de estado líquido para gelatinoso. Consequentemente, ocorreu a perda de componentes intracelulares, de ATP e de enzimas metabólicas, provocando morte celular (Janukauskas *et al.* 1999). Segundo Watson (2000), na criopreservação, de 40 a 50% dos espermatozoides, tornam-se inviáveis em decorrência da exposição a diferentes temperaturas e diluentes. Desta feita, trabalhar com ejaculados com qualidade superior permitiria a obtenção de uma concentração satisfatória de células viáveis ao final do processo de congelamento, favorecendo, assim, o incremento da fertilidade dos programas de inseminação artificial.

Em relação às anormalidades espermáticas, em nenhum dos tratamentos, as médias de defeitos maiores foram superiores ao recomendado (≤ 10%) pelo CBRA (2013). Entretanto, os valores médios de defeitos totais foram superiores ao preconizado em todos os tempos registrados, ultrapassando 20%. Mies Filho (1987) e Strom *et al.* (1993) relatam que essas alterações podem ser provocadas pelo choque térmico sofrido durante o processamento do sêmen. Os mesmos autores verificaram que o aumento do tempo de resfriamento afeta, negativamente, a integridade espermática, assim como observado por Almeida (2006) e Fürst (2006).

Diante do exposto, o tratamento 2 pode ser considerado o mais indicado, tanto quanto à viabilidade técnica, visto que demandou duas horas durante o resfriamento a 5º C, como também por ter atendido às exigências do CBRA (2013) em relação aos parâmetros motilidade, vigor e defeitos maiores; além de ter apresentado um dos menores índices de defeitos totais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A refrigeração do sêmen ovino por duas horas, a 5º C, apresentou melhores resultados na preservação da viabilidade espermática após o descongelamento. Esse período permitiu maior motilidade e vigor dos espermatozoides, além de manter os índices de defeitos dentro dos padrões estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Assim, o tempo de duas horas mostrou-se o mais eficiente e, tecnicamente, viável, conciliando boa qualidade seminal com praticidade operacional no processamento do material biológico. Os achados deste trabalho contribuem para o aprimoramento dos protocolos de criopreservação de sêmen ovino, oferecendo subsídios para o aumento da eficiência reprodutiva para programas de melhoramento genético e conservação de raças. Estudos futuros poderão avaliar outros parâmetros fisiológicos e bioquímicos, a fim de aprofundar o entendimento sobre os mecanismos de adaptação espermática durante o resfriamento e congelamento.

REFERÊNCIAS

AISEN, E. G. Processamento e conservação do material seminal. In: AISEN, E. G. **Reprodução ovina e caprina**. 1 ed. São Paulo: MedVet, p. 75-87, 2008.

ALMEIDA, J.L. Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino. 77f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade de

Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, DF, 2006. Disponível em: https://repositorio.unb.br/handle/10482/5069?locale=en.

BARBOSA, D.A.; STORILLO, V.M. **Importância do exame andrológico na escolha do reprodutor**. 2016. Disponível em: https://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/ovinos-ecaprinos/importancia-do-exame-andrologico-na-escolha-do-reprodutor-parte-231183n.aspx.

BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO-FILHO, A. L.; ALVES, S. G. G.; BISCARDE, C. E.; VASCONCELOS, M. F.; OBA, E. O efeito do tempo de equilíbrio sobre a qualidade do sêmen caprino criopreservado. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal.** 7(1): 27-37, 2006. Disponível em: https://repositorio.ufba.br/handle/ri/1900.

BLOM, E. The ultra structure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermiogram. **Nordic Veterinary Medicine**, v.25, p.383–391, 1973. Disponível em: https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=1763319.

CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução animal. **Manual para o exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 3. ed. Belo Horizonte. 2013.

CHEMINEAU, P.; CAGNIE, Y.; GUERIN, Y.; ORGEUR, P.; VALLET, J. C. Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goats. **Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations**; p. 223, 1991. Disponível em: https://hal.science/hal-02852061.

DAS, K. K.; RAJKONWAR, C. K. A study on the characteristics of Beatal buck semen and its freezability. **Journal of Veterinary Physiology and Allied Sciences, Izatnagar**, v. 12, n. 2, p. 6-16, 1993. Disponível em:https://revistas.ufg.br/vet/article/download/7907 /5762?inline=1.

DRUART, X.; COGNIÉ, J.; BARIL, G.; CLÉMENT, F.; DACHEUX, J. L.; GATTI, J.L. *In vivo* imaging of *in situ* motility of fresh and liquid stored ram spermatozoa in the ewe genital tract. **Reproduction**. v.138, p.45-53, 2009. Disponível em: https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/138/1/45.xml.

FÜRST, R. Effect of different times of balance, freezing rates and concentrations espermatics in the fertility of the semen equine. **Tese** (Doutorado em Genética e Melhoramento de Animais Domésticos; Nutrição e Alimentação Animal; Pastagens e Forragicul) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 114 p., 2006. Disponível em: https://locus.ufv.br/items/333388d9-f71d-4b2f-9332-ff0453b6663f.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnica aplicada à reprodução animal.** São Paulo: Varela. cap. 2, 4 e 7, p. 15-23; 57-65; 111-23, 2001.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal.** 7.ed. São Paulo: Manole, 2004.

HENRY, M.; ECHEVERRI, A. M. L. **Andrologia Veterinária Básica**: curso de andrologia veterinária básica. CAED-Universidade Federal de Minas Gerais- UFMG. Belo Horizonte, 2013. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/items/e4314d0b-ed4a-47ec-8b3b-21b2b729590d.

JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SÖDERQUIST, L.; HÅÅRD, M. G. M.; HÅÅRD, M. Ch.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZMARTINEZ, H. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden**. Theriogenology**. v. 52, p. 641-658, 1999. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/12582576_Effect_of_cooling_rates_on_post-

thaw_sperm_motility_membrane_integrity_capacitation_status_and_fertility_of_dairy_bull_semen_used_for_artificial_insemination_in_Sweden.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.113-141, 2000. Disponível em:https://www.academia.edu/27776704/Production_and_storage_of_goat_semen_for_artificial_insemination.

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. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/11581994_Current_status_of_sperm_cryopreservation_Why_isn't_it_better.

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

MOSCARDINI, M. M. S.; MOURA, C.; SOUZA, D.; LOURENÇO, T. T.; ARISTIZÁBAL, V.; VALLEJO, H.; SOUZA, F. F. de Viabilidad de espermatozoides de ovinos en diferentes sistemas de refrigeración. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 21, n. 2, p. 122-126, 2014. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/items/d8fea871-5602-46d0-9439-abe80c77918b.

NEVES J. P.; NUNES, J. F.; MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H.; SALGUEIRO C. C. M.; ALMEIDA, J. L. A. Inseminação artificial em pequenos ruminantes. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2ª ed. São Paulo: Roca Ltda. p.83-103, 2008.

OLIVEIRA, C. T. S. A. M. Criopreservação de sêmen caprino em diferentes concentrações espermáticas associado ou não a melatonina. **Tese** (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2016. Disponível em https://locus.ufv.br/server/api/core/bitstreams/dd550b2f-f665-4c8d-be43-0d8267003dd9/content.

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. Disponível em: https://revistas.ufg.br/vet/article/download/13115/10037?inline=1.

RODELLO, L. Validação de sistema automatizado de refrigeração e congelação de sêmen ovino. 70 f. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu,2006. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/entities/publication/c61cb829-aa76-4bc7-a8f1-d02c3e477b97.

ROVAI, F. M. O. **Caprinocultura e Ovinocultura**. Londrina: Editora e Distribuidora Educacional S.A., 2017.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**. v.37, p.185–249, 1995. Disponível em: https://www.scirp.org/%28S%28351jmbnt-vnsjt1aadkozje%29%29/reference/referencespapers?referenceid=2648442.

SANTOS, J. P. D.; LOPES, L. M.; MIERES, F. C. L.; ROSSATO, J, C.; PIOVESAN, A. D.; TEIXEIRA, B. B. M.; SIMÕES, M. S.; CORADINI, L. de S.; LOPES, M. G. COLETA SEMINAL E AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA ESPERMÁTICA DE UM OVINO. **Projeto de Aperfeiçoamento Teórico e Prático** – Bagé – RS – Brasil, 2017. Disponível em:

http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v41/n1/p491505%20(caprinos).pdf

SEVERO, N. C. Influência da qualidade do sêmen bovino congelad sobre a fertilidade**. A Hora Veterinária,** v. 28, n. 167, p. 36-39, 2009. Disponível em: https://www.revistaespacios.com/a18v39n14/a18v39n14p18.pdf

SIMPLÍCIO, A. A.; SANTOS, D.O. ESTAÇÃO DE MONTA X MERCADO DE CORDEIRO E LEITE (MANEJO REPRODUTIVO). **I Simpósio de Caprinos e Ovinos da Escola de Veterinária da UFMG**, 2005. Disponível em: https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/532480.

STROM, B.; ROTA, A.; LINDE-FORSBERG, C. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation.**Theriogenology**, v. 48, p. 1199-1205, 1993. Disponível em: https://www.scielo.br/j/abmvz /a/mDnHc8CtXFrv7pcrs fz9f9Q /?format=html&lang=pt.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science,** Amsterdam, v. 60-61, p. 481-492, 2000. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/12474590_The_causes_of_reduced_fertility_with_cryopreserved_semen.

YÁNIZ, J.; MARTÍ, J. I.; SILVESTRE, M. A.; FOLCH, J.; SANTOLARIA, P.; ALABART, J. L.; LÓPEZ-GATIUS, F. Effects of solid storage of sheep spermatozoa at 15°C on their survival and penetrating capacity. **Theriogenology,** Stoneham, v. 64, p. 1844-1851, 2005. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/7836537_Effects_of_solid_storage_of_ sheep_sper matozoa_at_15C_on_their_survival_and_penetrating_capacity.

Editores do artigo

Paulo Eduardo Ferreira dos Santos, Jandresson Dias Pires e Mariana Mapelli de Paiva