



VI CONGRESSO PERNAMBUCANO
DE MEDICINA VETERINÁRIA
VII SEMINÁRIO NORDESTINO
DE CAPRINO-OVINOCULTURA

09 a 11 de setembro de 2015, Campus da UFRPE – Dois Irmãos, Recife

TECNOLOGIA DE SÊMEN E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM CAPRINOS E OVINOS

Semen processing and artificial insemination in goats and sheep

Marciane da Silva MAIA¹

Resumo: A inseminação artificial (IA) é a técnica de reprodução assistida, mais antiga e mais utilizada na produção animal. Associada à preservação dos espermatozoides, a inseminação artificial, oferece muitas vantagens aos criadores, uma vez que possibilita acelerar o melhoramento genético do rebanho, controlar as doenças sexualmente transmitidas, bem como, preservar o material genético de raças ameaçadas de extinção. No entanto, nos pequenos ruminantes a técnica é pouco difundida comparada com outras espécies. Isso se deve em parte aos resultados de fertilidade irregulares e geralmente, baixos obtidos com o uso de sêmen congelado. O artigo aborda de maneira sucinta as principais técnicas utilizadas atualmente no processamento do sêmen e na IA em pequenos ruminantes e suas taxas de sucesso.

Palavras-chave: ANTIOXIDANTES, CRIOPRESERVAÇÃO, FERTILIDADE, REFRIGERAÇÃO, PEQUENO RUMINANTE.

Abstract: Artificial insemination (AI) is the oldest and most widely used assisted reproductive technique applied in livestock production. Associated with preservation of sperm, artificial insemination, offers many advantages to farmers, since it allows accelerating the genetic improvement of the herd, control sexually transmitted diseases, as well as preserve of the genetic material of endangered breeds. However, in small ruminants this technique is little used compared to other species. This is due to, in part, to the fertility results irregular and generally low obtained with the use of frozen semen. This paper discusses briefly the main technology currently used in the semen processing and AI in small ruminants and their success rates.

Keywords: ANTIOXIDANT, CRYOPRESERVATION, FERTILITY, COOLING, SMALL RUMINANT.

INTRODUÇÃO

¹ Pesquisadora, Embrapa Semiárido. Email: marciane.maia@embrapa.br

As biotécnicas relacionadas à inseminação artificial evoluíram ao longo dos anos. No início, o sêmen era utilizado *in natura* e apenas fracionado e depositado no fundo da vagina da fêmea, obtendo-se taxas de fertilidade razoável. Surgiu então a necessidade de se aumentar a capacidade fecundante dos reprodutores e de conservar o sêmen por um maior período de tempo. Dando início a uma nova fase - a da utilização de diluentes e da criopreservação do sêmen. O grande avanço na criopreservação do espermatozoide de mamíferos ocorreu com a descoberta do efeito crioprotetor do glicerol nos anos de 1940. A partir daí, o espermatozoide de várias espécies tem sido criopreservado com sucesso. Entretanto, o sucesso da criopreservação de sêmen é apenas parcial, uma vez que cerca da metade dos espermatozoides são destruídos ou danificados pela congelação e descongelação. O processo sofre influência de diversos fatores, entre eles a composição do diluidor, a taxa de diluição e a curva de congelação/dcongelação e no caso do caprino ainda existem as limitações inerentes à espécie.

Apesar das dificuldades relativas ao processamento, a disponibilização de sêmen refrigerado ou congelado de boa qualidade, para uso na inseminação artificial, é um desafio aos pesquisadores da área, uma vez que a IA proporciona muitas vantagens aos criadores, em relação à monta natural. O principal problema para a difusão/adoção da técnica nos pequenos ruminante é a fertilidade obtida após a IA com sêmen congelado, que ainda é aquém da obtida na monta natural. Soma-se a isso a dificuldade de realização da inseminação cervical nas ovelhas.

Em ambas as espécies, os avanços nesta tecnologia têm-se concentrado principalmente na preservação da viabilidade/ capacidade fertilizante dos espermatozóides, melhorando a composição dos diluidores e alterando protocolos de refrigeração e congelação e nas técnicas de avaliação da qualidade espermática, com o objetivo de prever a fertilidade do sêmen. Ao longo do artigo discutiremos as tecnologias atualmente utilizadas no processamento do sêmen e seus efeitos sobre a qualidade espermática, bem como as técnicas de IA aplicadas em caprinos e ovinos e suas taxas de sucesso.

PRESERVAÇÃO DO SÊMEN

Três formas de utilização do sêmen caprino e ovino são adotadas mundialmente: fresco, refrigerado e congelado. O sêmen fresco é preferido, quando o macho está presente no rebanho, e se tem um grande número de fêmeas em estro, natural ou sincronizado, inviabilizando a monta natural. A utilização de sêmen refrigerado é ideal quando o material genético de um macho é compartilhado por um grupo de criadores localizados em uma área relativamente pequena. Em tais casos, o sêmen é armazenado a 15° ou 5°C e utilizado entre 8 e 12 horas após o processamento. No entanto, existem relatos de resultados satisfatórios de fertilidade após IA com sêmen refrigerado por até 24 horas. Por fim, o sêmen é congelado para a preservação em longo prazo, permitindo que ele seja distribuído por uma área mais ampla e usado por tempo indeterminado.

O processamento do sêmen caprino para preservação em baixas temperaturas requer a lavagem, uma vez que enzimas presentes no plasma seminal interagem com a gema de ovo ou o leite presentes no diluidor (ROY, 1957; NUNES et al., 1982) gerando substâncias que inibem a motilidade espermática e induzem a reação acrossomal (NUNES e SALGUEIRO, 2011; PURDY, 2006; CSEH et al., 2012). Alguns estudos mostram que a remoção do plasma seminal é benéfica para a motilidade e integridade das membranas do espermatozoide caprino refrigerado ou criopreservado (SALVADOR et al., 2006; RITAR e SALAMON, 1982). Enquanto outros mostram que a lavagem do sêmen não afeta a viabilidade espermática (PETERSON et al., 2007; VIANA et al., 2006).

Na preservação pelo método da refrigeração os espermatozoides são armazenados a temperaturas baixas o suficiente para deprimir o seu metabolismo (15 ou 5 °C) prolongando assim a sua vida fértil. No entanto, o processo de refrigeração pode afetar a viabilidade celular devido ao efeito prejudicial do choque térmico pelo frio que ocorre entre 30°C e 0° C. A mudança rápida de temperatura, nessa faixa, induz alterações na membrana plasmática e acrossomal, repercutindo na motilidade espermática e na capacidade fecundante do espermatozoide. Este efeito pode ser parcialmente superado pelo resfriamento gradual do sêmen da temperatura ambiente à temperatura de armazenamento e pela suplementação do diluente com gema de ovo (ANEL et al., 2006; SALAMON e MAXWELL 2000; WATSON, 2000).

Segundo Salamon e Maxwell (2000) no sêmen resfriado, os espermatozoides deterioram, com o aumento do tempo de armazenamento independente do diluente, taxa de diluição ou da temperatura. No sêmen caprino, a motilidade espermática declina lentamente nas primeiras 24 horas de refrigeração e a partir daí sofre um declínio rápido (NUNES e SALGUEIRO, 2011; PETERSON et al., 2007; SALVADOR et al, 2006; VIANA et al., 2006). No entanto, nesses estudos a fertilidade após IA cervical variou de 41 a 73%. Embora a fertilidade possa ser mantida durante a refrigeração por várias horas, o armazenamento prolongado reduz a fertilidade dos espermatozoides. No sêmen ovino, a fertilidade após inseminação cervical com sêmen armazenado a 5°C, por 24, 48 e 72 horas foi 45-50%, 25-30% e 15-20%, respectivamente, enquanto a taxa de parição com sêmen fresco foi 65-75% (ANEL et al., 2006). As razões fisiológicas para a deterioração do espermatozoide são o estresse oxidativo extracelular, os efeitos do plasma seminal e produção de radicais livres endógenos (ANEL et al., 2006). Assim, a adição de antioxidantes ao meio de conservação pode ser uma alternativa para melhorar a longevidade do sêmen refrigerado. No sêmen ovino mantido a 5°C por nove dias em meio contendo ou não o antioxidante Resveratrol e sua combinação com vitamina E e Aromex, Sarlós et al. (2002) observaram um declínio na qualidade do sêmen, com o tempo de incubação, independente do tratamento. No entanto, a adição dos antioxidantes prolongou o período de conservação do sêmen, melhorou a motilidade espermática e reduziu o grau de danos celulares. Nas amostras com antioxidante a qualidade do sêmen só deteriorou significativamente a partir do sexto dia de incubação. Maxwell & Stojanov (1996) também observaram efeito benéfico dos

antioxidantes catalase, superóxido dismutase (SOD), citocromo c e glutathione peroxidase na manutenção da motilidade e integridade acrossomal do espermatozóide ovino refrigerado. Nesse estudo, a adição de catalase (800 U/ml) e SOD (200 U/ml) ao diluidor Tris-glicose-gema possibilitou a manutenção da viabilidade espermática por 14 dias, resultando em 33% de fertilidade pós IA por laparoscopia.

A criopreservação possibilita o armazenamento do sêmen por tempo indeterminado, porém, também compromete a fertilidade do espermatozoide. Para reduzir o efeito da crioinjúria é importante usar um diluente, crioprotetor e curvas de congelação/descongelação adequados. Um bom diluente deve suprir as células com uma fonte de energia, proteger contra os danos relacionados à temperatura e manter um ambiente adequado à sobrevivência do espermatozoide (SALAMON e MAXWELL, 2000; PURDY, 2006). Geralmente, os meios de criopreservação de sêmen caprino e ovino incluem um crioprotetor não penetrante (leite ou gema de ovo), um crioprotetor penetrante (glicerol, etilenoglicol ou dimetil sulfóxido), um tampão (Tris ou Test) um ou mais açúcares (glicose, frutose, lactose, rafinose, sacarose ou trealose), um sal (citrato de sódio, ácido cítrico) e antibióticos (penicilina, estreptomicina, gentamicina, etc.).

Os diluentes à base de Tris e leite em pó desnatado são os mais comumente usados para a preservação do sêmen de ambas as espécies (SALAMON e MAXWELL, 2000; PURDY, 2006). Comparando o efeito desses dois diluidores na criopreservação do sêmen caprino Dorado et al. (2007) concluíram que ambos podem ser utilizados, pois mantiveram a viabilidade e capacidade fertilizante do espermatozoide. Já Peterson et al. (2007) relataram que o diluidor a base de TRIS proporcionou maior percentual de espermatozoide vivo com acrossoma intacto após a descongelação que o leite glicosado.

Dentre os crioprotetores, o mais usado é o glicerol, embora o mesmo possa afetar a sobrevivência da célula. Sua adição pode ser feita em uma ou duas etapas, a 32 °C ou 5 °C e em uma concentração final variando de 1-10%. Para o sêmen ovino a adição do glicerol em uma etapa a 30°C é um método amplamente utilizado (SALAMON e MAXWELL, 2000) sem causar prejuízos à qualidade do sêmen. Em nossos estudos com sêmen caprino criopreservado, realizamos a adição do glicerol em uma etapa à temperatura ambiente, com bons resultados. Após a adição do glicerol, independente do método, é necessário que o sêmen permaneça sob refrigeração (2 a 5°C) por um período de tempo que varia de 1 a 3 horas para que ocorra a estabilização.

A adição de antioxidantes ao meio de congelação também tem sido avaliada. No sêmen caprino criopreservado em diluente a base de Tris-Gema de ovo, Maia et al. (2012) avaliaram o efeito de doses crescentes de Resveratrol (0, 4, 6 e 8,0 µg/ml) sobre as características espermáticas pós descongelação e observaram que o antioxidante conferiu maior proteção ao espermatozoide contra a crioinjúria, resultando em efeito benéfico na preservação da motilidade em relação ao controle. Sinha et al. (1996) também observaram um efeito benéfico da glutathione sobre a motilidade, integridade

acrossomal e fertilidade do sêmen congelado, em relação ao controle. No sêmen ovino criopreservado em diluidor Tris-gema aditivado de Catalase, Trolox C e sua combinação Maia et al. (2009) observaram que a adição dos antioxidantes aumentou o percentual de espermatozoides com membrana plasmática íntegra mas não teve efeito sobre a motilidade espermática em relação ao controle. Porém, em situação de estresse oxidativo (MAIA et al., 2010) induzido pela adição de ferro (lipoperoxidação) ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ao meio de incubação, estes mesmos antioxidantes foram eficazes em remover o excesso de ROS (metabólitos reativos do oxigênio- H_2O_2 , O_2^- e OH^-) e manter o equilíbrio do sistema. Podemos presumir que o efeito dos antioxidantes é mais evidenciado quando o sêmen está passando por uma situação de estresse oxidativo (excesso de ROS). Ao avaliarmos o efeito da adição de catalase em amostras de sêmen caprino com alto ($\geq 30\%$) e baixo percentual ($\leq 15\%$) de patologias espermáticas (MAIA et al., 2011) observamos um efeito benéfico do antioxidante sobre a motilidade espermática pós-descongelamento, nas amostras com alto percentual de espermatozoides anormais. Possivelmente estes ejaculados continham excesso de ROS, entre eles o H_2O_2 , e nesse caso a Catalase protegeu as células contra a perda de motilidade. Maia et al. (2014) observaram que o H_2O_2 induz a perda da motilidade do espermatozoide ovino e que a adição de Catalase (2 U/mL) mesmo em baixa concentração é suficiente para neutralizar o seu efeito.

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Em ambas as espécies podem ser utilizadas três técnicas de inseminação: vaginal, cervical (transcervical) e intrauterina (laparoscopia). A inseminação vaginal é uma técnica de fácil execução, onde o sêmen é depositado no fundo da vagina, podendo resultar em taxas de prenhez de acima de 50%. É mais eficaz quando se utiliza sêmen fresco, do que com sêmen refrigerado ou congelado. O volume de sêmen e o número de espermatozoides progressivamente móveis recomendado para o uso são 0,2 mL e 400×10^6 espermatozoides (mínimo), respectivamente (CSEH et al., 2012). Utilizando sêmen fresco diluído, com 200×10^6 spz/dose, Paulenz et al. (2005) observaram que a taxa de prenhez em cabras, após IA vaginal foi de 74,3% e não diferiu daquela obtida na IA com deposição cervical (78%).

Nas cabras, geralmente utiliza-se a *inseminação cervical*. Por esta técnica, a deposição intrauterina do sêmen pode ser conseguida em 50-60% das fêmeas, uma vez que a cérvice caprina é relativamente fácil de atravessar. Embora na IA Cervical o sêmen possa ser depositado no corpo do útero, a deposição cervical cranial produz resultados satisfatórios. Em inseminação cervical, com estro sincronizado, utilizando sêmen diluído em água de coco e mantido a 37 °C, Maia e Santos (2010) obtiveram uma taxa de prenhez de 62,9% quando a deposição foi cervical profunda e 42,4% na deposição intrauterina. Sugerindo que a manipulação excessiva na tentativa de ultrapassar a cérvice pode reduzir a fertilidade. Em cabras nulíparas Houdeau et al. (2008) observaram que quanto mais rápido a IA foi realizada maior foi a taxa de prenhez. Na deposição intracervical rápida (20

segundos) a taxa de prenhez foi 61,0% enquanto que quando a IA foi mais demorada (60 segundos) a taxa de prenhez foi 50,7%. Segundo os autores, a deposição rápida do sêmen limita o reflexo que ativa as contrações uterinas, provocado pela inserção do espéculo e movimentos do aplicador e com isso melhora a fertilidade. Batista et al. (2011) compararam a taxa de prenhez de cabras inseminadas pela via cervical com sêmen fresco e congelado e observaram que aos 35 dias a taxa de prenhez foi significativamente maior (73,3%) utilizando sêmen fresco que com sêmen criopreservado (46,7%).

Nas ovelhas a transposição dos anéis cervicais é dificultada devido à complexidade da cérvix, cujos anéis são dispostos em diferentes planos e posições, obliterando o lúmen da vagina ao útero (HALBERT et al., 1990; ANEL et al., 2006). Portanto, nessa espécie as técnicas mais utilizadas são a inseminação intrauterina por laparoscopia ou a vaginal/ cervical, onde o sêmen é depositado no óstio cervical. Quando o sêmen é depositado na entrada da cérvix, a taxa de concepção varia de 30 a 40% dependendo do tipo de sêmen utilizado. Para superar essa limitação e possibilitar a realização da inseminação transcervical (IATC), algumas alternativas têm sido testadas, como: uso de ocitocina para promover o relaxamento da cérvix e o tracionamento da cérvix até a abertura da vulva. A IATC com tracionamento cervical foi desenvolvida no Canadá e denominada Sistema Guelph de IA transcervical (HALBERT et al., 1990). No estudo de Halbert et al. (1990) a transposição cervical completa foi obtida em 54% das ovelhas, resultando em 82% de parição. Posteriormente, Buckrell et al. (1994) validaram a técnica inseminando 2060 ovelhas obtendo 88% de transposição cervical e 33% de parição. O otimismo em relação à IATC deve-se ao sucesso obtido na transposição cervical pelo método Guelph e ao conhecimento de que a deposição intrauterina do sêmen aumentaria o número de espermatozoides no oviduto aumentando as chances de fecundação (ROBINSON et al., 2011). No entanto, diversos estudos realizados pelo método de IATC não conseguiram obter o mesmo nível de sucesso. Segundo Robinson et al. (2011) o sucesso na transposição cervical e na fertilidade pós IATC pode ser afetado por diversos fatores entre eles: a experiência do operador, raça e idade da fêmea (efeito sobre a morfologia da cérvix); época do ano (quando ocorre estacionalidade reprodutiva); intervalo pós parto; muco cervical (quantidade e composição) e atividade da cérvix (contrações musculares). Em ovelhas Santa Inês inseminadas pela técnica de IATC com sêmen fresco, Silva et al. (2005) obtiveram uma taxa de prenhez de 59,25% sendo que 46,9% das inseminações foram intrauterinas. Já Isobe et al. (2006) utilizando a mesma técnica e sêmen congelado obtiveram taxa de parição de 8,4% com 58,3% de inseminações intrauterinas, demonstrando a baixa eficiência da técnica usando sêmen congelado. Analisando os resultados de diferentes estudos concordamos com Traldi (2006) ao afirmar que a técnica da tração cervical não melhora os índices de fertilidade do sêmen fresco ou congelado, mesmo quando depositado intrauterinamente. Para Robinson et al. (2011) a técnica transcervical *per se* parece reduzir a taxa de fertilização.

A IATC também é realizada em cabras com um alto índice de transposição cervical e melhores resultados de fertilidade do que nas ovelhas. Utilizando essa técnica Siqueira (2006) obteve de 98,2% de transposição cervical e Nogueira et al. (2011) em cabras leiteiras obtiveram 100% de transposição cervical e uma taxa de prenhez de 82,2% na inseminação com sêmen fresco diluído. Fonseca et al. (2011) utilizando a Técnica Embrapa de IATC, na qual a fêmea é mantida em estação quadrupedal, com pinçamento, mas sem tração cervical, relatam 100% de transposição total da cérvix, nas fêmeas plurípara e 68,75% nas nulíparas, com uma taxa de gestação de 62,5%.

A *inseminação intrauterina* laparoscópica foi desenvolvida para superar muitas das dificuldades da inseminação intravaginal ou cervical, sendo a técnica preferencialmente recomendada para as ovelhas. O número de espermatozoides necessários para cada inseminação é mais baixo e o volume inseminante é proporcionalmente maior, permitindo taxas de diluição mais adequadas e, por conseguinte, uma melhor preservação / proteção dos espermatozoides durante a criopreservação. Como consequência, a inseminação intrauterina laparoscópica melhora as taxas de prenhez obtidas com sêmen congelado. As taxas de concepção com sêmen congelado variam de 60-80% e são mais elevadas do que na inseminação intracervical e semelhantes as da monta natural após sincronização do estro. Em ambas as espécies, o número mínimo de espermatozoides no por dose inseminante é de 20×10^6 e recomenda-se inseminar metade da dose total de sêmen na região central de cada trompa uterina sem levar em conta o local de ovulação (CSEH et al., 2012).

O momento ideal da inseminação, na cabra é entre 43 e 46 h após a retirada dos implantes de progesterona (Cseh et al., 2012). Na ovelha a IA laparoscópica com sêmen congelado pode ser feita $\pm 55h$ após a retirada do pessário nas fêmeas adultas e entre 34 a 68h nas borregas (TRALDI, 2006).

As desvantagens incluem a exigência de equipamento laparoscópico sofisticado, realização de cirurgia invasiva e necessidade de maior conhecimento técnico para realizar o procedimento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inseminação artificial pode dar uma grande contribuição ao desenvolvimento da caprino-ovinocultura brasileira uma vez que propicia a disseminação de genética de alto valor favorecendo o melhoramento genético rápido. Os principais beneficiados seriam os pequenos produtores, que não têm acesso a animais geneticamente superiores devido ao alto custo de aquisição dos mesmos. No entanto, o sucesso da técnica depende, entre outros fatores, da qualidade do sêmen e da técnica de inseminação utilizada. Embora o conhecimento sobre a fisiologia espermática e os métodos de conservação do sêmen a baixas temperaturas tenham tido um grande avanço, reduzindo os efeitos danosos do processamento sobre a viabilidade e fertilidade do espermatozoide, a inseminação cervical em ovelhas ainda exige esforço. Tornar a cérvix uma rota para a inseminação intrauterina na ovelha é o grande desafio para os pesquisadores da área.

REFERÊNCIAS

- ANEL, L.; ALVAREZ, M.; MARTINEZ-PASTOR, F. et al. Improvement Strategies in Ovine Artificial Insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41 (Suppl. 2), p. 30–42, 2006.
- BATISTA, M.; NIÑO, T.; SANTANA, M. et al. Influence of the Preservation Temperature (37, 20, 4, -196 °C) and the Mixing of Semen over Sperm Quality of Majorera Bucks. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 281–288, 2011.
- BUCKRELL BC.; BUSCHBECK C.; GARTLEY CJ., et al. Further development of a transcervical technique for artificial insemination in sheep using previously frozen semen. **Theriogenology**, v. 42, p.601–611, 1994.
- 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.
- DORADO, J.; RODRÍGUEZ, I.; HIDALGO, M. Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. **Theriogenology**, v. 68, p.168–177, 2007.
- FONSECA, J.F; ALVIM, G.P.; LOBO, A.M.B.O. et al. **Técnica Embrapa de inseminação artificial transcervical em caprinos por meio de fixação cervical**. Sobral, CE: Embrapa-CNPC, 2011. 7p. (Embrapa. Circular Técnica *on line*, 43).
- HALBERT, G.W., DOBSON, H., WALTON, J.S. et al. A technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. **Theriogenology**, v.33, p. 993–1010, 1990.
- HOUDEAU, E.; FURSTOSS, V.; FORGERIT, Y. et al. Short-duration insemination with frozen semen increases fertility rate in nulliparous dairy goats. **Animal**, v.2, n.10, p.1496–1500, 2008.
- ISOBE, F.R; SILVA, J.C.B da; SEVERO, N. et al. Inseminação artificial com sêmen congelado em ovinos, por via trans-cervical. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO DO DEP. DE REPROD. ANIMAL, 1, Pirassununga, 2006. **Anais...** São Paulo: USP, 2006. Disponível em: <https://uspdigital.usp.br/siicusp/siicCDOnlineListaEdicao.jsp>. Acesso em: 14/06/2015
- MAIA, M. da S.; BICUDO, S.D; AZEVEDO, H.C. et al. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. **Small Ruminant Research**, v.85, p. 85–90. 2009.
- MAIA, M. da S.; BICUDO, S.D; SICHERLE, C.C. et al. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v. 122, p. 118–123, 2010.
- MAIA, M. S.; SANTOS, L. P. Taxa de prenhez em cabras após a inseminação artificial com sêmen fresco. **Revista Eletrônica Centauro**, v.1, n.1, p.10-18, 2010. Disponível em: http://www.crmvrn.org.br/crmv/arquivos/taxa_de_prenhez_em_cabras_apos_a_inseminacao_artificial_com_semen_fresco.pdf

- MAIA, M. da S.; MEDEIROS, I. M. de; SILVA, J. V. C. da. Associação entre patologia espermática e perda da motilidade do espermatozoide caprino congelado na presença de catalase. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE - SINCORTE, 5, João Pessoa, 2011. **Anais...** João Pessoa: EMEPA, 2011. (CD ROM)
- MAIA, M. da S.; MEDEIROS, I. M. de; LIMA, C. A. C. et al. Efeito da adição de antioxidante ao meio de congelamento sobre a motilidade do espermatozoide caprino após a descongelamento. In: CONGRESSO NORTE NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CONERA), 6, Fortaleza, 2012. **Ciência Animal**. Fortaleza: UECE, 2012. v.22, n.1, p.345-348.
- MAIA, M.S.; BICUDO, S.D.; RODELLO, L. Effect of hydrogen peroxide on thawed ovine sperm motility. **Animal Reproduction**, v.11, n.2, p.119-123, 2014
- MAXWELL, W.M.C.; STOJANOV, T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. **Reproduction Fertility and Development**, v.8, p.1013-1020, 1996.
- NOGUEIRA, D.M.; LOPES JÚNIOR, E.S.; PEIXOTO, R.M. et al. Using the same CIDR up to three times for estrus synchronization and artificial insemination in dairy goats. **Acta Scientiarum. Animal Science**, v.33, n.3, p.321-325, 2011
- NUNES, J.F.; CORTEEL, J.M.; COMBARNOUS, Y.; BARIL, G. Rôle du plasma séminal dans la survie in vitro des spermatozoïdes de bouc. **Reproduction, nutrition, development**, v.22, p. 611-620, 1982.
- NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M. Strategies to improve the reproductive efficiency of goats in Brazil. **Small Ruminant Research**, v.98, p.176-184, 2011.
- PAULENZ, H.; SÖDERQUIST, L.; ADNØY, T. et al. Effect of cervical and vaginal insemination with liquid semen stored at room temperature on fertility of goats. **Animal Reproduction Science**, v.86, p.109–117, 2005.
- PETERSON, K.; KAPPEN, M.A.P.M.; URSEM, P.J.F. et al. Microscopic and flow cytometric semen assessment of Dutch AI-bucks: Effect of semen processing procedures and their correlation to fertility. **Theriogenology**, v. 67, p. 863–871, 2007.
- PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 215-225, 2006.
- RITAR, A.J; SALAMON, S. Effects of seminal plasma and of its removal and egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of Angora Goat. **Australian Journal of Biological Science**, v. 35, p.305–12, 1982.
- ROBINSON, J. J.; MCKELVEY, W. A. C.; KING, M. E. et al. Traversing the ovine cervix – a challenge for cryopreserved semen and creative science. **Animal**, v.5, n.11, p. 1791–1804, 2011.
- ROY, A. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper’s gland of the goat. **Nature**, v. 179, p. 318-319. 1957.

- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p. 77-111, 2000.
- SALVADOR, I.; YÁNIZ, J.;VIUDES-DE-CASTRO, M.P. et al. Effect of solid storage on caprine semen conservation at 5 °C. **Theriogenology**, v. 66, p.974–981, 2006.
- SARLÓS, P.; MOLNAR, A.; KOKAI, M., et al. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**. v.50, p.235-245, 2002.
- SILVA, J.C.B.; OLIVEIRA, R.; SCHNEIDER, C. et al. Inseminação artificial intra-uterina em ovinos por tração cervical. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33; Supl. 1, p.307, 2005. In: 19 Reunião Anual da SBTE
- SINHA, M.P.; SINHA, A.K.; SINGH, B.K. et al. The effect of glutathione on motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. **Animal Reproduction Science**, v. 41, p. 237-243, 1996.
- SIQUEIRA, A.P. **Inseminação artificial em caprinos com sêmen resfriado**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. Belo Horizonte, 2006. 106p.
- TRALDI, A. de S. Biotécnicas aplicadas em reprodução de pequenos ruminantes. In: FEIRA INTERNACIONAL DE CAPRINOS E OVINOS, 3, São Paulo, 2006. Disponível em: [HTTP://www.agrocentro.com.br/feinco/2007/.2006](http://www.agrocentro.com.br/feinco/2007/.2006) . Acesso: 14/06/2015
- VIANA, A.K.S.; CHALHOUB, B.; RIBEIRO FILHO, A.L. et al. Avaliação in vitro do semen caprino resfriado, com ou sem centrifugação do plasma seminal e diluído em leite desnatado-glicose e tris-gema de ovo. **Ciência Animal Brasileira**, v.7, p.67-76, 2006.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p. 481-492, 2000.