

# TECNOLOGIA DO SÊMEN E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM CAPRINOS E OVINOS

Marciane da Silva Maia  
Méd. Vet., D. Sc em Medicina Veterinária/  
Reprodução Animal - Emparn  
E-mail: marcianemaia@yahoo.com.br



**GOVERNADOR DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE**  
IBERÊ PAIVA FERREIRA DE SOUZA

**SECRETÁRIO DA AGRICULTURA, DA PECUÁRIA E DA PESCA**  
FRANCISCO DAS CHAGAS AZEVEDO

**EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DO RIO GRANDE NORTE**  
**DIRETORIA EXECUTIVA DA EMPARN**  
**DIRETOR PRESIDENTE**  
FRANCISCO DAS CHAGAS MEDEIROS LIMA

**DIRETOR DE PESQUISA & DESENVOLVIMENTO**  
MARCONE CÉSAR MENDONÇA DAS CHAGAS

**DIRETOR DE OPERAÇÕES ADM. E FINANCEIRAS**  
AMADEU VENÂNCIO DANTAS FILHO

**INSTITUTO DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DO RN**  
**DIRETORIA EXECUTIVA DA EMATER-RN**  
**DIRETOR GERAL**  
HENDERSON MAGALHÃES ABREU

**DIRETOR TÉCNICO**  
MÁRIO VARELA AMORIM

**DIRETOR DE ADM. RECURSOS HUMANOS E FINANCEIROS**  
CÍCERO ALVES FERNANDES NETO

ISSN 1983-280 X  
Ano 2010



# **TECNOLOGIA DO SÊMEN E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM CAPRINOS E OVINOS**

## **TECNOLOGIA DO SÊMEN E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM CAPRINOS E OVINOS**

### **EXEMPLARES DESTA PUBLICAÇÃO PODEM SER ADQUIRIDOS**

EMPARN - Empresa de Pesquisa Agropecuária do RN  
UNIDADE DE DISPONIBILIZAÇÃO E APROPRIAÇÃO DE TECNOLOGIAS  
AV. JAGUARARI, 2192 - LAGOA NOVA - CAIXA POSTAL: 188  
59062-500 - NATAL-RN  
Fone: (84) 3232-5858 - Fax: (84) 3232-5868  
www.emparn.rn.gov.br - E-mail: emparn@rn.gov.br

#### COMITÊ EDITORIAL

Presidente: Maria de Fátima Pinto Barreto  
Secretária-Executiva: Vitória Régia Moreira Lopes  
Membros  
Aldo Arnaldo de Medeiros  
Amilton Gurgel Guerra  
Marciane da Silva Maia  
Marcone César Mendonça das Chagas  
Maria Cléa Santos Alves  
José Araújo Dantas  
Terezinha Lúcia dos Santos Fernandes

Revisor de texto: Maria de Fátima Pinto Barreto  
Normalização bibliográfica: Biblioteca da EMPARN  
Editoração eletrônica: Leânio Robson (leanio@rn.gov.br)

1ª Edição  
1ª impressão (2009): tiragem / 3000

### **TODOS OS DIREITOS RESERVADOS**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Ficha catalográfica elaborada por Vanessa de Oliveira Pessoa CRB-15/ 453

Maia, Marciane da Silva  
Tecnologia do sêmen e inseminação artificial em caprinos e ovinos /  
Marciane da Silva Maia; Revisado por Maria de Fátima Pinto Barreto. Natal:  
EMPARN, 2010.  
XXp.; v.13, il. (Circuito de tecnologias adaptadas para a agricultura familiar; 7)

ISSN: 1983-280X

1. Inseminação artificial. 2. Tecnologia do sêmen. 3. Inseminação - caprinos.  
4. Inseminação - ovinos. 5. Colheita de sêmen. 6. Reprodução animal. I. Autor.  
II. Título.

RN/ EMPARN/ BIBLIOTECA

CDD 636.005

# SUMÁRIO

## APRESENTAÇÃO

---

O Circuito de Tecnologias Adaptadas para a Agricultura Familiar alcança em 2010 a sua sétima edição. Desde 2004 o evento vem sendo realizado com o objetivo de apresentar aos produtores, extensionistas e técnicos, as tecnologias disponíveis desenvolvidas pela pesquisa agropecuária nas diferentes atividades, procurando elevar os níveis apropriação destas pelos agricultores familiares. Nesse período, para a realização dos circuitos, a EMPARN sempre contou com a estratégica parceria da EMATER-RN e com o apoio da Secretaria Estadual de Agricultura, da Pecuária e da Pesca (SAPE), além de importantes parceiros como o Banco do Nordeste, o Sebrae-RN, a Embrapa, o Consepa e as prefeituras municipais. Os Ministérios do Desenvolvimento Agrário (MDA) e da Ciência e Tecnologia (MCT), sempre reconheceram a importância e a inovação metodológica do Circuito e foram decisivos no aporte de recursos para viabilizar as atividades previstas.

São plenamente reconhecidas as dificuldades existentes nos processos de transferência e apropriação de tecnologias ou inovações tecnológicas na agricultura familiar brasileira. Quando se agregam a esse panorama características comuns aos agricultores familiares da região Nordeste, tais como: pequeno tamanho da propriedade, risco e incerteza, capital humano com baixo nível de escolaridade, forma de domínio sobre a terra (arrendamento, parceria, direitos de propriedade), disponibilidade de trabalho, crédito, assistência técnica insuficiente, visualiza-se um cenário de dificuldades ainda maior.

O Circuito de Tecnologias pode ser considerado uma importante ferramenta em ações de socialização do conhecimento técnico e científico para a agricultura familiar potiguar. O processo necessita ser complementado por atividades como unidades

de validação das tecnologias disponibilizadas estabelecidas em unidades familiares regionais, incorporando também os saberes locais, com maior participação do extensionista no campo e maior formação de instrutores multiplicadores.

Os ganhos qualitativos e quantitativos obtidos com a adoção das práticas previstas num projeto como o Circuito de Tecnologias, contribuem de forma direta para a redução dos níveis de pobreza e para o aumento da produção de alimentos das comunidades trabalhadas e de forma indireta, na geração de emprego e renda, devido a qualificação da mão de obra em atividades demandadas pelo negócio rural potiguar.

Este ano o Circuito terá como tema central **“Gestão e Crédito – as chaves para o sucesso da agricultura familiar”**, levando em consideração as reconhecidas deficiências de planejamento e administração dos negócios familiares rurais e do potencial de impacto do crédito do PRONAF no Nordeste, que apenas no período 2005/2006 realizou 805 milhões de contratos, envolvendo um montante de recursos da ordem de R\$ 1,9 bilhão.

Em 2010 o Circuito incorporou também à sua programação as ações de disponibilização de tecnologias apropriadas à agricultura familiar desenvolvidas pela EMPARN dentro do Programa Mais Alimentos do MDA. Essas ações visam à construção de estratégias para aperfeiçoar a integração entre a pesquisa, a assistência técnica e extensão rural (ATER) e a agricultura familiar, com foco na gestão, no crédito e nas diversas atividades desenvolvidas por esses agricultores.

**Francisco das Chagas Medeiros Lima**

Diretor Presidente da EMPARN

**Henderson Magalhães Abreu**

Chefe Geral da EMATER-RN

# TECNOLOGIA DO SÊMEN E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM CAPRINOS E OVINOS

Marciane da Silva Maia

## 1.0 INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) é uma técnica de reprodução em que o sêmen é obtido de um macho e depositado no sistema genital feminino, por meio de instrumentos apropriados e no momento em que os espermatozoides possam encontrar o óvulo e fecundá-lo.

O uso da inseminação artificial em animais é muito antigo. Segundo uma lenda árabe, a primeira tentativa de realizar uma inseminação foi feita por árabes por volta do ano de 1300. Chefes tribais que desejavam obter um filho do melhor garanhão da tribo rival conseguiram emprenhar suas éguas com sêmen recolhido em uma mecha de algodão. No entanto, a história documentada da IA abrange mais de dois séculos. A primeira experiência documentada, de sucesso no uso da inseminação artificial, foi feita pelo fisiologista italiano Lazzaro Spallazani, que em 1780 colheu o sêmen de um cão pelo método da masturbação e inseminou uma cadela da qual nasceram três filhotes vivos e normais. Um ano mais tarde (1781) a experiência de Spallazani foi confirmada por Pietro Rossi. No final do século XIX, Heape relatou na Royal Sociedade de Londres, seus estudos com inseminação artificial em mamíferos.

Somente a partir de 1900 é que cientistas da antiga União Soviética começaram os estudos com animais de produção. Na Rússia, o veterinário Elias Ivanov demonstrou que a fecundação era possível mesmo quando o sêmen era diluído; esclareceu o papel do frio na conservação do sêmen fora do organismo e aplicou a técnica da inseminação de forma intensiva. Ele iniciou seus

trabalhos com cavalos, mas, o sucesso na inseminação artificial foi obtido primeiro, em bovinos e ovinos. Em 1901 inseminou as primeiras ovelhas.

Em 1914 o italiano Giuseppe Amantea construiu a primeira vagina artificial adaptável ao cão. Em 1932 o russo Kusenov construiu a primeira vagina artificial para ovinos. A partir daí, o método de inseminação na ovelha passou a ser explorado em grande escala na ex-URSS e a ser difundido para outros países da Europa e posteriormente para diferentes partes do mundo.

Somente a partir dos anos 1970 é que os métodos de reprodução controlada e processamento do sêmen ovino e caprino tornaram-se disponíveis e possibilitaram uma nova abordagem da IA nessas espécies, como a sincronização do estro e a inseminação em tempo fixo. A França e a Austrália são pioneiras em tais desenvolvimentos.

A história recente da inseminação artificial está bem documentada em muitas revistas científicas em todo o mundo e o acesso às informações geradas é muito rápido devido ao avanço da tecnologia da comunicação em rede.

No Brasil, o uso da inseminação artificial em caprinos e ovinos ainda é insipiente. Nos estados da região Sul e Sudeste, onde predomina a criação de ovinos e caprinos leiteiros, essa técnica é usada com maior frequência por parte dos criadores. No entanto, no Nordeste do Brasil o método passou a ser mais difundido apenas a partir da década de 1980 e sua aplicação nos sistemas de produção ainda é muito baixa.

## **2.0 VANTAGENS E LIMITAÇÕES DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL**

### **2.1 Vantagens**

- Promover o melhoramento genético do rebanho por meio do uso de animais selecionados;

- Possibilitar o uso de animais de alto valor zootécnico por pequenos criadores sem condições financeiras de adquirir um animal de elite;
- Reduzir o número de reprodutores na propriedade e com isso baixar o custo de manutenção dos mesmos (alimentação, abrigo, cercas, etc);
- Evitar perdas na taxa de concepção em decorrência do uso de machos subfêrteis;
- Reduzir a transmissão de doenças sexualmente transmissíveis;
- Permitir a fecundação de várias fêmeas no mesmo dia, quando se usa sincronização do estro;
- Induzir a anotação de dados como: data do cio, cobertura, reprodutor, etc., e com isso ajudar no melhoramento genético (pedigree conhecido) do rebanho e fazer com que o criador tome decisões melhores;
- Possibilitar um maior aproveitamento do reprodutor, uma vez que, com a utilização do sêmen diluído, de cada ejaculado colhido é possível inseminar cerca de 20 fêmeas.

Dessa forma, um reprodutor utilizado em regime de inseminação artificial, potencialmente teria condições de produzir 15 vezes mais descendentes a cada ano, do que quando usado em monta natural, conforme o esquema demonstrativo apresentado em seguida.

ESQUEMA ILUSTRATIVO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE DESCENDENTES DE UM REPRODUTOR USADO EM MONTA NATURAL OU EM INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Monta Natural	Inseminação Artificial
3% macho : fêmea	ejaculações por dia : 2 dias de coleta/semana : 3 doses por ejaculação : 20 doses por estação de monta (49d) : 840
↓	↓
33 ovelhas por carneiro 85% parição 1,3 crias/parto	840 ovelhas inseminadas/ carneiro 50% parição 1,3 crias/parto
↓	↓
36 cordeiros nascidos	546 cordeiros nascidos

## 2.2 Limitações

- Exigência de uma infraestrutura mínima na fazenda, como: currais, bretes, capineiras, banco de proteína etc.;
- Realização de controle sanitário e nutricional do rebanho;
- Necessidade de pessoal treinado para a realização da IA;
- Uso de reprodutores testados para evitar a disseminação de características hereditárias indesejáveis;
- Investimento inicial com a compra de equipamentos.

## 3.0 ANATOMIA E FISIOLOGIA DA REPRODUÇÃO DO CARNEIRO E BODE

O aparelho genital do macho é constituído pelos testículos, epidídimos, escroto, canal deferente, glândulas acessórias, o pênis e o prepúcio.

O **testículo** tem duas funções principais – produzir os gametas masculinos (espermatozoides) e os hormônios sexuais masculinos ou andrógenos, entre eles a testosterona que é responsável pelo desenvolvimento das características sexuais secundárias e pelo comportamento sexual. O tamanho dos testículos varia com a idade, peso corporal e estação do ano. No carneiro adulto e saudável, os testículos atingem cerca de 200-300 gramas

cada e no bode cerca de 100 – 150 gramas. Isso é importante porque o número de espermatozoides produzidos é correlacionado com o tamanho do testículo.

O **epidídimo** é um órgão de formato alongado que se encontra aderido ao testículo. É dividido em três partes denominadas: cabeça, corpo e cauda. A cabeça do epidídimo está aderida ao topo do testículo e a cauda está na parte inferior e pode ser palpada através da parede do escroto. A maturação dos espermatozoides, isto é a aquisição da motilidade e da capacidade de fertilização, ocorre na cabeça e no corpo do epidídimo, enquanto que as células maduras são armazenadas na cauda.

O **escroto** é o saco ou bolsa onde os testículos ficam alojados. A pele do escroto é fina e elástica, coberta com pelos finos ou lâ e contém muitas glândulas sudoríparas e sebáceas. Tem a função tanto de proteger quanto de regular a temperatura do testículo. A produção de espermatozoides ocorre normalmente a 4 –7° C abaixo da temperatura corporal.

O **canal deferente** é um ducto que transporta os espermatozoides desde a cauda do epidídimo até a uretra. No final de cada ducto deferente (3 –4 cm) ocorre uma dilatação que é conhecida como ampola do canal deferente e serve como um reservatório de espermatozoides.

As **glândulas acessórias** compreendem as vesículas seminais, a próstata e as glândulas bulbo-uretrais. Estão localizadas próximas à uretra e à junção do canal deferente e produzem as secreções que contribuem para a formação do plasma seminal, líquido que transporta os espermatozoides. A secreção das glândulas acessórias serve para nutrir o espermatozoide, manter seu metabolismo, limpar a uretra antes da ejaculação e lubrificar o pênis, facilitando a intromissão na vagina. No bode, a glândula bulbouretral secreta grande quantidade de uma enzima chamada fosfolipase A, que catalisa a hidrólise das lecitinas, presentes na gema de ovo, em ácidos graxos e lisolecitinas. As lisolecitinas,

quando presentes em grande quantidade, são tóxicas ao espermatozoide. Essa particularidade impede o uso de grandes quantidades de gema de ovo nos diluentes para sêmen caprino.

O **pênis** tem duas funções, deposição do sêmen no trato reprodutivo da fêmea e expulsão da urina. Tanto o sêmen quanto a urina são expelidos através da uretra. Durante a excitação sexual o pênis torna-se rígido devido ao fluxo sanguíneo para o corpo cavernoso; este processo é chamado de ereção. O pênis tem uma curva em forma de S, chamada flexura sigmoide, que permite que o pênis seja estendido durante a cópula. A extremidade do pênis formada por tecido esponjoso é denominada glândula. Externamente à glândula do pênis existe uma pequena prolongação da uretra chamada apêndice vermiforme ou processo uretral, que gira rapidamente durante a ejaculação para pulverizar o sêmen na parte anterior da vagina da fêmea.

A extremidade livre, do pênis, quando não está em ereção, é coberta por uma invaginação da pele chamada **prepúcio**. O ciclo completo de formação e maturação dos espermatozoides no carneiro e no bode, dura cerca de dois meses. Qualquer alteração no estado geral do animal (doença, nutrição, estresse) que possa causar uma interrupção ou alteração na espermatogênese, pode ser vista no sêmen ejaculado após esse período e a fertilidade normal só será restaurada quando um novo ciclo espermatogênico completo tenha ocorrido.

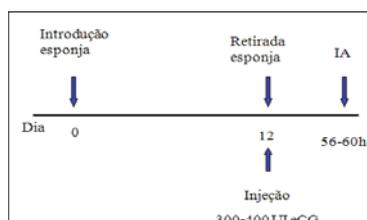
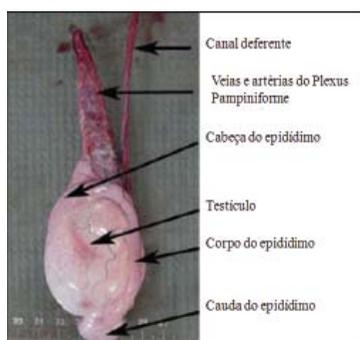


Figura 1: Anatomia do sistema genital masculino

Figura 2: Testículo e epidídimo



### 3.1 Sêmen e Características Seminais

O sêmen é constituído pelo plasma seminal e pelos espermatozoides, e sua composição varia entre as espécies.

O plasma seminal é a mistura de fluidos produzidos nos testículos, epidídimos, canal deferente e pelas glândulas sexuais, principalmente pela vesícula seminal. É um fluido isotônico e neutro, rico em numerosas substâncias, entre elas: frutose, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido glutâmico, inositol, sódio, potássio, cálcio, fosfolípidios, prostaglandinas, proteínas e serve para proteger e nutrir o espermatozoide.

O espermatozoide é uma célula altamente especializada, constituída de duas partes: a cabeça e a cauda (Figura 3). A cabeça é formada principalmente pelo núcleo, que contém os cromossomos responsáveis pela transmissão da informação genética paterna. A parte anterior da cabeça é envolvida por uma espécie de capuz, chamado de acrossomo, que contém as enzimas necessárias para o processo de fertilização. A cauda ou flagelo é o órgão de locomoção do espermatozoide. Os movimentos da cauda são responsáveis pela propulsão do espermatozoide nos fluidos. A cauda pode ser dividida em três regiões: a peça intermediária, a peça principal e a peça final. A peça intermediária é a região mais espessa da cauda, rodeada pelas mitocôndrias, que produzem a energia necessária para a locomoção. A peça principal é a parte mais longa da cauda e contém a maioria das estruturas responsáveis pela propulsão e é coberta por uma bainha fibrosa. A peça final é relativamente curta e não possui bainha.

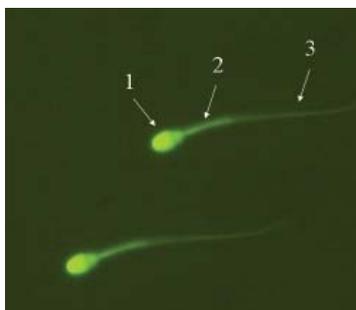


Figura 3: Espermatozoide ovino.  
1- cabeça, 2- peça intermediária,  
3 - cauda

No sêmen normal, os espermatozoides têm carga elétrica negativa e repelem um ao outro. Se os espermatozoides perdem sua carga negativa, eles se agregam uns aos outros, formando aglomerados. Este fenômeno é chamado de aglutinação e pode ocorrer devido a um aumento na acidez do meio, a presença de íons metais, bactérias ou outras impurezas ou a presença de aglutininas no corpo do animal.

A composição do sêmen varia entre as espécies. O volume e a concentração de espermatozoides no ejaculado variam com a anatomia (tamanho do testículo) e atividade reprodutiva ou frequência de coletas. Além das variações individuais, fatores como idade, condições climáticas, nutrição e frequência de ejaculação podem afetar a quantidade e qualidade do sêmen. No ovino e caprino o volume é relativamente baixo e a concentração é alta. Durante a cópula, a ejaculação é espontânea, dura somente alguns segundos e o sêmen é depositado na porção anterior da vagina. As características do sêmen de caprinos e ovinos são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1: Valores médios normais das características seminais de carneiros e bodes

<b>Característica seminal</b>	<b>Carneiro</b>	<b>Bode</b>
Volume (mL)	0,8 – 2,5 (1,0)	0,5 – 1,5 (0,8)
cor	Pérola ou marfim	Amarela
Aspecto	Leitoso a cremoso	Leitoso a cremoso
Total espermatozoides/ ejaculado (bilhões)	2 a 9 (3 )	1 a 7,5 (2)
pH	5,9 a 7,3	6 a 7
Motilidade (%)	75	80
Vigor (0 a 5)	3	3
Espermatozoides normais (%)	80 a 85	80 a 90
Viáveis (pós-vital)	80	80

## 4.0 ANATOMIA E FISIOLOGIA DA REPRODUÇÃO EM CABRAS E OVELHAS

Para o sucesso da inseminação artificial, o inseminador deve ter um conhecimento básico da anatomia e função dos órgãos do aparelho reprodutor da fêmea.

Os **ovários** são os órgãos responsáveis pela produção do óvulo e de hormônios importantes para a manutenção da gestação sendo o local onde ocorre a ovulação.

A **trompa ou oviduto** é um órgão tubular que liga cada ovário a um corno uterino. É responsável pela captação do óvulo após a ovulação (via infundíbulo) e é o local onde ocorre a fecundação e as primeiras etapas de desenvolvimento do embrião durante seu transporte até o útero onde se desenvolverá a gestação.

O **útero** da cabra e da ovelha é do tipo bipartido, composto pelo corpo, dois cornos uterinos e a cérvix. Sua principal função é servir como incubador para o embrião e feto durante a gestação.

A **cérvix ou colo uterino** é um órgão fibroso tubular que separa a cavidade uterina da cavidade da vagina. Apresenta em sua parede interna uma série de dobras rígidas denominadas anéis em número de 4 a 5. Na cabra, esses anéis são alinhados de modo que formam um canal que permite a penetração da pipeta de inseminação. Porém, na ovelha a disposição dos anéis cervicais não possibilita a formação de um canal livre o que dificulta ou mesmo impossibilita a sua transposição pelo instrumento inseminante. Normalmente, o conduto cervical se encontra fechado, abrindo-se apenas em algumas ocasiões, como: no parto e durante o estro, para permitir a liberação de muco e o transporte dos espermatozoides.

A **vagina** é o órgão tubular que liga a vulva ao colo do útero, recebe o pênis durante a cópula e é o local onde o sêmen é depositado na monta natural.

A **vulva** é a porção mais externa do sistema genital. É composta pelo vestibulo, pequenos e grandes lábios e possui glândulas que secretam um fluido viscoso que facilita a cópula.

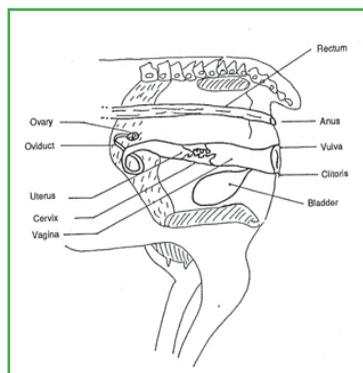


Figura 4 – Anatomia do sistema genital feminino

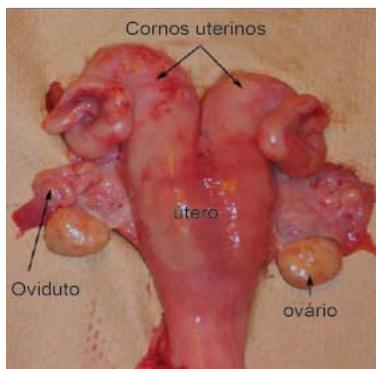


Figura 5: Útero de cabra

## 4.1 O Ciclo Estral

Ciclo estral é o período de tempo transcorrido entre a manifestação de dois estros ou cios consecutivos. Nas cabras, esse intervalo dura em média 21 dias, podendo variar bastante desde ciclos curtos, com menos de 17 dias, a ciclos longos, mais de 25 dias. Nas ovelhas, o ciclo estral dura em média 17 dias, com uma pequena variação (15 a 19 dias).

## 4.2 O Estro ou “Cio”

É a fase do ciclo estral em que a fêmea aceita o acasalamento, ou seja, deixa-se montar pelo macho. Nas cabras, esse período tem uma duração média de 36 horas (24-48h) e a ovulação ocorre no final ou logo após o final do cio, cerca de 30-36 horas após o

início do cio. Na espécie ovina o estro dura em média 32 horas (de 24 a 36 h) e a ovulação ocorre no terço final do cio, cerca de 24 -30 horas após o início do estro.

#### 4.2.1 Identificação do “cio”

A identificação correta da fêmea em estro é de fundamental importância para o sucesso da inseminação. Pode ser feita por meio da observação do comportamento da fêmea ou utilizando um rufião.

- Por meio da observação visual

Baseia-se na observação do comportamento do animal, o qual apresenta sintomas característicos do cio. **Na cabra** estes sintomas são:

-Inquietação;

-Agitação frequente da cauda;

-Urina e berra com frequência;

-Vulva inchada e avermelhada;

-Corrimento de muco através da vulva, cristalino no início do cio, creme durante o cio e esbranquiçado no final do mesmo;

Monta e se deixa montar por outras fêmeas e procura se aproximar do macho.

#### **Na ovelha:**

- É difícil identificar o cio por meio da observação do comportamento porque a mesma não exterioriza muito as características de cio; as manifestações comportamentais são mais evidentes quando está na presença do macho;

- Portanto, quando se deseja trabalhar com reprodução programada é indispensável o uso de rufião para identificar as fêmeas em estro.

- Por meio de rufiação (uso do rufião)

É o método mais seguro de identificar cio tanto na ovelha como na cabra.

- Utilizar um macho inteiro da mesma espécie, mas que seja

impossibilitado de fecundar a fêmea (vasectomia ou fixação do “S” peniano) o qual denominamos de “rufião” ou uma fêmea androgenizada.

-Untar o peito do rufião com tinta (pó xadrez + graxa lubrificante na proporção de 1:3) e colocar o mesmo junto com as fêmeas;

-Observar os animais duas vezes ao dia;

Identificar e separar as fêmeas que apresentem a garupa marcada pela tinta;

-Alterar a cor da tinta a cada 15 dias para possibilitar identificar as fêmeas que repetirem o cio.

## **5.0 SELEÇÃO E PREPARAÇÃO DE MACHOS PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL**

A seleção dos reprodutores deve ser feita com antecedência de no mínimo 60 dias antes do início das coletas. Esse período é necessário para que se realizem as alterações de manejo e alimentação que forem necessárias, assim como para o treinamento dos machos para coleta em vagina artificial.

A boa seleção do macho doador de sêmen é fundamental para o sucesso de um programa de inseminação.

### **5.1. Características a serem avaliadas na seleção de reprodutores**

#### **Desejáveis**

- Produzir sêmen de boa qualidade;
- Ter boa libido (elevado interesse sexual, habilidade para detecção do cio e agilidade para efetuar a monta e a cópula);
- Testículos simétricos, ovoides, firmes e presentes na bolsa escrotal;
- Ausência de alterações penianas e prepuciais;
- Ter bons cascos e aprumos;

- Capacidade de transmitir as características desejáveis aos seus descendentes.

### **Indesejáveis**

- Ausência de chifres (mocho) no bode;
- Hipoplasia testicular e criptorquidismo;
- Tetas supranumerárias;
- Agnatismo ou prognatismo;
- Doenças infecciosas ou parasitárias.

A ausência de chifres nos caprinos, ou seja, o caráter mocho está ligado à manifestação de hermafroditismo.

## **5.2 Exame Andrológico**

A realização do exame clínico andrológico dos bodes e carneiros destinados à reprodução é muito importante, uma vez que os distúrbios funcionais em um ou mais órgãos genitais irão prejudicar a eficiência reprodutiva do macho e a fertilidade das fêmeas cobertas ou inseminadas, por ele.

Ao realizar-se o exame andrológico, deve-se fazer o exame clínico geral do animal e o exame especial. No exame clínico geral deverá ser observado o aspecto geral do animal, temperamento, estado nutricional, dentes, pele, cascos, aparelho circulatório, respiratório e digestivo. O exame especial inclui a avaliação morfológica dos órgãos genitais, exame funcional, avaliação do sêmen e exame sanitário.

### **Aspectos a serem observados nas diversas etapas do exame andrológico**

- Identificação: informações sobre proprietário e propriedade, como nome, endereço, fone. Do animal: espécie, raça, nome/número, tatuagem, data nascimento, peso, filiação, sinais externos.
- Anamnese ou histórico clínico: realizada de acordo com o mo-

tivo do exame. Pode-se questionar – regime de atividade sexual (monta natural / doador de sêmen); frequência de ejaculação; número de fêmeas cobertas pelo reprodutor; número de fêmeas gestantes, índice de retorno ao cio; condições de manejo e alimentação; tempo de aparecimento das alterações; evolução do processo em curso; tratamentos realizados e resposta clínica; situação sanitária e reprodutiva do rebanho; data e condições da aquisição e procedência do reprodutor.

- Exame clínico geral: fazer a inspeção do animal em estação e em movimento, avaliar sistema nervoso, respiratório, circulatório, digestivo e locomotor assim como condição corporal. Observar a presença ou não de defeitos hereditários como: hipoplasia testicular, criptorquidismo, hérnias, paresia espasmódica, miotrofia, debilidade dos ligamentos interdigitais. Estes defeitos afetam o aproveitamento do reprodutor e são razão para eliminação.

- Exame do sistema genital: exame realizado mediante inspeção e palpação onde se verifica a morfologia dos órgãos genitais

- **Escroto**: avaliar integridade da pele, simetria, mobilidade, sensibilidade, espessura, temperatura e aderência (deslizamento e ausência de processos inflamatórios);

- **Testículo**: avaliar situação (dentro da bolsa escrotal); posição (vertical, sem torções); mobilidade (deslizar livremente dentro da bolsa escrotal, sem aderências); forma (oval, alongada); simetria (simétricos quanto ao tamanho e forma); consistência (tensa-elástica, com variações desde flácido até firme); sensibilidade (indolor, diferenciar sensibilidade dolorosa de simples reação do animal); tamanho (varia conforme a espécie, raça e idade. É afetado pelo peso corporal, processo inflamatório, subnutrição, anormalidades de desenvolvimento). A aferição do tamanho do testículo pode ser realizada por meio da medição do perímetro

ou circunferência escrotal (fita métrica); comprimento, largura e espessura testicular (paquímetro, excluindo o epidídimo) e volume testicular (imersão dos testículos em um recipiente graduado cheio de água e leitura do volume de líquido deslocado). Dar preferência aos machos que apresentem o maior tamanho testicular, comparado aos seus pares, lembrando que o tamanho varia com a idade e peso corporal do animal.

- **Epidídimo**: exame realizado por meio de palpação. Palpar a cabeça, corpo e cauda, avaliando tamanho, simetria (simétricos), consistência (elástico), forma e posição.

- **Cordão espermático**: por meio de palpação, devem ser simétricos e diâmetro de um polegar. Aumento de volume pode indicar existência de cistos, varicocele ou processos inflamatórios.

- **Pênis e prepúcio**: examinar cuidadosamente pele e tecido subcutâneo quanto a presença de aumento de volume, temperatura ferimentos ou cicatrizes. Abertura do prepúcio deve permitir a passagem do pênis erétil e a mucosa prepucial deve ser rosa pálido. Pênis: verificar mobilidade, mucosa e secreções. Deve ser bem desenvolvido e móvel.

- Exame funcional ou do comportamento sexual: verificar a libido (1° salto em até 10 min); e execução das fases da cópula (excitação, aproximação, ereção, emissão do pênis, monta, abraço, procura, introdução, empuxo final e ejaculação; desmonta, relaxamento e tranquilização) quando diante de uma fêmea em cio; aceitação ou não da vagina artificial.

- Espermograma ou exame do sêmen: avaliar as características físicas, volume, cor, aspecto, turbilhão, motilidade, vigor e concentração. Características morfológicas (total de espermatozoides anormais, 15 a 20%). Exames complementares: % vivos (coloração vital), teste de termo-resistência (sêmen congelado).

Tabela 2: Valores médios da circunferência escrotal (CE) de bodes de diferentes raças, tomados em exposições agropecuárias em Natal-RN, 2001.

<b>RAÇA</b>	<b>N°</b>	<b>IDADE (meses)</b>	<b>CE (cm)</b>
Parda Alpina	21	Até 12	23,5± 3,0
	4	12 - 18	28,2±1,8
	2	18 - 24	28,1±1,4
Alpina Americana	4	40 - 48	27,1±0,4
	12	Até 12	25,1±2,9
	4	12 - 18	26,1±2,6
	3	18 - 24	28,8±2,0
Saanen	3	18 - 24	31,4±3,5
	4	40 - 48	31,6±2,1
	2	Até 12	24,1±2,2
	1	12 - 18	26,5
Murciana	4	40 - 48	26,1±1,6
	14	Até 12	25,9±3,6
	07	12 - 18	28,6±1,7
Boer	04	18 - 24	30,5±3,2
	03	29 - 36	32,0±4,1
	02	40 - 48	33,4±0,9
	21	Até 12	24,3±2,5
Anglonubiana	8	12 - 18	27,3±3,1
	6	18 - 24	29,7±1,9
	5	29 - 36	30,0±1,9
	2	40 - 48	32,1±2,3

Obs: idade estimada com base na dentição

Tabela 3: Valores médios da circunferência escrotal (CE) de carneiros de diferentes raças, tomados em exposições agropecuárias em Natal-RN, 2001.

<b>RAÇA</b>	<b>N°</b>	<b>IDADE (meses)</b>	<b>CE (cm)</b>
Santa Inês	72	Até 12	29,2 ± 3,1
	26	12 - 18	31,8± 3,4
	08	18 - 24	33,3 ± 3,9
	11	29 - 36	34,1±4,3
	04	40 - 48	34,1±2,0
	09	> 48	36,0±2,2
Somalis	17	Até 12	24,5±3,5
	03	12 - 18	29,3±1,1
	04	29 - 36	31,8±2,7
	01	40 - 48	33,4

	02	> 48	37,0±0,9
Morada Nova	01	Até 12	28,5
	08	12 - 18	30,4±2,5
	03	18 - 24	32,3±1,8
	01	29 - 36	35,5
	02	40 - 48	33,4±1,5
Dorper	07	Até 12	29,1± 2,8
	03	12 - 18	32,7±1,3
	01	18 - 24	39,0

Obs: idade estimada com base na dentição

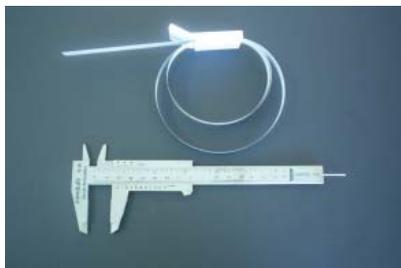


Figura 6: Instrumentos utilizados para aferição do tamanho dos testículos



Figura 7: medição do perímetro escrotal em bode

### 5.3 - Preparação dos Machos

Vários fatores ambientais e de manejo podem afetar a fertilidade do macho entre eles: alta temperatura ou umidade, mudança de ambiente, alteração de dieta, doenças, etc. Mesmo os procedimentos rotineiros de manejo, como corte de cascos, tosquia e aplicação de medicamentos podem ser estressantes para os animais. O transporte dos animais também causa estresse, por isso deve ser feito com grande antecedência, para que os animais tenham tempo de se acostumar ao novo ambiente e alimentação.

Alimentos ricos em proteína podem aumentar a produção de espermatozoides. Por isso, recomenda-se melhorar a nutrição dos reprodutores 6-8 semanas antes do início das coletas.

Nos programas de inseminação que necessitem realizar a coleta do sêmen, é necessário treinar os machos com antecedência.

O método de coleta ideal é o da vagina artificial e os bodes e carneiros selecionados devem ser treinados para ejacular dentro da vagina artificial. O treinamento deve começar 2-3 semanas antes do início das coletas. Isso possibilita tempo hábil para o treinamento, avaliação da qualidade do sêmen e substituição de machos insatisfatórios. Para o treinamento, é necessária a presença de uma fêmea em estro para estimular a manifestação do comportamento sexual do macho e este deve se acostumar a cobrir a fêmea na presença de um operador. De preferência, a coleta deve ser realizada sempre no mesmo local e pelo mesmo operador. Depois de treinados, os machos chegam a montar qualquer fêmea que esteja presa no tronco de coleta, independente de estar ou não em estro.

O tempo necessário para o treinamento depende da habilidade do operador e da idade, experiência sexual e temperamento do macho. Animais acostumados com a presença das pessoas como aqueles criados confinados ou que estão em contato frequente com humanos são mais fáceis de treinar que animais criados extensivamente em piquetes grandes com pouco contato e manejo. Animais jovens são mais tímidos que os mais velhos e os bodes tendem a ser mais sensíveis que os carneiros. Animais em treinamento são muito sensíveis a distrações ou sustos causados por barulho, gritos do tratador, presença de estranhos, cães, etc. Um susto ou medo, ocorrido durante o treinamento pode ter um efeito inibidor prolongado sobre o desempenho do animal.

Uma vez condicionado a ejacular na vagina artificial, o macho rapidamente realiza essa ação quando requerido para futuras coletas de sêmen.

## **Passos necessários durante o treinamento para coleta de sêmen**

- Levar os machos diariamente, ao local de coleta (sala ou baia) por um período de 7 a 10 dias, para que eles se acostumem com o ambiente;
- Introduzir uma ou duas fêmeas em estro dentro da sala de coleta e deixar que os machos a montem;
- Acostumar os machos a montar uma fêmea em estro presa no tronco de coleta. Isto deve ser feito na presença do operador.
- Quando o macho montar, o operador deve acostumar o animal a ser manipulado, tocando a região do prepúcio;
- Quando o macho estiver montando regularmente a fêmea com o operador por perto, pode-se então passar a treiná-lo para ejacular na vagina artificial.
- Se um macho não mostrar interesse na fêmea quando está sozinho com ela, ele pode ser estimulado colocando-se um macho ativo dentro do local de coleta.
- Na coleta a campo, a mesma deve ser realizada no ambiente em que o macho está acostumado.

## **6.0 SELEÇÃO E PREPARAÇÃO DE FÊMEAS PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL**

No mínimo 30 dias antes de iniciar o período de acasalamentos, o criador deverá fazer a seleção das fêmeas que serão inseminadas. Na ocasião, deve avaliar todas as fêmeas em idade reprodutiva, observando os aspectos sanitários gerais, examinando a glândula mamária e vulva (para detectar mamite e corrimentos) e avaliando a condição corporal dos animais. As fêmeas a serem incluídas em um programa de inseminação devem estar em bom estado sanitário, livre de doenças e parasitas e em boa condição corporal. Fêmeas desnutridas não ovulam ou sofrem uma alta

taxa de mortalidade embrionária. Fêmeas muito gordas também podem apresentar distúrbios reprodutivos.

Ao início da estação de acasalamento as fêmeas devem apresentar um escore de condição corporal 3. Fêmeas com escore abaixo do recomendado devem receber suplementação alimentar para ganhar peso, enquanto que aquelas muito gordas (escore 5), devem sofrer restrição alimentar. A suplementação deve ser iniciada quatro a seis semanas antes do início dos acasalamentos e permanecer por todo o período de forma que as fêmeas ganhem peso.

## 6.1 Características a serem observadas na seleção da matriz

- Ter boa produção de leite (ou em raças não especializadas, o suficiente para criar o filhote);
- Apresentar úbere bem inserido e com apenas duas tetas;
- Ter emprenhado e parido normalmente. Deve-se evitar inseminar as fêmeas jovens núlparas devido à menor fertilidade e ao traumatismo causado pelo rompimento do hímen com o espelho.
- Ser isenta de doenças infecciosas, parasitárias ou sexualmente transmissíveis;
- Não ter abortado;
- Ter aspecto feminino;
- Possuir chifres (cabras);
- Ter bons cascos e aprumos e
- Ter boa fertilidade.

## 6.2 Identificação das fêmeas

Para possibilitar a anotação precisa dos dados, cada fêmea deve ser claramente identificada com um brinco numerado, colar

e plaqueta numerada ou tatuagem. Grupos de fêmeas podem ser identificados com colar colorido, cada cor correspondendo a um reprodutor, para facilitar o manejo no momento da inseminação.

### **6.3 Sincronização ou indução do estro e ovulação**

Cabras e ovelhas podem ser inseminadas durante o estro natural. No entanto, quando o estro e ovulação são induzidos, um maior número de fêmeas pode ser inseminado ao mesmo tempo. O estro e a ovulação nas cabras e ovelhas podem ser induzidos (fêmeas em anestro) ou sincronizados por métodos farmacológicos ou métodos naturais. Os métodos farmacológicos proporcionam uma maior sincronização dos estros, em um maior número de fêmeas, mas, também requerem maiores despesas com a aquisição e aplicação de medicamentos. Os métodos naturais são menos caros, mas não resultam em uma boa sincronização dos estros.

No nosso meio, o método farmacológico mais empregado é o dos progestágenos e entre os naturais é o “efeito macho”.

#### **6.3.1 Métodos naturais**

##### **Efeito Macho**

O “Efeito Macho” é um método natural de sincronização do cio que possibilita a manifestação do cio em um grande número de fêmeas em um curto período de tempo. A introdução do macho leva a um aumento imediato (2-4 min), na secreção de LH pela hipófise da fêmea. Em seguida ocorre aumento na pulsatilidade e redução na amplitude dos pulsos de LH, semelhante ao que ocorre durante a fase folicular do ciclo estral. Esse padrão de secreção leva à liberação da onda pré-ovulatória de LH e ovulação.

Para induzir o “efeito macho” cabras e ovelhas devem ser completamente isoladas dos machos (cheiro, visão e contato) por um período mínimo de três semanas. Após esse período, quando os machos forem introduzidos novamente no rebanho, a maioria das fêmeas ovula em até três dias após o primeiro contato com os machos. Nas duas espécies a primeira ovulação é seguida por um ciclo curto (5-6 dias) e um estro fértil ocorre após um ciclo estral de duração normal.

### **Etapas para realização do “efeito macho”**

- Quatro semanas antes do início da estação de cobertura, isolar completamente os machos das fêmeas de modo que elas não possam ver, ouvir ou sentir o cheiro dos machos;
- Fornecer uma suplementação alimentar às fêmeas, na intenção de melhorar a taxa de ovulação;
- Decorrido este período, introduzir no rebanho um rufião com o peito untado de tinta (1kg graxa : 1 caixa de tinta xadrez pó) para estimular e identificar as fêmeas em estros;
- Após os primeiros sete dias (cabras) ou 15 dias (ovelhas), as fêmeas que forem marcadas deverão ser acasaladas por meio de monta natural controlada ou IA.

Cerca de 90% das fêmeas ovulam dentro de 2-5 dias após a introdução do macho no rebanho. Sendo que, nas cabras apenas 60-68% dessas ovulações são acompanhadas de cio e nas ovelhas a primeira ovulação nunca vem acompanhada de cio.

### Associação do Efeito macho + progestágeno

A associação do efeito macho com o tratamento prévio das fêmeas com progesterona ou progestágeno, reduz a incidência de ciclos curtos e aumenta a porcentagem de cabras em estro e a fertilidade ao primeiro estro, comparado com apenas o efeito macho. Essa estratégia possibilita o desenvolvimento de

protocolos de sincronização do estro e ovulação, baseados no uso do efeito macho, que possam ser utilizados em programas de inseminação artificial.

Em pesquisa realizada na EMPARN, avaliou-se um método de sincronização do estro em cabras leiteiras, baseado na associação do Efeito Macho ao tratamento com progestágeno. O estudo foi realizado durante os meses de fevereiro (plena estação reprodutiva) e julho (época em que, no local, a atividade reprodutiva das fêmeas é baixa) e obteve-se com 100% de sincronização em ambas as épocas. O protocolo utilizado será descrito a seguir.

### **Etapas para realização do tratamento Efeito Macho + Progestágeno**

- Isolar completamente, as fêmeas dos machos por um período de no mínimo quatro semanas;
- Dia 0: inserir uma esponja vaginal impregnada com 60mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP) na vagina de cada fêmea e introduzir o macho no rebanho (rufião);
- Dia 9: retirar a esponja e aplicar 75 $\mu$ g de cloprostenol na submucosa vulvar;
- Dias 10 a 13: Observar a incidência de cio, separar as fêmeas e realizar a inseminação ou acasalamento.

O intervalo entre o final do tratamento hormonal e o início do estro foi em média 50 horas. No mês de fevereiro, 100% das cabras manifestaram estro entre 36 e 48 horas após a retirada das esponjas. No mês de julho a porcentagem de manifestação de estro foi de 29,4% entre 36 e 48 horas e de 70,6% entre 50 e 74 horas após a remoção das esponjas.

Tabela 4. Incidência de estros, taxa de prenhez e intervalo entre o final do tratamento hormonal e a manifestação do estro em cabras leiteiras submetidas ao tratamento de sincronização com Efeito Macho (EM) ou Efeito Macho associado à progesterógeno (EM+MAP).

Tratamento	Fêmeas em Estro (%)		Taxa Pre-nhez	Intervalo (horas)	
	FEV	JUL	JUL	FEV	JUL
Efeito Macho	58,0	42,1	13,0	-	-
EM+MAP	100,0	100,0	65,0	43,6 ± 1,4	56,5 ± 2,8

Fonte: Maia et al. (2009)

### 6.3.2 Métodos farmacológicos

Os métodos farmacológicos baseiam-se na administração de progesterógenos sintéticos (ou progesterona) para simular a ação de um corpo lúteo natural ou na administração de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ou prostaglandina sintética para encurtar a vida do corpo lúteo. O método mais usado em vários países é o método dos progesterógenos.

#### Método dos progesterógenos

É o método mais usado para sincronização do estro tanto para cabra como para ovelha, também conhecido como método das esponjas. Esse método se baseia no conhecimento de que altos níveis de progesterona inibem o estro e ovulação e sua queda promove ambos os eventos. O tratamento atua da mesma forma que um corpo lúteo e a liberação de gonadotrofinas pela hipófise é suprimida. Quando o progesterógeno exógeno (esponja ou CIDR) é retirado, a hipófise libera grandes quantidades de gonadotrofinas que estimulam o crescimento folicular e subsequente ovulação. O progesterógeno exógeno não afeta a função de um corpo lúteo totalmente formado, que possa estar presente no ovário da fêmea no momento do início do tratamento. Por essa razão, para que

o tratamento seja eficaz na sincronização dos estros, a duração do tratamento com progestágeno deve ser igual ou superior ao período em que o corpo lúteo é ativo, que é de 12 -14 dias na ovelha e 16-18 dias na cabra. Na cabra e ovelha já foram muito utilizados os tratamentos longos -14 dias ovelha e 21 dias na cabra.

Atualmente, o tratamento mais utilizado inclui a aplicação de prostaglandinas, cuja função é lizar o corpo lúteo que possa estar presente no ovário, reduzindo assim a duração do tratamento com progestágeno, e a injeção de gonadotrofinas ao final do tratamento com progestágeno para aumentar o crescimento folicular, a duração do estro e a taxa de ovulação, cujo esquema de aplicação será descrito a seguir.

### **Ovelha** (Figura 8)

- Dia 0: colocar a esponja impregnada com 60mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP) ou 40mg de acetato de fluorogesterona (FGA), no fundo da vagina (Figura 5 );
- 12º dia: remover a esponja e aplicar 300-400 UI de eCG (gonadotrofina coriônica eqüina, ) via intra muscular
- Observar a manifestação de cio utilizando rufião;
- Inseminar de acordo com o esquema escolhido;
- Com observação de estro: 15 a 17 horas após o início do estro (aceitação da monta).
- Em tempo fixo:  $\pm$  55 horas após o final do tratamento.

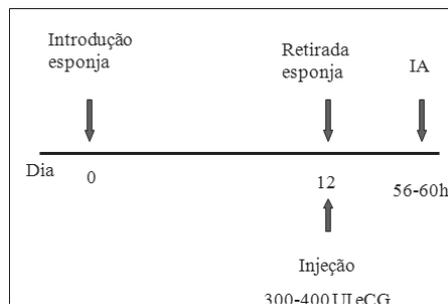


Figura 8: Protocolo de sincronização do estro e ovulação na ovelha

## Cabra (Figura 9)

- Dia 0: colocar uma esponja de poliuretano impregnada com 60mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP) ou 50mg de acetato de fluorogesterona (FGA), no fundo da vagina da fêmea;
- Dia 8: aplicar uma injeção intramuscular de 200-300 UI de eCG e 75-100  $\mu$ g de cloprostenol. As injeções devem ser dadas 48h antes da remoção da esponja.
- Dia 10: retirar a esponja;
- Dia 11-12: observar a manifestação de cio utilizando rufião ou fazendo a observação visual dos sintomas clínicos do estro. Realizar a inseminação de acordo com o esquema escolhido:  
Com observação de estro: 12 a 18 horas após o início do estro (aceitação da monta)
- Em tempo fixo: 38-42 horas após a retirada da esponja.

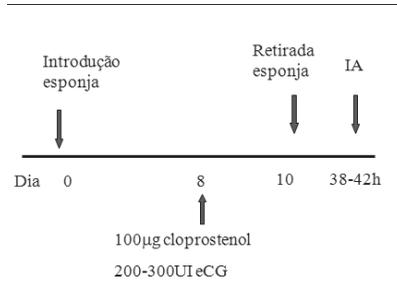


Figura 9: Protocolo de sincronização do estro e ovulação na cabra



Figura 10: Materiais usados para realização do tratamento hormonal.

## Aplicação da esponja

- Colocar a esponja dentro do aplicador comprimindo-a com os dedos;
- Esticar o cordão prendendo-o na caneleta existente no êmbolo;
- Introduzir o êmbolo no aplicador empurrando a esponja até a extremidade posterior do aplicador;
- Limpar a região perineal da fêmea utilizando água e sabão; Secar com papel absorvente, cuidando para não entrar líquido na vagina;
- Lubrificar a extremidade do aplicador utilizando glicerina líquida ou vaselina sólida;
- Introduzir o aplicador no vestíbulo da vagina acompanhando o direcionamento anatômico do canal vaginal;
- Quando não conseguir mais evoluir, pressionar o êmbolo do aplicador para frente removendo a porção metálica (o tubo) do mesmo;
- Cortar as pontas do cordão deixando-o rente aos lábios vulvares;
- Introduzir as extremidades do fio dentro do vestíbulo da vagina, protegendo-as da curiosidade dos outros animais.



Figura 11: Sequência da aplicação da esponja com progestágeno em uma cabra

## 7.0 FABRICAÇÃO DAS ESPONJAS

A esponja pode ser fabricada artesanalmente seguindo-se os passos descritos abaixo:

- Utilizar espuma de poliuretano com densidade 20 e altura de 3 cm;
- Usar como fôrma, um cano de ferro com 2 a 3 cm de diâmetro;
- Chanfrar as bordas do cano com esmeril, tornando-o cortante;
- Colocar a fôrma sobre a espuma e modelar uma porção cilíndrica, girando o cortador sobre a espuma até a liberação total do cilindro de espuma;
- Colocar o fio de remoção da esponja, utilizando uma agulha com 60 cm de fio de algodão zero;
- Inserir a agulha na parede lateral do cilindro de esponja (sentido horizontal) até atravessá-la, remover a agulha e fazer uma segunda perfuração paralela á primeira (a aproximadamente 1 cm de distância) ;
- Remover a agulha deixando apenas o fio preso à esponja; Igualar as pontas do fio;
- Puxar a porção do fio que está envolvendo a esponja no lado oposto ao da saída das pontas de modo a formar uma alça que atinja a borda superior do cilindro de esponja;
- Entrelaçar o fio, passando uma das pontas por dentro da alça e a outra por cima e por dentro da mesma;
- Ajustar o fio no centro da extremidade superior da esponja;
- Dar alguns nós com as pontas, cuidando para que fiquem no centro da circunferência de forma que permita o equilíbrio da esponja (Figura 12);
- Aplicar o hormônio na esponja;
- Utilizar uma dose de 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (1,2 ml de Promone E);
- Aplicar o hormônio em vários pontos da esponja sempre do centro para a periferia, evitando o extravasamento do produto;

- Secar as esponjas, pendurando-as em um varal colocado em local protegido da luz solar e de poeira;
- Armazenar em saco plástico vedado para não ter contato com o ar e
- Estocar em local protegido de luz solar direta.

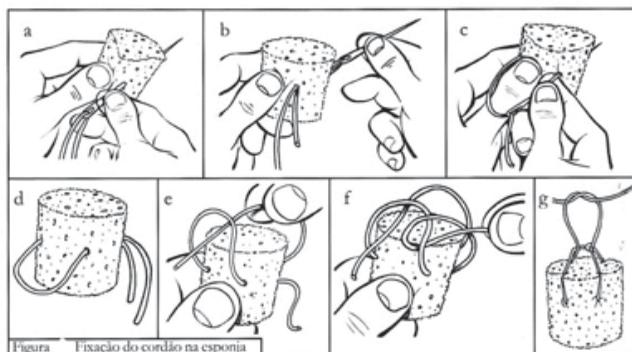


Figura 12: Passos para fabricação da esponja (Fonte: Maia, 1997)

## 8.0 TECNOLOGIA DO SÊMEN

Grande parte do sucesso de um programa de inseminação em caprinos e ovinos depende da produção de sêmen de boa qualidade. Quanto melhor a qualidade do sêmen utilizado, maiores as chances de sucesso na prenhez.

O processamento do sêmen envolve a coleta, avaliação, diluição, embalagem (pellet, palheta, ampola, micro tubo), refrigeração, congelação, estocagem e descongelação. Todas essas etapas devem ser realizadas com cuidado, pois diversos fatores podem interferir na viabilidade do espermatozoide.

### Fatores que afetam a sobrevivência do espermatozoide

## • Temperatura

A temperatura do sêmen no momento da ejaculação é em torno de 37,5°C. A exposição do sêmen a temperaturas superiores a esta aumenta a taxa metabólica, exaurindo as reservas energéticas e com isso diminuindo o tempo e vida do espermatozoide.

A redução da temperatura reduzirá o metabolismo do espermatozoide, mas uma queda súbita na temperatura, principalmente abaixo de 10°C causa perda irreversível de sua viabilidade. Este fenômeno é chamado de choque de temperatura ou “choque térmico” e pode ocorrer devido ao descuido durante a manipulação, como: exposição do sêmen ao ar frio, utilização de um tubo de coleta frio, ou lamina de microscópio fria. Deve-se ter muito cuidado também no momento da diluição do sêmen, assegurando-se de que o diluidor está na mesma temperatura do sêmen.

## • Luz solar

Incidência direta de luz solar é prejudicial ao sêmen. Um curto período de exposição à luz do sol pode reduzir a viabilidade do espermatozoide e 30-40 minutos de exposição pode matá-los. Por isso, todos os procedimentos de coleta e manipulação do sêmen devem ser realizados em local coberto e longe de janelas por onde penetre luz do sol. É conveniente também, evitar exposição prolongada a lâmpadas fluorescentes ou radiação ultravioleta.

## • Contato com metal

Contato com metal de qualquer tipo é prejudicial ao sêmen. Por essa razão, somente utensílios de vidro ou equipamentos feitos de material sintético inerte podem ser usados para coleta, diluição e estocagem do sêmen e na inseminação. Deve-se evitar o uso de água destilada em destiladores de metal devido à presença de

íons metálicos na água. Assim, no preparo de diluidores e demais soluções utilizar apenas água destilada em vidro.

- **Contato com água**

A água é um poderoso agente espermicida e o sêmen nunca deve ser colocado em contato com ela. A água reduz a pressão osmótica do plasma seminal e pode matar os espermatozoides. Por isso, todos os equipamentos devem ser cuidadosamente secos antes do uso, incluindo a vagina artificial e os tubos de coleta. Muito cuidado deve ser tomado quando o sêmen é mantido em banho-maria para evitar que a água respingue acidentalmente dentro do sêmen.

- **Impurezas e bactérias**

Bactérias, poeira, pelos, urina e outras impurezas que podem cair dentro do sêmen poderão reduzir a viabilidade ou matar os espermatozoides. A contaminação do sêmen ocorre principalmente durante a colheita e pode ser evitada por meio de uma limpeza rigorosa do prepúcio do macho antes da manipulação. Após a coleta, o sêmen pode ser protegido cobrindo-se o tubo de coleta com papel alumínio ou tampa própria. A proliferação de microorganismos no sêmen pode ser controlada pela adição de antibióticos ao diluidor.

- **Desinfetantes**

O uso de desinfetantes e anti-sépticos é prejudicial ao espermatozoide e por isso deve ser evitado. A esterilização dos equipamentos com álcool 70% e água é suficiente. Materiais de vidro podem ser esterilizados em calor seco em estufas de esterilização.

- **Longo tempo de exposição ao ar**

O oxigênio presente no ar aumenta a atividade metabólica do espermatozoide podendo resultar no aumento da produção de radicais livres, que em altas concentrações são prejudiciais ao espermatozoide, diminuindo sua viabilidade. Além disso, com o aumento do metabolismo ocorre acúmulo de ácido láctico no sêmen que pode reduzir o pH para abaixo do ótimo 7,0 reduzindo assim a viabilidade do espermatozoide. Após a coleta o sêmen deve ser usado na inseminação ou armazenado o mais rápido possível.

- **Capacidade tampão do diluidor**

O meio usado para diluir o sêmen deve ter a capacidade de manter o pH ótimo (7,0) no sêmen diluído. Variações no pH acima (alcalino) ou abaixo de 7,0 (ácido) reduzem a viabilidade do espermatozoide.

- **Pressão osmótica do diluidor**

È a pressão exercida sobre a membrana plasmática, pelas partículas de soluto dissolvidas no meio ao redor do espermatozoide. Essa pressão faz com que a água se mova ou não através da membrana e é proporcional à concentração de soluto no meio. O meio em que a concentração de soluto é equivalente a que está dentro da célula é chamado *isotônico*. Meio com concentração de soluto mais baixa é *hipotônico* e aquele em que a concentração de soluto é mais alta é *hipertônico*. Tanto os meios hipotônicos quanto os hipertônicos são prejudiciais ao espermatozoide. Os espermatozoides permanecem móveis por um período mais longo quando estão suspensos em um meio isotônico (300 mOsm/L) e somente uma pequena variação na tonicidade do diluidor não afeta a viabilidade espermática.

## 8.1 Coleta do sêmen

A coleta do sêmen em bodes e carneiros pode ser feita por dois métodos: a vagina artificial ou a eletro ejaculação. O método da vagina artificial é o preferido, por imitar melhor as condições de temperatura e pressão do aparelho reprodutor da fêmea e proporcionar a obtenção de um sêmen de melhor qualidade (Figura 13 e 14).

A eletro-ejaculação pode ser usada quando é necessário colher o sêmen de um macho que não é treinado para coleta em vagina artificial ou quando se realiza exame andrológico de um grande número de animais. A desvantagem desse método é que durante a estimulação elétrica o sêmen pode ser contaminado por urina. Geralmente o volume do ejaculado é maior, mas a concentração é menor do que aquele coletado por vagina artificial.

A frequência de coleta depende da idade, condição corporal e temperamento do animal. À medida que aumenta o número de ejaculados sucessivos, o volume e concentração do sêmen diminuem. Para bodes e carneiros, um regime de 2-3 coletas diárias em dias alternados é considerado normal e não causa grande redução na qualidade do sêmen.

### Requisitos necessários antes de iniciar a coleta de sêmen

- Treinar os machos a ejaculem em vagina artificial;
- Realizar esse treinamento de preferência, no local onde serão feitas as futuras coletas e pela pessoa encarregada de efetuá-las.

### No momento da coleta

- Ter uma fêmea da mesma espécie em cio para estimular o macho;
- Pode-se utilizar uma fêmea em cio natural ou induzido hormonalmente (fêmea estrogenada) conforme o esquema sugerido a seguir:

## Esquema para estrogenização da cabra ou ovelha

- Aplicar na fêmea uma injeção intramuscular de 50 µg benzoato de estradiol (1 ml de ECP);
- A manifestação do estro ocorre dentro de 24 a 48 horas após a injeção;
- Para manter a fêmea em estro por mais tempo repetir a aplicação do mesmo medicamento uma vez por semana.

## Coleta de sêmen pelo método da vagina artificial

A *vagina artificial* (VA) usada para bodes e carneiros consiste de um tubo rígido (de PVC), medindo 15 a 20 cm de comprimento e 5,5cm de diâmetro, revestido por uma membrana de borracha e com um dispositivo para entrada e saída de água. A membrana de borracha deve ser macia e flexível e ter cerca de 2-3 cm de comprimento a mais que o tubo rígido, em cada extremidade. Para efetuar a coleta procede-se da seguinte maneira:

- Preencher o espaço entre a membrana e o tubo rígido da vagina, com água a 48°C;
  - Tomar cuidado para evitar que a água respingue na membrana interna, se isto acontecer, deve ser completamente seca;
  - Acoplar um tubo de vidro graduado (aquecido a 30-37°C) em uma das extremidades da vagina artificial;
  - Se necessário, acrescentar ar de forma a proporcionar uma pressão adequada;
  - Verificar a temperatura interna, utilizando um termômetro. No momento da coleta a temperatura da vagina deve ser de 42-45° C;
  - Verificar a pressão introduzindo um dedo no orifício formado pela membrana. O mesmo deve deslizar para o interior da vagina sem muita dificuldade, ou seja, sofrendo uma pressão leve;
  - Limpar o prepúcio do macho com uma toalha de papel;
- Aproximar o reprodutor da fêmea em cio, devidamente contida;
- O operador deve então, se agachar ao lado do reprodutor;

- Esperar que o reprodutor realize o salto e exteriorize o pênis; Desviar cuidadosamente o pênis com a mão, pegando no prepúcio;
- E simultaneamente, com a outra mão, aproximar a vagina artificial para a penetração e ejaculação;
- Se ocorrer penetração na vagina artificial e o macho não ejacular, verificar a temperatura e a pressão da vagina; Imediatamente após a coleta, proteger o sêmen de luz solar, remover o tubo, identificar, cobrir e colocar em banho-maria a 33 -35° C.
- Após a coleta, a vagina deve ser lavada, enxaguada com água destilada e seca. Antes do uso a membrana de borracha deve ser desinfetada com álcool a 70% e esperar para que esteja totalmente seca.

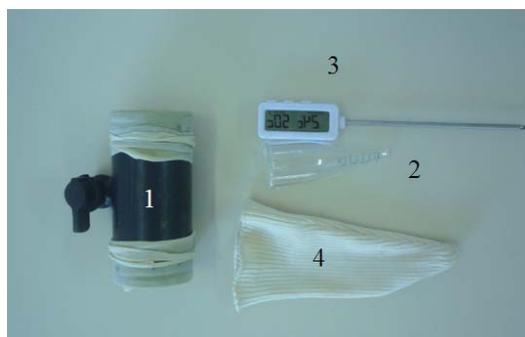


Figura 13: Equipamentos e materiais utilizados para a coleta do sêmen. 1- vagina artificial, 2- copo coletor, 3- termômetro, 4- camisa protetora.



Figura 14: Verificação da temperatura da vagina artificial



Figura 15: Coleta de sêmen – imobilização da fêmea



Figura 16: Coleta de sêmen pelo método da vagina artificial

## 8.2 Avaliação do sêmen

Após a coleta, cada ejaculado deve ser avaliado quanto a sua quantidade e qualidade. As características quantitativas são o volume e concentração (número de espermatozoides por ejaculado) e as características qualitativas incluem a motilidade, morfologia e a cor. Durante as avaliações todo o cuidado é necessário para não prejudicar a viabilidade espermática, lembrando-se que vários fatores afetam a viabilidade do espermatozoide após a coleta do sêmen (ver item 8).

Na fazenda, quando não é possível fazer uma avaliação completa, deve-se observar o volume, o turbilhonamento e a

consistência do sêmen diretamente no tubo de coleta e utilizar apenas os ejaculados com consistência leitosa ou cremosa.

### 8.2.1 Cor do sêmen

A cor do sêmen é avaliada através das paredes do tubo de coleta. A cor normal do sêmen de carneiros é o branco marmóreo ou creme claro e do bode é amarelado. A presença de sangue deixa o sêmen com coloração avermelhada e infecções no trato reprodutivo deixam o sêmen com coloração cinza ou marrom (Figura 17 e 18).

### 8.2.2 Volume do sêmen

É avaliado diretamente no tubo de coleta, que deve ser graduado. O volume médio do ejaculado de carneiros é 1,0ml e dos bodes 0,8 ml, variando com a idade, condição corporal e frequência de coletas (Figura 17 e 18)



Figura 17: Ejaculado de caprino



Figura 18: Ejaculado de ovino

### 8.2.3 Motilidade do espermatozoide

A avaliação da motilidade é feita de duas maneiras: a motilidade massal ou turbilhonamento e a porcentagem de espermatozoides progressivamente móveis. A avaliação de motilidade massal só é realizada no sêmen fresco. Quando o sêmen é diluído ou descongelado, faz-se apenas a avaliação da porcentagem de espermatozoides móveis e o vigor do movimento.

#### Motilidade massal ou turbilhonamento

É o tipo de movimento resultante da interação entre o movimento individual e a concentração espermática; os espermatozoides se deslocam com movimentos vigorosos formando ondas. Pessoas com visão acurada podem observar o movimento das ondas através do tubo de coleta, mas uma avaliação precisa só pode ser realizada com o uso de microscópio.

Uma gota de sêmen puro é colocada sobre uma lamina de vidro limpa e aquecida (37°C), e examinada sob microscópio óptico no aumento de 100x (objetiva de 10). A temperatura da lamina deve ser mantida durante a avaliação usando-se uma platina aquecedora no microscópio. A determinação do valor da motilidade é feita usando notas numa escala de 0 (ausência de movimentos) a 5 (máximo movimento de onda) como descrito na Tabela 5.

Tabela 5: Determinação da motilidade massal

Nota	Descrição do movimento das ondas
0	Totalmente sem movimento.
1	Apenas movimento individual de poucos espermatozoides. ± 10% de espermatozoides vivos.
2	Observam-se os movimentos espermáticos, mas não forma ondas. 20-40% de espermatozoides ativos.

- 3 Ondas de baixa amplitude e movimento lento. 45-65% de espermatozoides ativos.
- 4 Ondas rápidas e vigorosas, não forma redemoinho. 70 a 85% de espermatozoides ativos.
- 5 Ondas muito rápidas e densas que se juntam formando um redemoinho (difícil determinar ondas isoladas). 90% ou mais de espermatozoides vivos.

---

Fonte: Evans e Maxwell, (1987); Chemineau et al. (1991).

## Percentual de espermatozoides móveis

Esta avaliação é feita em uma gota de sêmen diluído, colocada entre lâmina e lamínula (37°C) e examinada em microscópio ótico no aumento de 200 ou 400x (objetiva de 20 ou 40x). Vários campos da lâmina são examinados e a porcentagem de espermatozoides progressivamente móveis é estimada. Essa avaliação pode ser confirmada comparando-a com a exata porcentagem de células vivas determinada pelo método de coloração vital (eosina/nigrosina, item 8.2.5).

Como o sêmen de carneiros e bodes é muito concentrado, para uma avaliação precisa, o mesmo deve ser diluído a uma concentração entre 60 e 200 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml. A diluição pode ser feita com soro fisiológico ou com um diluidor para sêmen fresco e refrigerado (item 8.3.2). É importante lembrar que nas amostras diluídas em meios contendo gema de ovo, leite ou glicerol (no caso de sêmen congelado) a viscosidade contribui para que os espermatozoides tenham uma motilidade mais lenta, mas não altera a porcentagem de espermatozoides progressivamente móveis.

A motilidade progressiva (trajetória pra frente) é a característica desejável. Movimento circular ou retrógrado é indicativo de choque térmico, contaminação com água ou diluidor hipotônico (erro na preparação). Quando esse padrão anormal de motilidade é observado, esses três fatores devem ser checados.

Na maioria das vezes a avaliação da motilidade espermáti-

ca é baseada em índices percentuais. No entanto, a valorização que melhor atende os objetivos práticos deve exprimir a porcentagem de espermatozoides móveis e o vigor da motilidade (Tabela 6).

Tabela 6: Determinação do tipo de movimento e vigor espermático

<b>Nota</b>	<b>Descrição do movimento</b>
0	Todos os espermatozoides são imóveis
1	Poucos espermatozoides mostram algum sinal de vida, com movimento fraco, tremendo ou com oscilação da cauda.
2	Espermatozoides com movimento oscilatório e desorganizado e deslocamento lento alguns se movem mais rápido, grande número de espermatozoides imóveis.
3	Prevalecem os espermatozoides com movimento circular, alguns com trajetória progressiva, sem movimento oscilatório (tremor), metade são imóveis.
4	A maioria dos espermatozoides tem movimentos rápidos, com trajetória progressiva e alguns com trajetória circular.
5	Todos ou quase todos os espermatozoides exibem enérgicos movimentos progressivos.

Fonte: Mies Filho (1982); Chemineau et al. (1991).

#### **8.2.4 Concentração espermática**

É a medida usada para determinar o número de espermatozoides por unidade de volume. Normalmente é expressa em número de espermatozoides por  $\text{mm}^3$  ou por mL. Existem diferentes possibilidades para medir a concentração:

- Apreciação visual da consistência do ejaculado;

Contagem exata do número de espermatozoides em hematocítômetro (câmara de Neubauer) ou

- Medida da densidade ótica da amostra em espectrofotômetro.

Os métodos variam em sua rapidez e acurácia. O método da consistência não é preciso, mas é rápido e adequado às condições de trabalho a campo. O método do hematocítômetro é mais lento, mas é mais preciso. O método espectrofotométrico tanto é rápido quanto preciso, mas o equipamento nem sempre está disponível.

## **Avaliação da concentração pelo método da Câmara de Neubauer**

A câmara de Neubauer é uma lâmina de viro espessa composta por duas áreas (A e B) contendo divisões em forma de grade no centro da área. A grade de contagem é dividida em 16 ou 20 quadrados grandes delimitados por linhas duplas ou triplas, que são subdivididos em 16 quadrados pequenos.

O princípio do método é contar o número exato de espermatozoides presentes em determinado volume a partir de uma solução de diluição conhecida.

Os passos para executar a técnica são os seguintes:

- Diluir uma amostra de 0.01 ml (10  $\mu$ l) de sêmen puro em 4 ml de água destilada ou solução de formol salina (1/400);
- Preparar a câmara de Neubauer colocando uma lamínula sobre a área de contagem. Para que a lamínula fique aderida à câmara, umedeça as bordas que rodeiam a área de contagem com saliva ou vaselina, coloque a lamínula e faça uma pressão sobre ela.
- Aspire com uma pipeta uma pequena quantidade da solução contendo os espermatozoides e introduza entre a lâmina e a lamínula, cuidando para que o líquido não transborde a área delimitada e não fiquem áreas com bolhas de ar.
- Deixe a câmara na posição horizontal por alguns minutos para que os espermatozoides se assentem;
- Coloque a câmara na plataforma do microscópio e focalize a

área de contagem em um aumento pequeno (40 ou 100x) passe então para o aumento de 400x para realizar a contagem.

- Conte no mínimo 10 quadrados maiores/ejaculado (5 em cada área de contagem). Somente serão considerados os espermatozoides que estiverem no interior de cada quadrado e aqueles cujas cabeças se encontram nas linhas que formam o ângulo inferior esquerdo de cada quadrado (entrando no quadrado);

- A concentração de espermatozoides/ml de sêmen é calculada multiplicando-se o número de espermatozoides contados nos 10 quadros por 10.000.000, ou seja:

$C = A + B \times 10^7$  espermatozoides/ml;

- Exemplo: se foram contados 360 espermatozoides a concentração é  $360 \times 10.000.000 = 360 \times 10^7$  ou  $3,6 \times 10^9$  espermatozoides/ml.

- Se a diluição for de 1:200 calcula-se a média das duas contagens e o resultado será  $C = (A + B)/2 \times 10^7$  espermatozoides/ml.

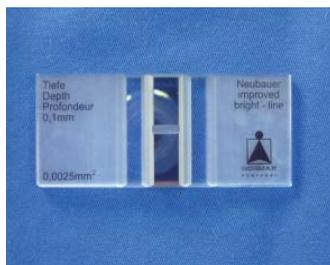


Figura 19: Câmara de Neubauer. Área de contagem A e B

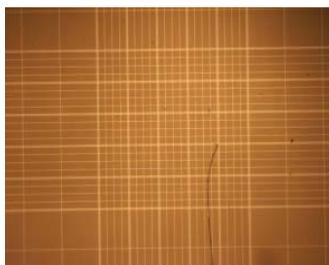


Figura 20: Identificação do local de contagem

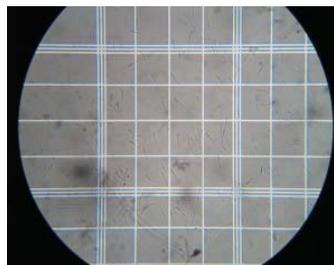


Figura 21: Câmara de Neubauer preenchida com sêmen

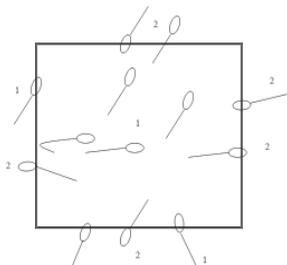


Figura 22: Modo de contagem dos espermatozoides na câmara. São contados apenas os espermatozoides na posição 1.

## Avaliação da concentração com base na consistência do sêmen

A consistência do sêmen depende da proporção entre espermatozoides e plasma seminal. Sêmen de consistência espessa contém mais espermatozoides que aquele fino ou aquoso. Assim, a avaliação da consistência do sêmen é uma maneira simples e rápida de estimar a concentração espermática. Na Tabela 7 são apresentados os valores de concentração do sêmen de bodes e carneiros de acordo com a sua consistência. Para elaboração da tabela, o número de espermatozoides foi determinado usando câmara de Neubauer. Sêmen opaco e aquoso não deve ser usado em inseminação artificial.

Tabela 7: Concentração do sêmen de carneiro e bode de acordo com a consistência do sêmen

Consistência	Número de espermatozoides ( $\times 10^9/\text{ml}$ )	
	Média	Variação
Cremoso espesso	5,0	4,5-6,0
Cremoso	4,0	3,5-4,5
Cremoso fino	3,0	2,5-3,5
Leitoso	2,0	1,0-2,5
Opaco	0,7	0,3-1,0
Aquoso	insignificante	

Fonte: Evans e Maxwell (1987).

### 8.2.5 Morfologia do espermatozoide

A avaliação da morfologia espermática é um teste para determinar a qualidade do sêmen. Normalmente o ejaculado contém cerca de 5 a 10% de espermatozoides anormais, sem ter nenhum efeito adverso na fertilidade, mas se o percentual de células anormais for maior que 20-25% pode-se esperar uma redução na fertilidade do sêmen.

A porcentagem de espermatozoides anormais pode variar com

a época do ano, temperatura ambiental, idade (puberdade), nutrição, doenças e quaisquer fatores estressantes.

Durante a rotina de processamento do sêmen, a avaliação da morfologia espermática não é realizada em cada ejaculado devido ao longo período de tempo necessário para executá-la. Normalmente a avaliação é feita durante o exame andrológico para seleção de doadores e repetida mensalmente. Além disso, espermatozoides anormais podem ser visualizados enquanto se avalia a motilidade. Se observados em grande número, pode ser usado como um indicativo da necessidade de fazer uma avaliação morfológica do ejaculado.

A técnica mais utilizada para a avaliação da morfologia espermática é a microscopia de contraste de fase e a microscopia de campo claro, em amostras submetidas à coloração.

### **Avaliação da morfologia pelo método de coloração Eosina-nigrosina**

O corante eosina-nigrosina é amplamente utilizado na rotina de avaliação da morfologia do espermatozoide e na determinação da porcentagem de células mortas.

A eosina é um corante que não atravessa a membrana de células vivas, atravessa apenas a membrana de células mortas. Durante o exame, os espermatozoides que estavam vivos aparecem brancos (não corados) e os mortos apresentam a cabeça corada de rosa acinzentado. Aparecem também espermatozoides parcialmente corados (metade da cabeça corada e outra metade não), estes devem ser incluídos no número de mortos. Alguns autores consideram estas células como moribundas ou que morreram recentemente.

A porcentagem de vivos na amostra pode ser usada como forma de verificar a determinação da motilidade. Mas deve-se ter em mente que a porcentagem de espermatozoides vivos sempre é um pouco maior que a porcentagem de motilidade.

### Preparação do corante

Existem várias combinações que dão bons resultados, geralmente consiste de:

Eosina (hidrosolúvel) — 1 g  
Nígralina (hidrosolúvel) — 5 g  
Citrato de sódio (2H<sub>2</sub>O) — 2,9 g  
H<sub>2</sub>O destilada p/ — 100 ml

Prepare primeiro a solução de citrato de sódio em água destilada (100ml). Coloque em banho-maria quente (50-70°C) e com esta solução dilua os corantes. Misture bem com bastão de vidro até obter uma mistura homogênea. Deixe descansar por 24 horas e então filtre, coloque em frasco de vidro escuro e armazene a  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ . O pH da solução deve ficar entre 6,7- 6,8 se necessário ajustar com solução de ácido cítrico.

### Preparação das lâminas

- Coloque 1-2 gotas de corante na extremidade de uma lâmina de vidro limpa e aquecida (37°C);
- Adicione uma pequena gota de sêmen puro ou diluído e misture com o corante por 10 segundos. Lâmina, sêmen e corante devem estar na mesma temperatura (37°C);
- Deixe a mistura descansar por cerca de 30 segundos;
- Faça um esfregão fino e uniforme:
  - Pegue uma segunda lâmina, coloque sua borda contra a superfície da primeira, em frente à mistura sêmen+corante, formando um ângulo de 45°;
  - Puxe a lâmina para trás de modo que entre em contato com a gota da mistura sêmen+corante, pressionando-a até que a gota se espalhe por toda a borda da lâmina.
  - Deslize a lâmina para a frente, guardando sempre o mesmo ângulo, em um só movimento, firme e uniforme, sem separar

uma lâmina da outra.

-Identifique a lâmina;

-Espere secar antes de examinar. As lâminas devem ser secas rapidamente em uma mesa aquecedora (55 a 60°C) para evitar que alguns espermatozoides ao morrer absorvam o corante antes que o processo de secagem se complete, dando uma falsa indicação da porcentagem de vivos.

-Armazene em local seco até a realização do exame.

Figura 23: Preparação do esfregaço

### Contagem dos espermatozoides

Coloque a lâmina na plataforma do microscópio, focalize e realize a leitura no aumento de 1000x, sob imersão.

Examine no mínimo 100 espermatozoides em diferentes campos da lâmina. Quanto maior o número de espermatozoides avaliados maior a precisão do exame.

Anote o número de espermatozoides normais e anormais.

Os espermatozoides anormais podem ser classificados em cinco categorias diferentes:

Espermatozoides sem cauda (cabeça isolada normal ou anormal);

Espermatozoides com anormalidade na cabeça e acrossomo: (cabeça estreita, piriforme, gigante, pequena, estreita na base,

acrossomo destacado, enrugado, com bolhas, knobbed, etc);  
Espermatozoides com anormalidades na cauda e peça intermediária: (cauda dobrada, fortemente dobrada, enrolada, enrolada na ponta, peça intermediária quebrada, engrossamento, pseudogota);  
Espermatozoides com gota citoplasmática proximal;  
Espermatozoides com gota citoplasmática distal.  
Sêmen com mais que 20% de espermatozoides anormais, não deve ser utilizado para inseminação artificial.

Figura 24: Morfologia do espermatozoide ovino. 1- espermatozoide normal, 2-cauda dobrada com gota protoplasmática distal, 3- cauda fortemente dobrada.

Figura 25: Teste de coloração vital (eosina-nigrosina) do esper-

matozoide caprino. 1- espermatozoide vivo, 2- espermatozoide morto.

### Avaliação da morfologia espermática em câmara úmida

O exame é realizado em microscópio com contraste de fase.

Diluir uma amostra de sêmen em solução de formol salino tamponado ou solução de citrato de sódio formolada (96 ml de solução de citrato de sódio 2,94% + 4 ml de formol comercial);

Colocar uma gota do sêmen assim diluído sobre uma lâmina e cobrir com lamínula;

Se desejar conservar o material por mais tempo deve-se vedar o contorno da lamínula com esmalte incolor, para evitar o extravasamento da amostra.

Levar a lâmina ao microscópio contraste de fase no aumento 1000x sob imersão;

Realizar a contagem.

### 8.3 Processamento e conservação do sêmen

Uma vez coletado e avaliado, o sêmen pode ser utilizado de três formas: fresco (puro ou diluído), resfriado ou congelado.

De acordo com a forma de utilização que será dada ao sêmen faz-se a escolha do diluidor, a diluição e o processamento necessário antes da utilização.

#### 8.3.1 Diluição do sêmen

A principal razão para se diluir o sêmen antes do uso na inseminação artificial é obter um maior aproveitamento do ejaculado. Durante a monta natural um carneiro ou bode fértil deposita bilhões de espermatozoides na vagina da fêmea. No entanto,

somente alguns milhares desses espermatozoides penetram a cérvix. Quando se usa a IA, tanto o volume quanto o número de espermatozoides na dose inseminante podem ser reduzidos em comparação com a inseminação natural. O limite mínimo para se obter uma taxa de concepção aceitável é de 100 milhões de espermatozoides móveis por dose inseminante. Isso possibilita a inseminação de um grande número de fêmeas com um único ejaculado.

A diluição do sêmen deve ser feita o mais rápido possível, após a coleta e avaliação. Tanto o sêmen quanto o diluidor devem ser colocados em banho-maria a 30 –32°C, e deve estar na mesma temperatura no momento da diluição.

Existem vários tipos de diluidores para sêmen caprino e ovino, compostos de diferentes ingredientes. No entanto um bom diluidor deve ter as seguintes propriedades:

Fornecer nutrientes para o espermatozoide;

Ter capacidade tampão, para prevenir as mudanças no pH;

Proporcionar um ambiente isotônico (osmolaridade igual a do plasma seminal);

Proteger o espermatozoide contra o choque de temperatura durante o resfriamento;

Proteger o espermatozoide contra as lesões à membrana plasmática durante a congelação e descongelação;

Controlar a proliferação microbiana;

Preservar a vida do espermatozoide com um mínimo de prejuízo à sua fertilidade.

Os componentes mais utilizados nos diluentes para criopreservação são glicose e frutose como fonte de energia; Tris, citrato de sódio ou tampão fosfato, como componente tampão; a gema de ovo ou o leite como protetor contra o choque térmico; o glicerol como crioprotetor e os antibióticos (c/ penicilina, estreptomicina, gentamicina, etc.) como agentes antimicrobianos.

No entanto, diversos outros compostos têm sido testados com a finalidade de melhorar a viabilidade do espermatozoide criopreservado, entre eles antioxidantes, aminoácidos, di e trissacarídeos (lactose, trealose, rafinose).

### Taxa de diluição

Para calcular a exata taxa de diluição é necessário conhecer o volume do ejaculado, a concentração e a motilidade espermática do ejaculado, assim como estabelecer o volume e concentração desejada na dose inseminante.

Para uma dose com  $100 \times 10^6$  espermatozoides móveis em palheta de 0,25 ml, a concentração final no sêmen diluído será de  $400 \times 10^6$  espermatozoides/ml. Com essa informação calcula-se o volume do diluidor que será acrescido ao ejaculado.

Por exemplo, se o ejaculado possui:

Volume:  $V_i = 1,2$  ml

Concentração:  $C_i = 3\,600 \times 10^6$  espermatozoides/ml

Motilidade:  $M = 85\%$

Total de espermatozoides no ejaculado:  $CT = V_i \times C_i = 4320 \times 10^6$  spz

Total de espermatozoides viáveis no ejaculado:  $N^\circ v = CT \times M/100 = 3672 \times 10^6$  spz

Concentração desejada na dose:  $C_d = 100 \times 10^6$  spz viáveis

Volume da palheta:  $V_p = 0,25$  ml

Número de doses:  $ND = N^\circ v / C_d = 36,7$  doses

Volume de diluidor a ser adicionado:  $V_d = (ND \times V_p) - V_i = 7,98$  ml

Pode-se também, fazer a diluição com base no volume, consistência (Tabela 7) e na motilidade massal (Tabela 5), por exemplo, se:

Volume do ejaculado = 1,2 ml

Consistência: Cremoso =  $4,0 \times 10^9$  spz/ml

Motilidade massal: 4 = 85% vivos

Assim:

$$CT = M \times V \times C/100$$

$$(85 \times 1,2 \times 4,0 \times 10^9) / 100 = 4,1 \times 10^9 \text{spz} = 4100 \times 10^6 \text{spz viáveis}$$

Dose:  $150 \times 10^6$ spz (maior margem de segurança já que o valor da CT foi estimado)

ND = 27 doses

$$Vd = 6,75 - 1,2 = 5,6 \text{ ml diluidor}$$

### Etapas da diluição

Preparar um banho-maria ( $32^\circ\text{C}$ ) com raque para colocar tubo de coleta e tubo com diluidor;

Colocar o tubo contendo o diluidor no banho-maria;

Após coleta, identificar o tubo de coleta, anotar volume, avaliar a motilidade e a concentração do ejaculado;

Calcular a taxa de diluição;

Com uma pipeta calibrada aspirar a quantidade apropriada de diluidor;

Adicionar o diluente ao sêmen lentamente ( $32^\circ\text{C}$  ou temperatura ambiente). O diluente deve ser sempre adicionado ao sêmen e nunca o contrário, pois pode causar choque ao espermatozoide.

Misturar o sêmen com o diluente cuidadosamente;

Reavaliar a motilidade espermática no sêmen diluído;

Cobrir o tubo e armazenar de acordo com a forma de uso.

### 8.3.2 Processamento do sêmen fresco e resfriado

Para garantir a capacidade fecundante do espermatozoide durante o tempo entre a ejaculação e o uso é necessário que se faça o processamento adequado do mesmo.

A inseminação com sêmen recém-colhido (fresco), sem nenhuma redução de temperatura para sua conservação, é possível quando ambos os processos são realizados no mesmo local. O sêmen fresco pode ser utilizado puro ou diluído e deve ser mantido em banho-maria a 32-35°C ou à temperatura ambiente (em regiões quentes) ao abrigo da luz solar e usado imediatamente.

O resfriamento consiste em reduzir a temperatura do sêmen de 32°C, temperatura de diluição, para a temperatura de armazenamento, 15°C ou 5°C. A redução da temperatura diminui o metabolismo basal do espermatozoide aumentando a sua longevidade. No entanto, a redução da temperatura deve ser feita lenta e progressivamente para evitar o choque térmico para o espermatozoide, reduzindo a sua viabilidade.

### Diluentes para sêmen fresco e resfriado

Existem vários tipos de diluidores para sêmen caprino e ovino, entretanto, os mais utilizados são aqueles à base de leite de vaca desnatado ou aqueles contendo gema de ovo.

Os diluentes sem gema de ovo podem ser preparados no dia anterior à coleta de sêmen e depois de prontos guardados em geladeira ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ) e utilizados, no máximo, dentro de 2-3 dias. Já os diluentes com gema de ovo, devem ser frescos, preparados e usados no mesmo dia.

### DILUENTE À BASE DE LEITE DE VACA DESNATADO PARA SÊMEN CAPRINO

---

Leite em pó desnatado (menos 1% gordura)	10 g
Glicose anidra	194 mg
Estreptomicina	100 mg
Penicilina potásica	100 000 UI
	100 ml

---

Água bidestilada (em vidro) p/

Fonte: Chemineau et al. (1991).

### Preparo do diluente

Dissolver a glicose na água destilada;  
Acrescentar o leite em pó e dissolvê-lo;  
Ferver esta solução em banho-maria por 15 minutos;  
Resfriar à temperatura ambiente;  
Acrescentar a penicilina e estreptomicina;  
Guardar em geladeira por 2-3 dias, no máximo.

### DILUENTE A BASE DE ÁGUA DE CÔCO PARA SÊMEN CAPRINO E OVINO

Água de coco filtrada	50 ml
Água bidestilada (em vidro)	25 ml
Solução citrato de sódio 5%	25 ml

Fonte: Nunes e Salgueiro (1999).

### Preparo do diluente

Filtrar a água de um coco com aproximadamente seis meses de idade (pH 4,4 a 4,8) e retirar a quantidade desejada;  
Acrescentar a água destilada e a solução de citrato de sódio;  
Verificar o pH da solução (ideal 6,8 a 7,2);  
Corrigir o pH com solução de hidróxido de sódio (se ácido) ou com solução de ácido clorídrico a 0,1 N (se alcalino).

### DILUENTE TRIS-GEMA PARA SÊMEN CAPRINO E OVINO

	Ovino	Caprino
Tris (hidroximetil)aminometano	3,634 g	3,634 g
Frutose	0,50 g	0,50 g
Ácido cítrico (monohidratado)	1,99 g	1,99 g
Gema de ovo	14 ml	2,5 ml
Água destilada (em vidro) p/	100 ml	100 ml

Fonte: Evans e Maxwell (1987).

### Preparo do diluente

Em um frasco de vidro, graduado;  
Diluir o Tris, o ácido cítrico e a glicose com parte da água destilada ( $\pm 80$  ml);

Acrescentar a gema de ovo;

Completar o volume final para 100 ml com a água destilada,

Cobrir o frasco com filme plástico ou tampa própria;

Misturar os ingredientes agitando o frasco várias vezes, para frente e para trás, até que a gema de ovo esteja bem diluída.

O diluidor deve ser preparado e usado no mesmo dia (não armazenar em geladeira para reutilizar).

O ovo usado deve ser novo, no máximo 4-5 dias de idade. Antes de abri-lo para retirar a gema, este deve ser lavado com água morna, esterilizado com álcool 70% e seco. Após quebrar o ovo, a gema é separada da clara (cuidado para não quebrar a membrana da gema) e colocada sobre um filtro de papel. Em seguida, role a gema gentilmente sobre o papel para remover toda a clara. Após remover a clara, quebre a membrana da gema, pressionando-a sobre o papel, e apare seu conteúdo dentro de um becker estéril. A membrana da gema deve permanecer no papel e ser descartada.

### Etapas do processamento

Diluir a amostra de forma a obter-se a concentração desejada;  
Armazenar em banho-maria ( $32^{\circ}\text{C}$ ) ou à temperatura ambiente e usar imediatamente para inseminação (sêmen fresco) ou;

Proceder o resfriamento:

Colocar o tubo contendo o sêmen diluído em um becker ou copo com água à  $32^{\circ}\text{C}$  ou temperatura ambiente;

Colocar o conjunto, becker c/ água + sêmen, dentro de um refrigerador ( $5^{\circ}\text{C}$ );

Colocar um termômetro dentro do becker com água para moni-

torar a redução da temperatura;  
Colocar também as palhetas e a substância de vedação dentro do refrigerador;  
A refrigeração deve ocorrer a uma taxa de 0,2 a 0,3°C/min;  
Nessa taxa, atinge-se a temperatura de 15°C em cerca de 60 min e 5°C em 120 minutos;  
Acrescentar pedras de gelo à água do copo, se a descida da temperatura estiver muito lenta, ou transferir o copo para uma prateleira mais baixa da geladeira, se a descida estiver muito rápida;  
Evitar descida brusca de temperatura na faixa de 18°C a 5°C, porque nessa faixa de temperatura o espermatozoide é muito susceptível ao choque térmico, se necessário reduzir a taxa de resfriamento para 0,2°C/min, na faixa de 15° a 5°C.  
Esperar atingir a temperatura desejada e envasar;  
Envasar o sêmen em palhetas de 0,25ml ou 0,5ml de acordo com os seguintes passos:  
Identificar as palhetas com o nome ou número do reprodutor, raça e data;  
Inserir a extremidade aberta da palheta no frasco contendo o sêmen diluído e aspirar na extremidade com o tampão de algodão, até o preenchimento da mesma;  
Bater levemente na extremidade aberta da palheta, para descartar um pouco do sêmen e formar uma bolha de ar;  
Vedar a palheta com álcool polivinílico (APV) ou com massa de modelar para crianças;  
Submergir a extremidade vedada com APV em um copo com um pouco de água (na temperatura de resfriamento) por alguns minutos;  
Secar cuidadosamente com papel e armazenar.  
Manter o sêmen na temperatura adequada (15° a 5°C) durante todo o período de armazenagem;  
Transportar em garrafa térmica ou caixa de isopor com gelo, cuidando para que as palhetas não fiquem em contato direto

com o gelo;

Utilizar em até 12 horas após o preparo.

### 8.3.3 Criopreservação do sêmen

Quando o sêmen é congelado e mantido a baixa temperatura, como no nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , o metabolismo do espermatozoide é completamente inibido. Isso possibilita o armazenamento do sêmen por um período prolongado.

Para o processamento do sêmen na forma congelada, é necessário dispor de laboratório com equipamentos e materiais adequados, bem como de um profissional qualificado e no caso de sêmen para comercialização, necessita ainda de credenciamento junto ao Ministério da Agricultura. Por isso é mais aconselhável e seguro para o criador, adquirir o sêmen congelado de uma central credenciada.

#### Diluentes para congelação

Os diluentes para congelação de sêmen caprino e ovino devem ter as mesmas características daqueles utilizados para sêmen fresco e refrigerado, ou seja, devem ser capazes de proteger contra as mudanças no pH e tonicidade, além de conter uma fonte de energia, um agente para proteger a célula do choque térmico durante o resfriamento e um agente crioprotetor para proteger o

espermatozoide contra os danos à membrana plasmática durante a congelção.

### TRIS-GLICOSE-GEMA PARA DILUIÇÃO EM UMA ETAPA

	Ovino	Caprino*
Tris (hidroximetil)aminometano	3,634g	3,786 g
Glicose (anidra)	0,50g	0,625 g
Ácido cítrico (monohidratado)	1,990g	2,172 g
Gema de ovo	15mL	2,5 ml
Glicerol	5mL	5 ml
Penicilina Potássica	100.000UI	100.000UI
Estreptomicina	0,100g	0,100g
Água destilada asp	100ml	100ml

Fonte: Evans e Maxwell (1987). \* sêmen não lavado

### DILUENTE À BASE DE LEITE DESNATADO PARA SÊMEN CAPRINO, DILUIÇÃO EM DUAS ETAPAS

	Meio I	Meio II
Leite em pó desnatado (me- nos 1% gordura)	10 g	10 g
Glicose Anidra	194 mg	194 mg
Glicerol	-	14 ml
Penicilina Potássica	100.000UI	100.000UI
Estreptomicina	0,100g	0,100g
Água Destilada p/	100 ml	100 ml

Fonte: Chemineau et al. (1991). Preparar o diluente da mesma forma descrita no ítem 8.3.2. Adicionar o glicerol após atingir a temperatura ambiente.

### TRIS-GLICOSE-GEMA PARA SÊMEN OVINO, DILUIÇÃO EM DUAS ETAPAS

	Meio I	Meio II
Tris (Hidroximetil)Aminometano	3,028g	3,028g
Glicose (anidra)	0,20g	0,20g
Ácido Cítrico (monohidratado)	1,675g	1,675g
Gema de Ovo	20mL	20mL
Glicerol	-	14mL

OEP (Orvus es paste)*	-	1%
Penicilina Potássica	100.000UI	100.000UI
Estreptomina	0,100g	0,100g
Água Destilada p/	100 ml	100 ml

Fonte: Maia (2006). \* OEP (Orvus es Paste) é um detergente usado como dispersor de fatores de proteção existentes no plasma seminal e na gema de ovo.

Preparar o diluente da mesma forma descrita no item 8.3.2. Meio II: adicionar o OEP, homogeneizar a solução e completar p/ 100 ml. Retirar 14 ml e descartar e em seguida acrescentar o mesmo volume de glicerol.

### Processamento do sêmen congelado

Durante a congelação do sêmen é necessário realizar todas as operações feitas para o sêmen resfriado, como: diluição, resfriamento, acondicionamento em palhetas, para então realizar o congelamento. No caso do sêmen caprino, além dessas etapas também é necessário proceder a retirada do plasma seminal. Esse procedimento é necessário devido a existência de enzimas no plasma seminal do bode, que atuam sobre os fosfolipídios do diluidor liberando compostos tóxicos ao espermatozoide. Diluidores que contêm leite ou gema de ovo em sua composição são ricos em fosfolipídios, por isso, para utilizá-los o sêmen deve ser lavado antes da diluição. No caso da gema de ovo, se a sua concentração não ultrapassar 2,0% no sêmen diluído não é necessário remover o plasma seminal antes da diluição.

### Lavagem do sêmen caprino

A retirada do plasma seminal deve ser feita imediatamente após a coleta. Para isso, diluir o sêmen com uma solução Krebs-Ringer-fostato ou solução a base de Tris-frutose e então centrifuga-

lo, conforme as seguintes etapas:

Preparar a solução de lavagem no dia anterior a coleta;

Colocar um tubo com a solução de lavagem no banho-maria (30-32°C);

Logo após a coleta, diluir o ejaculado (32°C) com a solução de lavagem na proporção de 1:9;

Centrifugar a 500 -600 x g por 10-15 minutos;

Descartar o sobrenadante usando uma pipeta;

Adicionar ao tubo o mesmo volume da solução de lavagem (à temperatura ambiente) e centrifugar novamente;

Descartar o sobrenadante e adicionar o diluidor à temperatura ambiente.

### SOLUÇÃO DE LAVAGEM (Krebs-Ringer-Fosfato)

Solução Inicial	Volume de Solução Inicial (ml) na Solução final
Cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%	100 ml
Cloreto de potássio (KCl) a 1,15%	4,0 ml
Cloreto de cálcio (CaCl <sub>2</sub> ) a 1,22%	3,0 ml
Fosfato de potássio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) a 2,11%	0,4 ml
Sulfato de magnésio (MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O) a 3,82%	1,0 ml
Tampão fosfato pH 7,4*	12,0 ml
Glicose anidra (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ) a 5,34%	4,5 ml
Misturar as soluções nessa ordem	

Fonte: Chemineau et al. (1991)

#### Preparo da Solução

Preparar cada solução em água bidestilada, nas concentrações finais recomendadas e reservar;

Preparar o tampão fosfato:

Dissolver 35,81 g de fosfato de sódio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12 H<sub>2</sub>O) em 20 ml HCl/N;

Adicionar água bidestilada p/ volume de 1000 ml.

Solução HCl/N (d=1,19): 50 ml de água bidestilada + 84,7 ml de HCl (ácido clorídrico), homogeneizar a solução e acrescentar água destilada até obter 1000 ml de volume final de solução.

Preparar a solução final Krebs-Ringer-Fosfato misturando as quantidades indicadas de cada solução inicial, na ordem em que foram listadas.

#### SOLUÇÃO DE LAVAGEM (Tampão Tris-frutose)

Tris (Hidroximetil)aminometano	3,605 g
Ácido Cítrico (monohidratado)	2,024 g
Frutose	1,488 g
Água destilada para	100 ml

Preparo: diluir os compostos em água destilada, misturar e completar o volume p/ 100 ml (pH 7,0).

#### Etapas da congelação em palhetas

Calcular a taxa de diluição e obter o volume total de diluidor a ser acrescentado ao sêmen;

Diluir o sêmen em uma ou em duas etapas.

Diluição em uma etapa: diluir o sêmen, a 30°C ou à temperatura ambiente, acrescentando o volume total do diluente, já contendo o crioprotetor e então resfriar à 5°C.

Diluição em duas etapas: dividir o volume total do diluente em duas partes iguais, uma do meio I (sem glicerol) e a outra do meio II (contendo glicerol). Proceder a primeira diluição do sêmen, a 30°C ou à temperatura ambiente, com a fração não glicerolizada do diluente. Levar o sêmen à geladeira para resfriar. Quando atingir 5°C fazer a segunda diluição.

2ª diluição: dividir a quantidade necessária do meio II (com glicerol) em três alíquotas de volume igual e adicioná-las ao sêmen, a intervalos de 10 minutos.

Refrigerar o sêmen:

Seguir as etapas descritas no item 8.3.2;  
Colocar o frasco com o meio II, as palhetas e a substância de vedação no refrigerador;  
Quando atingir 5°C fazer a segunda diluição (no método de diluição em duas etapas)  
Envasar: como descrito no item 8.3.2  
Congelar o sêmen:

A congelação pode ser feita usando uma máquina de congelação automática, onde a redução da temperatura ocorre automaticamente e de forma controlada ou conforme as orientações a seguir:

Colocar o nitrogênio líquido ( $N_2L$ ) em uma caixa de isopor, na quantidade necessária para atingir a temperatura de pré-congelação (-75 a -100°C) no vapor de nitrogênio. O controle da temperatura deve ser feito com termômetro eletrônico acoplado a uma palheta;

Distribuir as palhetas horizontalmente, em uma prateleira metálica apropriada (a 5°C);

Realizar a pré-congelação em vapor de nitrogênio:

Existem diferentes recomendações de altura e tempo de exposição ao vapor de nitrogênio, dependendo do ritmo de congelação desejado. A velocidade do resfriamento é regulada pela distancia entre a palheta e o nível do  $N_2L$ . Quanto maior a altura em que o porta-palhetas se encontra, mais lento é o ritmo da congelação. O espermatozoide ovino tolera uma ampla variação na velocidade de congelação. A suspensão das palhetas em vapor de nitrogênio com temperatura entre -75 °C e -125 °C não afeta a sobrevivência do espermatozoide. Já o espermatozoide caprino é menos tolerante. Geralmente, é recomendada a exposição das palhetas a uma temperatura de -75 °C no vapor de nitrogênio.

Para sêmen caprino e ovino Evans e Maxwell (1987) recomendam:

Colocar a prateleira com as palhetas sobre o vapor de nitrogênio a uma distancia de 3-4 cm do nível do nitrogênio por 7-8 minutos e então submergir as palhetas no nitrogênio líquido.

Chemineau et al. (1991) recomendam:

Para sêmen caprino em palhetas de 0,5 ml: 5 minutos a 4 cm do nível do nitrogênio;

Palhetas de 0,25 ml: 2 min a 16 cm + 3 min a 4 cm do nível do nitrogênio.

Para sêmen ovino em palhetas de 0,5ml: 8 minutos a 20 cm do nível do nitrogênio.

Outras taxas de congelação utilizadas com bons resultados são: Sêmen caprino: 20 minutos à 5 cm do nível do nitrogênio (Bittencourt et al., 2004);

Sêmen ovino: 20 minutos à 3 cm do nível do nitrogênio (Rodello, 2006)

Mergulhar as palhetas no  $N_2L$ ;

Colocar as palhetas em raques próprias;

Armazenar em botijão criogênico até o uso.

Armazenamento e manipulação do sêmen congelado  
Manter o sêmen submerso no nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ ;  
Transportar em botijões criogênicos;  
Descongelar a dose imediatamente antes do uso.

Figura 31: Armazenamento e manipulação do sêmen congelado

Cuidados com o botijão de sêmen

Manipular o botijão com cuidado evitando pancadas, movimentos bruscos e tombamento;  
De preferência, acondicioná-lo em uma caixa de madeira, para maior proteção;  
Transportar o botijão em caixas de madeira, preso na posição vertical, mesmo quando estiver vazio (nunca deve ser transportado

solto em carrocerias de veículos);  
Medir regularmente o nível do nitrogênio com a régua que acompanha o botijão;  
Nunca deixar que o nível do nitrogênio fique abaixo 15cm;  
Reabastecer o botijão quando o nível do nitrogênio estiver próximo ao mínimo;  
Manter o botijão em ambiente ventilado, seco, ao abrigo de raios solares, fechando-o apenas com sua tampa própria; nunca vedar a tampa para impedir a evaporação do líquido;  
Manusear canecas e raques com cuidado para evitar acidentes (o contato do nitrogênio com as partes do corpo pode causar ferimentos);  
Evitar que as canecas e raques sejam levantadas várias vezes à procura de sêmen de um determinado reprodutor;  
Identificar as canecas e raques com o nome dos reprodutores para facilitar a localização no momento da inseminação;  
Manter o controle adequado do uso e aquisição de sêmen.

Descongelação do sêmen:

Retirar a palheta do botijão;  
Mergulhar imediatamente, em água a 37 °C por 30 segundos;  
Secar a palheta com papel, antes do uso.

## 9.0 A TÉCNICA DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL CERVICAL

As cabras e ovelhas podem ser inseminadas, basicamente, por dois métodos: a inseminação cervical e a inseminação intrauterina por laparoscopia.

A inseminação cervical é o método mais utilizado tanto em cabras como em ovelhas. Nesse método, o sêmen é depositado na entrada da cérvix (ovelha e maioria das cabras) ou, se possível,

dentro do útero, conforme as etapas descritas a seguir.

### 9.1 Equipamentos

Os equipamentos utilizados para a inseminação cervical são um espéculo vaginal, uma fonte de luz e um aplicador de sêmen.

Existem dois tipos de espéculo: o tubular e o bico de pato. O bico de pato proporciona melhor visibilidade e localização da cérvix e é mais fácil de limpar. Alguns espéculos têm a fonte de luz embutida, caso não tenha, pode ser usada uma lanterna pequena, tipo caneta.

Vários tipos de seringas e pipetas são usados na inseminação cervical. Mas, o aplicador modelo universal é o mais popular devido ao grande uso na inseminação de bovinos. Esse modelo também é o mais adequado ao uso quando o sêmen é armazenado em palhetas.

Figura 32: Equipamentos utilizados na inseminação artificial. 1- espéculo bico de pato, 2- espéculo tubular, 3- aplicador de sêmen, 4- bainha do aplicador.

### Procedimentos Necessários Antes da Inseminação

Preparar as fêmeas que serão inseminadas, colocando-as em uma baía ou curral próximo ao local onde a inseminação será realizada

algumas horas antes do início dos trabalhos, mantendo-as em condições normais, com acesso a água e comida e evitando ao máximo condições de estresse (gritos, movimentação dos animais, presença de cães, etc).

Definir o horário da inseminação, considerando o número de inseminações que serão realizadas (uma ou duas) e a espécie com que se está trabalhando.

Avaliar a qualidade do sêmen, analisando uma amostra antes de iniciar os preparativos para a inseminação, e utilizando apenas sêmen com no mínimo 30% de motilidade e vigor 3 (CBRA, 1998).

### 9.3 Etapas da Inseminação Cervical

#### 9.3.1 Preparo do sêmen

Retirar rapidamente a palheta da caixa térmica (sêmen resfriado) ou do botijão (sêmen congelado);

Colocar em um recipiente com água à 37°C por 30 segundos (sêmen congelado);

Secar a palheta com papel limpo;

Cortar a extremidade vedada com álcool polivinílico e encaixá-la na bainha;

Colocar a bainha no aplicador;

Segurar o aplicador entre os lábios e dirigir-se à fêmea que será inseminada, a qual já deverá estar imobilizada.

#### 9.3.2 Imobilização da fêmea

Levantar o trem posterior da fêmea de forma a permitir que a vulva fique na altura dos olhos do inseminador, prendendo a cabeça da mesma entre as pernas (Figura 26); ou

Levantar o trem posterior da fêmea apoiando os membros traseiros sobre uma viga, sacos de ração ou fardos de feno;

Manter a fêmea na posição correta enquanto limpa a vulva com papel seco, se necessário.

### 9.3.3 Introdução do espécúlo e deposição do sêmen

Introduzir cuidadosamente, na vagina da fêmea segurando-o com a mão direita e abrindo os lábios vulvares com a mão esquerda; Se usar um espécúlo tipo “bico de pato”, este deve ser introduzido fechado na vagina, com as partes laterais do bico paralelas aos lábios vulvares;

Girar e abrir o espécúlo quando este penetrar cerca de 8-10 cm no canal vaginal;

Localizar o orifício de entrada da cérvix (orifício cervical);

Observar o tipo e quantidade de muco presente na vagina e drenar se necessário;

Colocar o aplicador na entrada do orifício cervical (Figura 28) e;

Introduzir cuidadosamente o aplicador na cérvix, fazendo movimentos rotacionais e para cima e para baixo, mas sem uso de força;

Nesse ponto, duas possibilidades podem ocorrer:

É impossível penetrar mais que 1-2 cm na cérvix, o que ocorre na ovelha e em grande número de cabras. Nesse caso, o inseminador deve puxar o aplicador para trás alguns milímetros (para evitar bloqueio pelo contato com as dobras cervicais) e depositar o sêmen lentamente. Este método é chamado de inseminação intra-cervical.

É possível transpor o canal cervical e introduzir a pipeta de inseminação no útero, o que pode ocorrer em número variado de cabras (20-80 %). Nesse caso, puxar o aplicador alguns milímetros, depositando o sêmen no corpo do útero. Este método é denominado inseminação intrauterina. A inseminação intrauterina está correlacionada com um aumento da fertilidade. No entanto, é de fundamental importância, que a cérvix não seja forçada pelo inseminador, pois quando lesionada, o contato com o sangue

mata os espermatozoides.

Retirar o aplicador e o espéculo;

Colocar a fêmea de pé cuidadosamente;

Massagear o clitóris;

Anotar os dados de identificação da fêmea, sêmen, condições e data da inseminação e finalmente;

Limpar e desinfetar o espéculo antes de usá-lo na próxima fêmea.

Figura 33: Inseminação artificial cervical em uma cabra

Figura 34: Visualização do local de aplicação do sêmen e intro-

dução do aplicador

#### 9.4 Momento Ideal Para Inseminar

O momento em que a inseminação é realizada interfere na fertilidade. Esse momento deve ser ajustado de acordo com a duração do estro e o momento da ovulação em cada espécie. Na inseminação cervical, maior sucesso é obtido quando a inseminação é realizada antes da ovulação, porém próximo ao horário da mesma. Para isso é necessária a detecção do estro.

No estro sincronizado não precisa detectar o estro e a inseminação pode ser feita em um horário pré-determinado em relação ao final do tratamento hormonal. Este tipo de inseminação é denominado IATF (inseminação em tempo fixo). Quando se realiza a sincronização hormonal, o momento da ovulação varia muito pouco entre os animais, ocorrendo em um curto intervalo de tempo na maioria deles. Na sincronização pelo método do progesterona + eCG, a maioria das fêmeas apresentam estro entre 36 e 48 horas e ovulam cerca de 60 horas após a remoção da esponja.

##### 9.4.1 Em estro natural

12 a 18 horas após a aceitação da monta pelo rufião na cabra

15 a 17 horas na ovelha,

Ou quando o muco estiver com coloração creme claro e com aspecto viscoso.

##### 9.4.2 Em estro sincronizado

Duas inseminações:

Na cabra, inseminar às 30 e às 48 horas após a retirada da esponja;

Na ovelha, inseminar às 50 e às 60 horas após a retirada da esponja.

Uma única inseminação em horário pré-determinado (IATF):  
Na cabra, inseminar entre  $42 \pm 2$  horas após a retirada da esponja;  
Na ovelha, inseminar entre 48 e 58 horas após a retirada da esponja (geralmente, às 55 horas).

## 10.0 MANEJO DA CABRA E OVELHA APÓS A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

O manejo das fêmeas após inseminação artificial, não difere muito do manejo dado aos animais acasalados em monta natural. No entanto, condições estressantes devem ser evitadas nas quatro semanas após a inseminação.

Devem ser tomados os cuidados básicos principalmente quanto à nutrição, saúde e manejo durante a gestação, parto e lactação.

Algumas práticas que necessitam de modificação, especialmente nos programas de Inseminação artificial são:

### 10.1 Identificação e Acasalamento das Fêmeas que não Conceberam

As fêmeas que não conceberam durante o programa de inseminação devem ser cobertas novamente no estro subsequente, de forma a obter uma maior taxa de parição. Nesses casos, as fêmeas podem ser acasaladas ou por IA ou monta natural. A monta natural é preferida devido à facilidade e baixo custo, além de proporcionar uma fertilidade maior quando comparada a IA, favorecendo a identificação de fêmeas com problemas reprodutivos.

Novo acasalamento com monta natural

Se a fêmea não concebeu na IA, um novo cio ocorrerá em torno de 16-17 dias após a inseminação (ovelha) e entre 19-21 dias na maioria das cabras (uma porcentagem de cabras pode apresentar ciclo curto).

Cerca de 10-12 dias após a IA introduzir no rebanho 3% de machos inteiros para identificar as fêmeas em estro e realizar os acasalamentos.

Usar bucal marcador ou tinta no peito dos machos, para poder identificar as fêmeas que repetiram cio e a data da nova cobertura (a cor da tinta deve ser diferente da usada anteriormente).

## 10.2 Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação ajuda no manejo do rebanho, uma vez que possibilita a separação das fêmeas gestantes para receberem o manejo adequado a sua condição fisiológica.

Existem vários métodos de diagnóstico de gestação em cabras e ovelhas. O mais simples deles é o “não retorno ao cio” até 21 dias após a cobertura. Esse método é realizado como descrito acima, usando rufião ou macho inteiro. Outros métodos incluem: dosagem hormonal, ultrassonografia e palpação abdominal, mas nenhum deles é capaz de detectar prenhez antes de 20 dias.

## 11.0 FATORES QUE INTERFEREM NA FERTILIDADE APÓS A INSEMINAÇÃO

### 11.1 Número de espermatozoides inseminados

O número total de espermatozoides inseminados é um dos principais fatores que podem interferir na fertilidade obtida. O número requerido varia de acordo com o tipo de sêmen (fresco,

resfriado ou congelado) e o local da inseminação.

Na inseminação cervical o número mínimo de espermatozoides viáveis/dose, para atingir uma boa fertilidade é de 100 milhões para sêmen fresco e de 100 a 200 milhões com sêmen resfriado ou congelado. Na inseminação intrauterina (laparoscopia) a dose recomendada varia de 10 a 50 milhões de espermatozoide em cada corno uterino.

## 11.2 Qualidade do sêmen

A fertilidade do sêmen está altamente correlacionada com o percentual de espermatozoides viáveis e com a motilidade, quanto maior esse percentual, maior as chances de prenhez. Sêmen com menos de 30% de motilidade resulta em baixa fertilidade.

## 11.3 Tipo de estro

A fertilidade de fêmeas inseminadas em estro natural é maior que em estro sincronizado. Possivelmente, isso ocorre devido a um efeito negativo do hormônio sobre a sobrevivência do espermatozoide durante seu transporte no trato genital feminino e/ou devido a qualidade do óvulo e do corpo lúteo resultantes desta ovulação, que pode ser inferior no estro sincronizado.

## 11.4 Local de deposição do sêmen

A profundidade de deposição do sêmen no sistema genital da fêmea no momento da inseminação interfere na fertilidade. A taxa de prenhez aumenta à medida que aumenta a profundidade de deposição do sêmen: vagina < cérvix < útero.

## 11.5 Momento da inseminação

Para obter maior índice de fertilidade a inseminação deve ser realizada próximo ao momento da ovulação, pois quando realizada muito cedo ou muito tarde a fertilidade é prejudicada. O ambiente uterino e tubário, no final do estro, não são favoráveis ao transporte e sobrevivência do espermatozoide. O momento da inseminação é mais crítico quando se usa sêmen resfriado e congelado do que com sêmen fresco. O mesmo em relação ao estro natural e sincronizado. Em estro sincronizado, inseminação realizada muito cedo (36 h) ou muito tarde (72 h ou +) após a remoção da esponja resulta em menor fertilidade.

### 11.6 Intervalo entre o último parto e a inseminação

Nas ovelhas, é recomendado um intervalo mínimo de 90 dias após o parto antes de se realizar a inseminação. Já na cabra, a fertilidade é baixa quando o tratamento hormonal é aplicado antes de 120 dias após o parto.

### 11.7 Idade da fêmea

Fêmeas muito jovens podem ser menos férteis que fêmeas adultas, assim como após cinco anos a fertilidade diminui progressivamente. A fertilidade máxima das fêmeas é obtida entre 18 meses e três anos de idade.

### 11.8 Nutrição

O nível nutricional modifica os resultados após a inseminação. Em rebanhos onde o nível nutricional é baixo, os resultados são geralmente baixos. Um nível nutricional muito alto também é prejudicial à fertilidade. Fêmeas muito gordas têm a fertilidade

reduzida comparada com aquelas normais.

O estado nutricional da fêmea no momento da inseminação pode ser avaliado pelo escore de condição corporal (ECC), que varia de 1 a 5 (1 – muito magra, 5- muito gorda). O ideal para reprodução é um ECC 3,0.

No macho, a subnutrição leva a uma redução da libido, da concentração e número total de espermatozoides ejaculados. Na fêmea, a subnutrição pode resultar em supressão do estro (anestro) e ovulação ou aparecimento de ovulações silenciosas (cio silencioso). Por estas razões, recomenda-se a suplementação alimentar de machos e fêmeas antes do início da estação de monta. Na cabra e ovelha, uma alimentação com maior nível proteico e energético (“flushing”) oferecida algumas semanas antes do início dos acasalamentos resulta em aumento significativo na taxa de ovulação e número de crias por parto.

### 11.9 O Inseminador

Um dos principais pontos de sucesso na inseminação de cabras e ovelhas é o inseminador. O bom inseminador deve ter prática e um bom conhecimento do sistema genital da fêmea. Uma pessoa pouco atenta, irritada, que não goste de executar este serviço e que o faça sem a delicadeza e o cuidado necessário, será um mau inseminador.

Tabela 8: Fatores que afetam a taxa de prenhez (%) em cabras, após inseminação artificial com sêmen fresco diluído (37 °C).

FATOR	N	PRENHEZ (%)	FONTE
Orifício cervical	43	48,5	Maia e Santos (2008)
Intra cervical	49	63,1	
Intrauterina	12	24,1	

1		46	48,9
2	<b>GEE</b>	58	41,5
Maia e Santos (2010)			
2,0		47	36,76 <sup>b</sup>
2,5		41	65,28 <sup>a</sup>
3,0		32	70,63 <sup>a</sup>
4,0		06	54,68 <sup>ab</sup>

ECC – escore de condição corporal

Tabela 9. Fatores que afetam a taxa de prenhez de ovelhas após inseminação artificial.

IA*	SÊMEN	ESTRO	HORARIO	PRE-NHEZ (%)	FONTE
Cervical	Fresco	Natural	12 - 18 h / cio***	87,8	Souza, et al. (1994)
	Congelado	Natural	"	65,4	
Cervical	Fresco (diluído)	Natural	12h/ cio	78,6	Sousa (2002)
		Sincronizado	IATF (56-59h)	41,9	
	Resfriado (24 h)	Natural	12h/ cio	71,4	
		Sincronizado	IATF (56-59h)	21,5	
Cervical	Fresco	Natural	12-18h/cio	82,0	Donovan et al (2004)
		Sincronizado	IATF (57h)	70,0	
	Congelado	Natural	12-18h/cio	40,0	
		Sincronizado	IATF (57h)	52,0	

Intrauteri- na**	Congela- do	Sincroni- zado	IATF (53h)  25h/cio	20,0  50,0	Gon- zalez et al. (2006)
Intrauteri- na**	Congela- do	Sincroni- zado	I A T F (541h)	69,0  40,0	King et al. (2004)
Cervical			I A T F (551h)		
Intrauteri- na**	Resfriado (±8 h)	Sincroni- zado	I A T F (55±1h)	77,3  15,0	Mil-
Cervical			I A T F (49±1h)		
Intra-uteri- na**	Resfriado (±6 h)	Sincroni- zado	IATF (50- 55h)	71,8  35,7	Ma- chado et al. (2006)
Cervical			IATF (48- 50h)		

\* Método da inseminação artificial, \*\* inseminação intra-uterina por laparoscopia, \*\*\* horas após o início do cio.

## 12.0 LIMPEZA DO MATERIAL

Todos os utensílios e instrumentos utilizados na coleta, manipulação do sêmen e inseminação artificial devem ser cuidadosamente limpos e esterilizados.

Lavar os equipamentos com água limpa e tratada, usando um detergente próprio para vidraria de laboratório (ex. Extran neutro) diluído em água na concentração recomendada.

Vidraria e material plástico (tubos, ponteiras, tampas, etc) sujos com material proteico:

Retirar os resíduos com água corrente e imergi-los em solução de

hipoclorito de sódio a 1% por 12 horas;  
Lavar com água corrente e colocar em imersão na solução de detergente por 2-4 horas antes de lavá-los;

Vidraria e material plástico, sujos com água ou soluções tampão sem material proteico:

Lavar com detergente, água corrente e enxaguar três vezes em água destilada.

Usar bucha e escovas apropriadas para limpar o interior das vidrarias.

Após a lavagem, todos os instrumentos devem ser enxaguados várias vezes com água corrente, para remover todos os traços do detergente, e depois com água destilada (vários enxáguas).

Depois de secos, os materiais de plástico e borracha podem ser esterilizados com calor úmido (autoclave, 120 °C/ 20 min) ou enxaguados com álcool 70%. A vidraria deve ser coberta com papel alumínio e esterilizada a seco (estufa a 140-180 °C/2 horas).

Figura 35: Estufa de esterilização

## 13.0 ANOTAÇÃO DE DADOS

Quando se usa a inseminação artificial, a anotação dos dados é necessária para que se tenha um controle do desempenho reprodutivo do rebanho e dos animais isoladamente. Deve-se fazer anotações diárias sobre fêmeas que entram em cio; repetição de cio após cobertura; nome e número das fêmeas inseminadas; nome ou número do reprodutor cujo sêmen foi utilizado; horário da inseminação, tipo de inseminação (intra cervical/intrauterina); número de inseminação por cabra por época de cobertura; data do parto; número de crias por parto; sexo das crias; peso ao nascer.

O criador deverá ter o maior número de anotações possíveis sobre o desempenho reprodutivo de seu rebanho para poder selecionar as fêmeas que serão descartadas, bem como aquelas que serão inseminadas com sêmen de um determinado reprodutor, que melhore determinada característica, conforme o objetivo da criação.

## 14.0 BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

AISEN, E.G. Reproduccion ovina y caprina. Buenos Aires: Inter-médica, 2004. 216 p.

BEARDEN, J.H.; FUQUAY, J.W. Applied animal reproduction. Reston: Reston Publishing Company, 1980. 337p.

BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO, A.L.; SANTOS, A.D.F.; FURST, R.; TEIXEIRA, R.B.S.; CHALHOUN, M.; PORTELA, A.P.; ALVES, S.G.G.; ALMEIDA, A.K.; GUIMARÃES, J.D. Utilização de glicerol e etilenoglicol como

crioprotetores na congelação do sêmen caprino. *Ciência Animal Brasileira*, v.5, n.1, p.27-32. 2004.

CHEMINEAU, P.; CAGNIÉ, Y.; GUÉRIN, Y.; ORGEUR, P.; VALLET, J.-C. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. Rome: FAO, 1991. 222 p. (FAO - Animal Production and Health, N.º. 83 ).

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2ª ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

DONOVAN, A.; HANRAHAN, J.P.; KUMMEN, E.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed semen at a natural or synchronised oestrus. *Anim. Reprod. Sci.*, v.84, n.3-4, p.359-368, 2004.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Sydney: Butterworths, 1987. 194p.

GONZALEZ, C.I.M., SILVA, G.A., SOARES, A.T. Influencia do horário da inseminação laparoscópica sobre a taxa de prenhez em ovelhas da raça Santa Inês no semiárido paraibano. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43, 2006. João Pessoa. Anais... João Pessoa: SBZ, 2006. 3p. CD-Rom.

GORDON, I. Controlled reproduction in sheep and goats. New York, CAB International. 1997. 450p.

KING, M.E., McKELVEY, W.A.C., DINGWALL, W.S., MATTHEWS, K.P., GEBBIE, F.E., MYLNE, M.J.A., STEWART, E., ROBINSON, J.J. Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen/thawed semen with or without oxytocin administration.

Theriogenology, v.62, p. 1236-1244. 2004.

MACHADO, V.P., NUNES, J.F., ARAÚJO, A.A., FERNANDÉZ, D.R.P., CORDEIRO, M.A., MEDEIROS, C.H.N., MEDEIROS, A.L.N., MONTEIRO, A.W.U. Fertilidade após a inseminação artificial intra-cervical ou laparoscópica intra-uterina de ovelhas utilizando diluidores à base de água de coco. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., v.43, supp., p.43-49, 2006.

MAIA M.S. Manual de inseminação artificial em caprinos e ovinos. Natal: SEBRAE/RN, EMPARN, 1997. 52p.

MAIA M.S. Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), Trolox-c e catalase. 2006. 147f. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP.

MAIA, M. S.; SANTOS, L. P. Fatores que afetam a taxa de prenhez de cabras em lactação inseminadas com sêmen fresco, na região central do Rio Grande do Norte. In: CONGRESSO NACIONAL DE ZOOTECNIA, 18, 2008. João Pessoa. Anais... João Pessoa: ABZ, 2008. 4p. CD-Rom.

MAIA, M. S.; ARAÚJO NETO, J. O.; LEAL, W. S.; REGO, M.M.T.; MOURA, M.T.M.M. Efeito da exposição ao macho na sincronização do estro e fertilidade em cabras leiteiras. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 4, 2009. João Pessoa. Anais... João Pessoa: EMEPA, 2009. 3p. CD-Rom.

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/>

[crm.vet.br/arquivos/taxa de prenhez em cabras apos a inseminacao artificial com semen fresco.pdf](http://crm.vet.br/arquivos/taxa_de_prenhez_em_cabras_apos_a_inseminacao_artificial_com_semen_fresco.pdf)

MIES FILHO, A. Reprodução dos animais e inseminação artificial. Porto Alegre: Sulina, 5ª ed., v.2, 1982. 783p.

MILCZEWSKI, V., KOZICKI, L.E., LUZ, S.L.N., NEVES, J.P. Inseminação artificial intrauterina e cervical em ovelhas utilizando sêmen refrigerado. Archives of Veterinary Science, v.5, p.35-39, 2000.

NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M. Utilização da água de coco como diluidor de sêmen caprino e ovino. Rev. Cient. Prod. Animal, v.1, n.1, p.17-26, 1999.

RODELLO, L. Validação de sistema automatizado de refrigeração e congelamento de sêmen ovino. 2006. 70f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP.

SOUSA, D.B. Viabilidade do sistema Equitainer na refrigeração do sêmen ovino avaliado pelas análises computadorizada, de microscopia epifluorescente e inseminação artificial. 2002. 103f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP.

SOUZA, M. I. L.; [NEVES, J.P.](#); LUZ, S. L. N.; [GONÇALVES, P.B.D.](#); MORAES, C. N. Inseminação artificial ovina com sêmen congelado e fresco utilizando diferentes técnicas de aplicação. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 18, n. 3-4, p. 116-123, 1994.











