

INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO INDIVIDUAL NA CONGELABILIDADE DO SÊMEN E FERTILIDADE IN VIVO DE OVINOS DESLANADOS

Diogo Ribeiro CÂMARA^{1*}, Kalina Maria de Medeiros Gomes SIMPLÍCIO²,
Maria Madalena Pessoa GUERRA³, Endryl Wolney Paiva BRANDÃO⁴,
Rodrigo Tenório PADILHA⁴, Diogo Roberto Silva Moraes BELLO⁴

RESUMO: Objetivando avaliar a influência individual do carneiro deslanado sobre o grau de congelabilidade dos seus ejaculados e a taxa de fertilidade após inseminação artificial laparoscópica em tempo fixo (ILTF), foram utilizados nove reprodutores e 80 ovelhas deslanadas, previamente selecionados. Dez amostras de sêmen de cada reprodutor foram congeladas utilizando o diluidor Fiser. As fêmeas foram submetidas à sincronização do estro utilizando o programa Crestar®, quando se utilizou ¼ do implante auricular impregnado com 0,75 mg de Norgestomet, associado à administração de 0,75 mg de Norgestomet + 1,5 mg de Valerato de estradiol, via i.m. No momento da retirada dos implantes, dez dias após sua colocação, administrou-se 250 U.I. de eCG e 60µg de cloprostenol, por via i.m. As ovelhas foram inseminadas por laparoscopia em tempo fixo, entre 55 e 60 horas após a remoção dos implantes, utilizando-se 75 milhões de espermatozóides totais/ovelha. O diagnóstico de gestação foi realizado através de exame ultra-sonográfico, 40 dias após a ILTF. Os reprodutores classificados como de alta, média e baixa congelabilidade apresentaram 80,00%, 70,00% e 53,33% de seus ejaculados aprovados, respectivamente. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) na motilidade individual progressiva (MIP), pós-descongelação, entre os grupos de alta, média e baixa congelabilidade do sêmen. A taxa de gestação não diferiu estatisticamente ($P>0,05$) utilizando-se sêmen de carneiros com diferentes níveis de congelabilidade. Observou-se variação na taxa de fertilidade de cada reprodutor ($P<0,05$), independente do grau de sensibilidade do sêmen à criopreservação. Conclui-se que existe variação individual no grau de congelabilidade do sêmen de ovinos deslanados, todavia este fator não interfere na fertilidade das ovelhas submetidas ILTF. Por outro lado, o reprodutor exerce influência na fertilidade após ILTF.

Termos para Indexação: inseminação laparoscópica, motilidade, taxa de gestação, vigor.

INDIVIDUAL VARIATION INFLUENCE ON SEMEN FREEZABILITY AND IN VIVO FERTILITY OF HAIR SHEEP

ABSTRACT: Aiming to evaluate the individual influence of hair rams on freezability levels of its ejaculates and fertility rate after fixed time laparoscopic artificial insemination (ILTF) were used nine rams and 80 hair ewes, pre-selected. Ten samples of semen from each ram were frozen using Fiser extender. The females were submitted to estrus synchronization by Crestar® program, when were used

¹ M.Sc. Ciências Veterinárias - PPGCV/UFRPE. Diogocamara1979@hotmail.com *Autor para correspondência

² Aluno de Graduação em Medicina Veterinária - UFRPE.

³ Méd. Veterinária. Dr^a Prof^a Adjunta - Departamento de Medicina Veterinária (DMV) - UFRPE. R. Dom Manoel de Medeiros, s/n. Dois Irmãos. Recife-PE.

⁴ Aluno de Graduação em Medicina Veterinária - Centro de Estudos Superiores de Maceió. Av. Divaldo Suruagy, Q. 4, Bl. 4. Maceió-AL.

¼ of ear implant impregnated with 0.75 mg of Norgestomet, associated to 0.75 mL of Norgestomet + 1.5 mg of Estradiol valerate, i.m. When the implants were removed, ten days later insertion, it was i.m. injected, 250 I.U. of eCG and 60µg of cloprostenol. The ewes were inseminated by laparoscopy in fixed time 55 to 60 hours after implants withdrawal, using 75 millions of overall spermatozoa/ewe. The pregnancy diagnosis was made by ultrasonography, 40 days after ILTF. The rams classified as high, intermediate and low freezability had 80.00%, 70.00% and 53.33% of approved ejaculates, respectively. There was no statistical difference ($P>0.05$) on post-thaw individual progressive motility among groups of high, intermediate and low semen freezability. The pregnancy rate did not show statistical difference ($P>0.05$) using semen from different freezability levels rams. It was observed fertility variation by ram ($P<0.05$), despite their freezability sensitivity. In conclusion, there is individual variation on hair sheep semen freezability; however, this fact do not interfere on fertility after ILTF. By the other hand, the ram exert influence on fertility after ILTF.

Index Therms: laparoscopic insemination, motility, pregnancy rate, vigor.

INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (I.A.), quando criteriosamente trabalhada, apresenta-se como ferramenta valiosa para difusão do patrimônio genético superior de reprodutores, em virtude de sua relativa simplicidade de execução em relação às demais biotécnicas reprodutivas. Além disso, a I.A. favorece a diminuição ou eliminação dos reprodutores na propriedade, além de minimizar o risco de disseminação de doenças sexualmente transmissíveis, sendo a utilização de sêmen criopreservado um fator fundamental para a sua utilização em grande escala.

Entretanto, um problema de importância prática na indústria de criopreservação de sêmen é a existência de animais denominados de boa e má congelabilidade. Independente da qualidade seminal prévia, o sêmen de certos indivíduos são congelados com menos crioinjúrias do que de outros (WATSON, 1995). A variação na congelabilidade de sêmen de carneiros foi demonstrada por Mies Filho et al. (1986) e Windsor (1997), podendo ser influenciada pela concentração espermática na palheta, composição do diluente (D'ALESSANDRO et al., 2001) e estação do ano (D'ALESSANDRO e MARTEMUCCI, 2003).

Associada às características de congelabilidade, vários testes laboratoriais vêm

sendo conduzidos com o objetivo de prever a fertilidade potencial de determinadas amostras de sêmen ou reprodutor a ser utilizado para inseminação artificial, apesar da pequena correlação entre os seus respectivos resultados (RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, 2003).

Problemas de fertilidade também têm sido relacionados aos protocolos utilizados para sincronização do estro de ovelhas e cabras. Rubianes e Menchaca (2004) ressaltaram que a utilização de protocolos longos (14 ou 21 dias) seria responsável por concentrações séricas "subluteais" de progesterona, mantendo por tempo demasiado longo o folículo dominante e promovendo o envelhecimento do ovócito. Dessa forma, tem se utilizado protocolo com menor período de duração que, em ovelhas deslanadas, não apresentou diferença significativa na proporção de fêmeas com manifestação clínica de estro (SILVA et al., 2004).

Neste trabalho objetivou-se avaliar a influência individual de carneiros deslanados sobre o grau de congelabilidade dos seus ejaculados e a taxa de fertilidade após inseminação laparoscópica em tempo fixo (ILTF).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados nove reprodutores ovinos, da raça Santa Inês, com idade entre

12 e 18 meses, previamente selecionados. Os animais eram criados em regime semi-intensivo, sendo suplementados com 500g de concentrado/animal/dia.

Para I.A., foram utilizadas 80 fêmeas, nulíparas e pluríparas, sexualmente maduras, criadas em condições extensivas. As ovelhas foram pré-selecionadas de acordo com a condição corporal (0-5), cronologia dentária e exame clínico-ginecológico, incluindo ultra-sonografia para diagnóstico de gestação, tendo sido repetido após 30 dias, e descartadas aquelas que apresentaram escore corporal inferior a dois, perda de dentes ou gestantes. Tanto os carneiros quanto as matrizes tiveram acesso à água e sal mineral ad libitum.

Foram colhidas 10 amostras de sêmen de cada reprodutor com auxílio de vagina artificial, diariamente, divididas em dois períodos de 5 dias, com intervalo de 2 dias entre eles. A seguir, o ejaculado foi avaliado quanto a turbilhonamento (0-5), através da colocação de uma gota de sêmen em lâmina previamente aquecida, seguido pela análise da motilidade individual progressiva (MIP; 0,00-100,00%), que consistiu na colocação de uma gota de sêmen pré-diluída, em lâmina aquecida a 37 °C. A concentração espermática (em bilhões de espermatozoides/mL) foi determinada em Câmara de Neubauer, após diluição de uma alíquota de sêmen, na proporção de 1:200, em solução fisiológica formolizada a 1,00%.

Após avaliação e aprovação dos ejaculados a fresco, os mesmos foram criopreservados utilizando-se o diluente Fiser em duas frações, com concentração final de 6,00% de glicerol, de forma a obter doses inseminantes de 75×10^6 de espermatozoides totais/0,25 mL. A primeira fração do diluente foi adicionada às amostras do sêmen na temperatura de 35 °C e, em seguida, os ejaculados diluídos foram conduzidos à refrigeração durante 90 minutos

até atingirem a temperatura de 5 °C. Após adição da segunda fração do diluente, as amostras foram envasadas e permaneceram sob refrigeração, por 10 minutos, até atingirem a temperatura de 0 °C. Posteriormente, as palhetas foram colocadas em uma rampa, 3 centímetros acima do nível de nitrogênio líquido (NL₂), durante 10 minutos, sendo imediatamente imersas no NL₂ e armazenadas em botijões criobiológicos.

Uma semana após a criopreservação, as amostras foram descongeladas à temperatura de 36 °C, durante 30 segundos, e avaliadas quanto a MIP e vigor espermático, em microscópio de contraste de fase⁵ (aumento 400X), pelo mesmo técnico, ao longo de todo o experimento. Foram aprovadas apenas as partidas que apresentaram valores mínimos de 30,00% e 3, para a MIP e o vigor, respectivamente.

Após a análise individual dos reprodutores e visando agrupar os animais, de acordo com o nível de sensibilidade dos seus ejaculados à criopreservação, analisou-se o percentual de partidas aprovadas na avaliação pós-descongelação, tendo sido imediatamente descartadas aquelas que não se enquadraram nos parâmetros mínimos de qualidade pré-estabelecidos.

Com o objetivo de estudar a taxa de fertilidade in vivo do sêmen ovino criopreservado, realizou-se a sincronização do estro das ovelhas através da utilização de progestágeno⁶, quando se inseriu ¼ de implante auricular impregnado com 0,75 mg de Norgestomet, associado à administração i.m. de 0,75 mg de Norgestomet + 1,25 mg de Valerato de Estradiol. Dez dias após, os implantes foram removidos e, nesse momento, administrou-se 250 U.I. de gonadotrofina coriônica eqüina⁷ e 60 µg de cloprostenol sódico⁸, por via i.m.

A I.A. laparoscópica foi efetuada entre 55 e 60 horas após a remoção dos implan-

⁵ Olympus, Alemanha

⁶ Crestar, Intervet, Brasil

⁷ Folligon®, Intervet, Brasil

⁸ Preloban®, Intervet, Brasil

tes das ovelhas, as quais foram agrupadas e inseminadas com sêmen criopreservado de reprodutores com alta (Grupo 1; n = 28), média (Grupo 2; n = 25) e baixa (Grupo 3; n = 27) congelabilidade. Para distribuição das fêmeas, utilizou-se amostragem não probabilística por conveniência, de forma a cada grupo apresentar similar proporção de nulíparas e pluríparas, bem como condição corporal média aproximada.

As doses inseminantes foram constituídas por 75 milhões de espermatozóides totais, sendo depositados metade em cada corno uterino. A distribuição das fêmeas no momento da inseminação seguiu um padrão de alternância entre grupos de diferentes graus de sensibilidade dos ejaculados e reprodutores do mesmo grupo, de forma que um mesmo reprodutor só foi reutilizado após inseminação com sêmen proveniente de todos os outros carneiros utilizados no experimento. Vale ressaltar que no momento da inseminação artificial não foi avaliado o status ovariano, visando observar folículos ou corpos lúteos.

O diagnóstico de gestação foi realizado 40 dias após a ILTF, através da realização de exames ultra-sonográficos utilizando aparelho de marca Pie Medical⁹, com transdutor linear na frequência de 6 MHz, por via trans-retal. A taxa de fertilidade foi obtida utilizando a seguinte equação:

$$\text{Taxa de fertilidade} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de ovelhas gestantes}}{\text{N}^\circ \text{ total de ovelhas inseminadas}} \times 100$$

Os dados obtidos foram comparados utilizando-se análise de proporção e ANOVA, com grau de significância de 5,00% e a comparação das médias foi efetuada através da Diferença Mínima Significativa (DMS), calculada utilizando o teste t. Todos os dados de MIP foram transformados pela técnica do arco seno e reavaliados estatisticamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base no percentual de ejaculados aprovados pós-descongelação, os reprodutores foram divididos em três grupos (alta, média e baixa congelabilidade), cada um constituído por três animais, correspondendo ao grau de sensibilidade das suas amostras de sêmen à criopreservação. Dessa forma, observou-se que os reprodutores classificados como de alta, média e baixa congelabilidade apresentaram 80,00, 70,00 e 53,33% de suas amostras aprovadas, respectivamente.

O percentual de MIP dos espermatozóides não constatou diferença estatística entre os grupos de alta (34,00 ± 14,76 %), média (33,17 ± 17,49 %) e baixa congelabilidade (28,17 ± 15,78 %), assim como quando foi avaliado esse parâmetro por carneiro (Tabela 1).

⁹ Modelo Falco 100, Holanda

Tabela 1 – Percentuais médios e desvios padrão de motilidade espermática individual pós-descongelamento ($X \pm DP$) de carneiros de alta (G1), média (G2) e baixa (G3) congelabilidade do sêmen e taxa de gestação de ovelhas inseminadas por laparoscopia em tempo fixo com sêmen descongelado proveniente de carneiros deslançados com diferentes graus de congelabilidade

Congelabilidade/ Grupo	Carneiro	Motilidade espermática/carneiro pós-descongelamento ($X \pm DP$)	Gestação %
G1	1	32,00 \pm 16,19	(0/10) 0,00d
	2	35,00 \pm 15,81	(1/8) 12,50ce
	3	35,00 \pm 12,69	(2/10) 20,00bef
Média do G1		34,00 \pm 14,76	(3/28) 10,71
G2	4	35,50 \pm 17,33	(1/7) 14,29cf
	5	35,50 \pm 18,63	(5/10) 50,00a
	6	30,05 \pm 18,02	(2/8) 25,00be
Média do G2		33,17 \pm 17,49	(8/25) 32,00
G3	7	32,00 \pm 16,87	(1/10) 10,00c
	8	27,00 \pm 18,29	(1/9) 11,11c
	9	25,50 \pm 12,57	(2/8) 25,00be
Média do G3		28,17 \pm 15,78	(4/27) 14,81
Média Geral		30,40 \pm 16,23	(15/80) 18,75

Valores seguidos de letras distintas, na mesma coluna, indicam diferença significativa ($P < 0,05$), pelo teste t.

A influência do fator individual na congelabilidade dos ejaculados de ovinos observada nesse estudo já havia sido detectada por vários autores. Tasserón et al. (1977) relataram o aproveitamento de apenas 33,00 % dos reprodutores utilizados em pesquisa sobre congelamento, enquanto Cano (1984) classificou, para aproveitamento na inseminação artificial, os reprodutores como de alta e baixa sensibilidade a congelamento. Em virtude disso, Cochran et al. (1985) enfatizaram a necessidade de avaliação prévia, tanto do indivíduo quanto dos ejaculados de um mesmo animal, visando a sua utilização na I.A.

Essa variação individual no processo de congelamento do sêmen de reprodutores pode estar relacionada às características

bioquímicas do plasma seminal em diferentes ejaculados, em virtude de variarem de acordo com a proporção das secreções provenientes das diferentes glândulas acessórias, modificando a resposta celular durante a criopreservação bem como interferindo na fertilidade (WINDSOR, 1997).

Neste experimento, os ejaculados foram colhidos e processados sob as mesmas condições, avaliados pelo mesmo técnico, além de todos os reprodutores terem sido submetidos ao mesmo sistema de manejo, enfatizando a existência de fatores intrínsecos ao animal que possam ter determinado variação no grau de congelabilidade de suas amostras.

Apesar da variabilidade de congelabilidade de seus ejaculados, a taxa de gesta-

ção não diferiu estatisticamente ($P > 0,05$) entre os grupos de ovelhas submetidas a ILTF com sêmen proveniente de carneiros com alta (10,71 %), média (32,00 %) e baixa (14,81 %) congelabilidade (Tabela 1), demonstrando que, nestas condições experimentais, as amostras aprovadas após descongelamento não influenciam nos índices de fertilidade. Além do fato de haver sido utilizadas ovelhas com condição corporal dentro do limite satisfatório (2,5-3,5), evidenciando que esse parâmetro não deve ter exercido influência sobre a taxa de gestação, uma vez que não diferiram ($P > 0,05$) entre os grupos de fêmeas inseminadas com sêmen de reprodutores classificados com alta ($3,00 \pm 0,67$), média ($3,00 \pm 0,65$) e baixa congelabilidade ($2,89 \pm 0,64$).

Na literatura, índices de fertilidade após inseminação por laparoscopia variam de 44,90% em ovelhas da raça Churra (ANEL et al., 2005) a 71,60% em lanadas (HILL et al., 1998), e inseminadas entre 10 e 12 horas após observação de estro.

A taxa de gestação baixa pode ter como provável causa o índice reduzido de sincronização do estro observado nos estudos de Moses et al. (1997), em virtude de que, ao se trabalhar com inseminação artificial em tempo fixo, é importante ter controle sobre o momento da ovulação. Em situações onde não existe sincronia entre o tempo de ovulação e a inseminação artificial, os espermatozóides devem ser capazes de sobreviver no trato genital da fêmea por períodos superiores a 24 horas e manter sua capacidade de fertilizar o ovócito na tuba uterina (CURRY, 2000). Todavia, sabe-se que o sêmen descongelado apresenta acelerada capacitação (PÉREZ et al., 1996), assim como redução da heterogeneidade (OLLERO et al., 1998) e da viabilidade espermática no sistema reprodutor feminino, dificultando a formação de reservas espermáticas no istmo da tuba uterina e interferindo na sobrevivência espermática no sistema genital da ovelha (CURRY, 2000). Esses fatores podem ter influenciado negativamente na fertilidade das ovelhas deste trabalho, pois a provável dispersão

do momento da ovulação dificultaria o encontro dos gametas ainda biologicamente viáveis, de acordo com Salamon e Maxwell (2000).

Além disso, a baixa taxa de gestação observada nas ovelhas pode estar relacionada à concentração de progestágeno administrado por implante auricular, sendo insuficiente para bloquear as ondas foliculares e permitindo o envelhecimento do ovócito por excessivo crescimento e persistência do folículo dominante (RUBIANES e MENCHACA, 2004).

A forma de avaliação da motilidade também pode ter influenciado o percentual de gestação, uma vez que, quando analisada de forma subjetiva, Grasa et al. (2005) evidenciaram não haver relação entre fertilidade após inseminações intra-uterinas e motilidade espermática do sêmen fresco de ovinos, enquanto Januskauskas et al. (2003) constataram correlação positiva e significativa entre a motilidade, após análise computadorizada de amostras de sêmen de touros, e a taxa de fertilidade. Por conseguinte, os dados desse experimento podem ser explicados pelo fato de que, em virtude da MIP haver sido analisada de forma subjetiva, a sua média pós-descongelamento não apresentou diferença estatística individual ou entre os grupos de reprodutores ($P > 0,05$), não interferindo no resultado final de prenhez (Tabela 1).

Mesmo não havendo diferença estatisticamente significativa, o grupo de ovelhas inseminadas com sêmen proveniente de carneiros com média congelabilidade apresentou, em termos absolutos, uma taxa de gestação superior (32,00%) em relação às fêmeas inseminadas com sêmen de reprodutores de alta (10,71 %) e baixa congelabilidade (14,81%). Objetivando melhor compreender esses achados, os dados foram avaliados individualmente, por reprodutor (Tabela 1), onde se observou que alguns animais apresentaram fertilidade significativamente superior ($P < 0,05$) em relação aos outros.

A individualidade na capacidade fertilizante do sêmen de diversas espécies do-

místicas tem conduzido pesquisadores a buscar marcadores que possam prever a taxa de fertilização através de parâmetros morfológicos (MIES FILHO et al., 1986), análises computadorizadas da motilidade (EPPELSTON e MAXWELL, 1995) ou bioquímicas (FROMAN et al., 1987), associados a componentes do plasma seminal (RONCOLETTA et al., 2004).

Dessa forma, apesar da variação individual na fertilidade das ovelhas detectada neste experimento corroborarem com relatos anteriores (EPPELSTON e MAXWELL, 1995; WINDSOR, 1997; HILL, 1998; GRASA et al., 2005), outros estudos de amostras de sêmen através de marcadores específicos são necessários para melhor identificar e prever o grau de sensibilidade de amostras de sêmen de carneiros, antes de serem utilizadas em programas comerciais de I.A.

CONCLUSÕES

Como carneiros deslançados apresentam variação individual no percentual de seus ejaculados aprovados após descongelamento, esta característica não é um indicador seguro de altos índices de fertilidade das ovelhas submetidas à ILTF. Por outro lado, alguns reprodutores podem apresentar melhores índices de fertilidade, independente do percentual de seus ejaculados aprovados após a congelamento/descongelamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANEL, L.; KAAB, M.; ABROUG, B. et al. Factors influence the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. *Theriogenology*, Stoneham, v. 63, n. 4, p. 1235-1247, 2005.
- CANO, E. A. Inseminación con semen congelado de carnero. In: *INTERNACIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND A.I.*, 10, 1986. *Proceedings...* v. 2, n. 85, p.10. 1984.
- COCHRAN, R. C.; JUDY, J. K.; PARKER, C. F. et al. Pre-freezing and post-thaw semen characteristics on five ram breeders collected by electroejaculation. *Theriogenology*, Stoneham, v. 23, p. 431-434. 1985.
- CURRY, M. R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction*, v. 5, p. 46-52, 2000.
- D'ALESSANDRO, A. G.; MARTEMUCCI, G. Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Leccese ram. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 79, p. 93-102, 2003.
- D'ALESSANDRO, A. G.; MARTEMUCCI, G.; COLONNA, M. A. et al. Post-thaw survival of ram semen spermatozoa and fertility after insemination as affected by pre-freezing sperm concentration and extender composition. *Theriogenology*, Stoneham, v. 55, p.1159-1170, 2001.
- EPPELSTON, J.; MAXWELL, W. M. C. Sources of variation in the reproductive performance of ewes inseminated with frozen-thawed ram semen by laparoscopy. *Theriogenology*, Stoneham, v. 43, n. 4, p. 777-788, 1995.
- FROMAN, D. P.; ACHENK, J. L.; AMANN, R. P. Sperm-bound amidase activity as a marker for acrossomal integrity in bull spermatozoa. *Journal of Andrology*, Philadelphia, v. 8, p. 162-169, 1987.
- GRASA, P.; PÉREZ-PÉ, R.; ABECIA, A. et al. Sperm survival and heterogeneity are correlated with fertility after intrauterine insemination in superovulated ewes. *Theriogenology*, Stoneham, v. 63, p. 748-762, 2005.
- HILL, J. R.; THOMPSON, J. A.; PERKINS, N. R. Factors affecting pregnant rates following laparoscopic insemination of 28,447 Merino ewes under commercial conditions: a survey. *Theriogenology*, Stoneham, v. 49, p. 697-709, 1998.
- JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*, Stoneham, v. 55, p. 743-758, 2003.
- MIES FILHO, A.; JOBIM, M. I. M.; ENDLER, J. O. et al. Estudo sobre inseminação artificial com

- sêmen congelado em ovinos no Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 10, n. 4, p. 235-245, 1986.
- MOSES, D.; MARTINEZ, A. G.; IORIO, G. et al. A large-scale program in laparoscopic intrauterine insemination with frozen-thawed semen in Australian Merino sheep in Argentina Patagonia. *Theriogenology*, Stoneham, v. 48, p. 651-657, 1997.
- OLLERO, M.; PÉREZ-PÉ, R.; MUIÑO-BLANCO, T. et al. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. *Cryobiology*, v. 37, p. 1-12, 1998.
- PÉREZ, L. J.; VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M. A. et al. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology*, Stoneham, v. 46, p. 131-140, 1996.
- RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reproduction of Domestic Animals*, Berlin, v. 38, p. 312-318. 2003.
- RONCOLETTA, M.; MORANI, E. S. C.; RODRIGUES, L. H. et al. Sperm membrane and seminal plasma 2D protein profiles and their relation with Bull fertility. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 15. 2004. Porto Seguro. Proceedings... Porto Seguro: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p. 187, 2004.
- RUBIANES, E.; MENCHACA, A. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, Melbourn, v. 16, p. 403-413, 2004.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 62, p. 77-111, 2000.
- SILVA, S. V.; SILVEIRA FILHO, M. E. M.; MEDEIROS, L. D. R. et al. Evaluation of short cycle estrous synchronization protocol for timed insemination in ewes. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 15. 2004. Porto Seguro. Proceedings... Porto Seguro: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p. 342, 2004.
- TASSERON, F.; AMIR, D.; SCHINDLER, H. Acrossome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *Journal of Reproduction and Fertility*, Amsterdam, v. 51, p. 461-462. 1977.
- WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, Melbourn, v. 7, p. 871-891, 1995.
- WINDSOR, D. P. Variation between ejaculates in the fertility of frozen ram semen used for artificial insemination of Merino ewes. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 47, p. 21-29, 1997.