



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Obtenção, caracterização e conservação de espermatozoides de emas

(*Rhea americana*, Linnaeus, 1758)

Luana Grasielle Pereira Bezerra de Araújo

MOSSORÓ-RN

2019

LUANA GRASIELE PEREIRA BEZERRA DE ARAÚJO

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE
ESPERMATOZOIDES DE EMAS (*Rhea americana*, LINNAEUS, 1758)**

Qualificação do projeto de doutorado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal da
Universidade Federal Rural do Semi-
Árido.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e
Biotecnologia

Orientador: Alexandre Rodrigues Silva,
Prof. Dr.

MOSSORÓ- RN
2019

LUANA GRASIELE PEREIRA BEZERRA

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE
ESPERMATOZOIDES DE EMAS (*Rhea americana*, LINNAEUS, 1758)**

Qualificação do projeto de doutorado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal da
Universidade Federal Rural do Semi-
Árido.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e
Biotecnologia

Defendida em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva - UFERSA

Profa. Dra. Ana Liza Paz Souza - UFC

Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira - UFERSA

CARACTERIZAÇÃO DO PROJETO

Local do experimento: Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal

Universidade Federal Rural do Semiárido – UFERSA

Av. Francisco Mota, 572 - Bairro Costa e Silva / Mossoró-RN | CEP: 59.625-900

Financiamento: Capes / CNPq

Equipe executora

Doutoranda: Luana Grasielle Pereira Bezerra de Araújo

Área de concentração: Morfofisiologia da Reprodução e Biotecnologia Animal

E-mail: luana_grasielly@hotmail.com

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva - Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA. Departamento de Ciências Animais

Área de concentração: Morfofisiologia da Reprodução e Biotecnologia Animal

E-mail: legio2000@yahoo.com

Pós-graduandos

Nome: Andreza Vieira Brasil

Mestranda em Ciência Animal – UFERSA

Nome: Érica Camila Gurgel Praxedes

Doutoranda em Ciência Animal – UFERSA

Nome: Maiko Roberto Tavares Dantas

Doutorando em Ciência Animal – UFERSA

Nome: Samara Sandy Jerônimo Moreira

Doutoranda em Ciência Animal – UFERSA

Iniciação científica

Nome: Ana Glória Pereira

Aluna de Graduação do curso de Medicina Veterinária e Bolsista de Iniciação Científica CNPQ/UFERSA

Nome: Náyra Rachel Nascimento Luz

Aluna de Graduação do curso de Medicina Veterinária

Nome: Pedro Fiúza Moraes

Aluno de Graduação do curso de Biotecnologia – UFERSA

Nome: Tayná Moura Matos

Aluna de Graduação do curso de Medicina Veterinária e Bolsista voluntária de Iniciação Científica /UFERSA

Nome: Thalia Cibebe Aquino Torre
Aluna de Graduação do curso de Zootecnia e Bolsista voluntária de Iniciação Científica/UFERSA

Técnica do laboratório

Nome: Lizziane Constância Nunes de Oliveira Fernandes
Técnica do laboratório de conservação do germoplasma animal - LCGA.

Outros colaboradores

Nome: Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira - Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA; Departamento de Ciências Animais.

Nome: Andréia Maria da Silva
Pós-doutoranda em Ciência Animal – UFERSA

Nome: Dr. João Batista Freire Souza-Junior
Pós-doutorando em Ciência Animal – UFERSA

Resumo

As emas (*Rhea americana*) são aves nativas da América do Sul, que possuem grande importância ecológica na manutenção de ecossistemas. No entanto, apesar de seu papel primordial, Segundo a União Internacional para Conservação da Natureza as emas encontram-se globalmente quase ameaçadas. O declínio na população das emas tem como um dos principais causadores a caça pela pele e carne, visto que essa espécie também possui potencial econômico. Nesse contexto, pesquisar os aspectos reprodutivos e aplicar biotécnicas reprodutivas é de fundamental importância para auxiliar na conservação bem como na multiplicação das emas em cativeiro para fins comerciais. Dessa forma o objetivo da presente pesquisa é caracterizar as mudanças espermáticas durante a maturação dos espermatozoides, estabelecer protocolos eficientes para a obtenção, avaliação e conservação de espermatozoides de emas. Para tanto serão utilizadas emas provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). No primeiro experimento espermatozoides serão obtidos por flutuação de diferentes seguimentos do complexo epidídimo-ducto deferente. As amostras serão processadas para as microscopias eletrônicas de varredura e transmissão a fim de se caracterizar as mudanças que ocorrem durante a passagem do espermatozoide por essas estruturas. No segundo experimento os espermatozoides serão obtidos pelas técnicas de flutuação e lavagem retrograda, para se comparar esses dois métodos de obtenção. Após a coleta serão validadas diferentes técnicas de avaliações espermáticas: CASA, teste hiposmótico, integridade da membrana plasmática, acrossoma e cromatina espermática, e, atividade mitocondrial. No terceiro experimento os espermatozoides serão obtidos, pela melhor técnica testada no experimento 2, criopreservados em diferentes diluidores (TRIS, TES, ACP e OVODYL™) suplementados com 15% de gema de ovo de galinha e 6% de dimetilcetamida e avaliados conforme os testes validados também no experimento 2. Por fim, os dados coletados serão submetidos a análises estatísticas e em todos os casos será adotado nível de significância $p < 0,05$. Diante deste estudo, espera-se descrever os espermatozoides de emas, estabelecer protocolos para avaliação e congelamento de espermatozoides de emas.

Palavras-chaves: Aves, Rheiforme, Animais Silvestres, Criopreservação de Sêmen.

Abstract

Rheas (*Rhea americana*) are native birds of South America, which have great ecological importance in maintaining ecosystems. However, despite their primary role, according to the International Union for Conservation of Nature rheas are globally almost threatened. The decline in the rhea population is a major cause of hunting for skin and meat, as this species also has economic potential. In this context, researching reproductive aspects and applying reproductive biotechniques is of fundamental importance to assist in the conservation as well as the multiplication of captive rheas for commercial purposes. Thus, the objective of the present research is to characterize sperm changes during the maturation of sperm, to establish efficient protocols for the collection, evaluation and conservation of sperm from rheas. For this purpose, rheas from the Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) of the Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) will be used. In the first experiment sperm will be collected by flotation of different segments of the epididymis-duct complex. The samples will be processed for scanning and transmission electron microscopy in order to characterize the changes that occur during sperm passage through these structures. In the second experiment, sperm will be collected by flotation and retrograde washing techniques to compare these two collection methods. After collection, different sperm evaluation techniques will be validated: CASA, hyposmotic test, plasma membrane integrity, acrosome and sperm chromatin, and mitochondrial activity. In the third experiment, sperm will be collected by the best technique tested in experiment 2, cryopreserved in different dilutors (TRIS, TES, ACP and OVODYL[™]) and two external cryoprotectants (egg yolk and *Aloe Vera* extract) supplemented with 15% chicken egg yolk and 6% dimethyl ketamide and evaluated according to the tests also validated in experiment 2. Finally, the collected data will be submitted to statistical analysis and in all cases a significance level of $p < 0.05$ will be adopted. Thus, it is expected to describe rhea sperm, establish protocols for evaluation and cooling of rhea sperm.

Keywords: Birds, Rheiform, Wild animals, Semen Cryopreservation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ema (*Rhea americana*) no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da Universidade Federal Rural do Semi-árido. Fonte: ufersa.edu.br.....16
- Figura 2.** Testículos de emas (*Rhea americana*). A -Testículo e Epidídimo (E) durante a estação reprodutiva, as setas indicam a vascularização sob a túnica albugínea. B - Testículo (T) durante o repouso reprodutivo. Fonte: Carvalho, 2009.....19
- Figura 3.** Falo da ema com ereção, espiralado, ejaculando. Fonte: Góes, 2004.....19
- Figura 4.** Tratamentos testados no experimento 3.....40

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
10 ⁶	Milhões
°C	Graus Celsius
Kg	Kilograma
g	Grama
ng	Nanograma
µg	Micrograma
ml	Mililitro
µL	Microlitro
M	Molar
mOsm	Miliosmol
cm	Centímetro
nm	Nanômetro
H	Hora
min	Minuto
s	Segundo
nº	Número
ACP	Água de Coco em Pó
ALH	Amplitude Lateral de Cabeça
BCF	Frequência de Batimento Cruzado
BES	Ácido N, N-bis (2-hidro-hidroxietil) -2-aminoetano sulfônico (BES)

BPSE	Beltsville Poultry Semen Extender
CASA	Análise Computadorizada de Sêmen
CEMAS	Centro de Multiplicação de Animais Silvestres
CEUA	Comitê de Ética e Uso de Animais
CFDA	6-Diacetato de Carboxifluoresceína
DMA	Demetilcetamida
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EG	Etilenoglicol
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais
IP	Iodeto de Propídio
IUCN	União Internacional de Conservação da Natureza (International Union for Conservation of Nature)
LCGA	Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LIN	Índice de Linearidade
MA	Metilacetamida
ME	Microscopia eletrônica
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
pH	Potencial hidrogeniônico
RN	Rio Grande do Norte
STR	Índice de Progressão
TES	Ácido N-Tris (hidroximetil) metil-2-aminoetano sulfônico

TRIS	Tris-hidroximetil-aminometano
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
VAP	Velocidade Média da Trajetória
VCL	Velocidade Curvilínea
VSL	Velocidade Linear Progressiva

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. As emas (<i>Rhea americana</i>).....	16
2.2. Aspectos reprodutivos dos machos	17
2.3. Métodos de obtenção de espermatozoides em aves.....	21
2.4. Criopreservação de espermatozoides em aves	23
2.4.1. Diluentes.....	24
2.4.2. Crioprotetores	26
2.5. Métodos de avaliação espermática	27
2.5.1. Morfometria e Morfologia espermática.....	27
2.5.2. Análise Computadorizada de Sêmen.....	29
2.5.3. Teste Hiposmótico	30
2.5.4. Avaliação da integridade da membrana plasmática.....	31
2.5.5. Avaliação da integridade do acrossoma	33
2.5.6. Avaliação da condensação da cromatina	34
2.5.6.3. Avaliação da função mitocondrial.....	35
3. JUSTIFICATIVA.....	36
4. HIPÓTESES.....	37
5. OBJETIVOS.....	38
5.1. Objetivo Geral.....	38
5.2. Objetivos Específicos	38
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
6.1. Locais de execução e bioética	39
6.2. Animais experimentais e manejo	39
6.3. Desenho Experimental	40
6.4. Obtenção dos espermatozoides.....	40
6.5. Morfometria Espermática	41
6.6. Processamento e avaliação por Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV ..	41
6.7. Processamento e avaliação por Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET	42
6.8. Avaliações espermáticas	42
6.8.1. Teste Hiposmótico	43
6.8.2. Fhash Frozen.....	43

6.8.3.	<i>Integridade da membrana plasmática por corantes vitais</i>	43
6.8.4.	<i>Avaliação da integridade do acrossoma</i>	44
6.8.5.	<i>Avaliação da Condensação da Cromatina</i>	45
6.8.6.	<i>Integridade da membrana plasmática e acrossomal, e atividade Mitocondrial por Fluorescência</i>	45
6.9.	Congelação e descongelção dos espermatozoides de emas	46
6.10.	Análise Estatística	46
7.	RESULTADOS ESPERADOS	47
	REFERÊNCIAS	48
	Cronograma de Execução	61
	2022	61
	D	61
	X	61
	X	61

1. INTRODUÇÃO

As emas (*Rhea americana*) possuem grande importância ecológica na manutenção da biodiversidade, pois, atuam como dispersoras de sementes (AZEVEDO et al., 2013) e participam da cadeia alimentar de diversos predadores contribuindo assim para a manutenção destes (SICK, 1997). No entanto, devido a caça, bem como a destruição e fragmentação de seu habitat, além da destruição de ovos por máquinas agrícolas, queimadas e predação, as emas estão quase globalmente ameaçadas (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2016). Dessa forma, faz-se necessário garantir sua conservação investindo em pesquisas que favoreçam o conhecimento das características peculiares desta espécie, incluindo os aspectos morfofisiológicos e biotecnologias relacionadas à sua reprodução (GÓES, 2004).

Estudos envolvendo os aspectos reprodutivos das emas já foram relatados como por exemplo, a caracterização ultraestrutural da espermiogênese (PHILLIPS; ASA, 1989), a morfologia dos ovários (PARIZZI et al., 2007), a morfologia dos órgãos genitais masculinos e da cloaca (SANTOS et al., 2011), a obtenção de sêmen e a caracterização de alguns parâmetros espermáticos (GÓES et al., 2010), sendo praticamente inexistente a aplicação de técnicas reprodutivas visando a conservação do seu material genético.

Nesse contexto, a criopreservação de espermatozoides aparece como uma valiosa ferramenta para a conservação de material genético de diversas espécies animais (COSTA; MARTINS, 2008), dentre as quais a ema. Assim, em inúmeras espécies de aves, protocolos de criopreservação de espermatozoides vêm sendo testados, mostrando resultados promissores (BLANCO et al., 2000; BLESBOIS et al., 2007; PEIXOTO, 2010; EHLING et al., 2012). Nas emas, não existem relatos de criopreservação de espermatozoides; no entanto, nos avestruzes, espécie mais próxima das emas (GIANNONI, 1996), Smith (2016) relatou a aplicação desta técnica, estabelecendo importantes parâmetros, como por exemplo, as curvas de congelamento e descongelamento utilizadas, que poderão ser extrapoladas e adaptadas para as emas.

Uma das primeiras etapas, no entanto, para a formação de um banco de germoplasma em emas consiste na obtenção dos espermatozoides. No geral, em aves, os espermatozoides destinados à criopreservação podem ser obtidos por meio da técnica de massagem digital, no entanto este método exige contenção física e condicionamento dos animais, o que pode lhes causar estresse (CARVALHO; FRENEAU; SANTOS, 2006). Em emas, já foram obtidas amostras de sêmen por esta técnica, no entanto muitos

ejaculados obtidos não continham espermatozoides ou estavam contaminados com urina dificultando as análises (GÓES et al., 2010). Uma alternativa também interessante à formação de bancos de recursos genéticos, consiste na obtenção de espermatozoides de animais que vieram subitamente a óbito. Em aves, entretanto, a aplicação desta possibilidade é ainda pouco usual. Um dos poucos relatos desta técnica foi reportado em codornas por Góis (2018), que obteve espermatozoides a partir dos ductos deferentes, uma vez que é este o local de armazenamento de espermatozoides em aves. O autor demonstrou então, ser possível a obtenção de espermatozoides viáveis (60%) e com motilidade ($79,16 \pm 0,95\%$) (GÓIS, 2018). Por outro lado, em mamíferos, espermatozoides são correntemente obtidos do epidídimo de animais abatidos por meio dos métodos de flutuação e lavagem retrógrada (BEZERRA et al., 2014). Assim, é possível que a adaptação destas metodologias para a ema possibilite a recuperação de espermatozoides em todo o seu trânsito desde o epidídimo ao ducto deferente, fornecendo subsídios não só para seu armazenamento, mas também para a realização de análises que permitam compreender a maturação espermática nesta espécie.

Neste sentido, avaliar a qualidade das amostras espermáticas obtidas, além de permitir a compreensão de fenômenos fisiológicos, permite também a avaliação da eficiência de protocolos de conservação espermática. Em emas, Góes et al. (2010) reportaram a avaliação espermática no tocante aos parâmetros de volume do sêmen, concentração, motilidade e morfologia. No entanto, para aumentar a acurácia em predizer o potencial fecundante de uma amostra espermática, outros testes complementares vêm sendo propostos para diferentes espécies. Dentre esses, podem ser citados a Análise Computadorizadas de Sêmen (CASA), que fornecem dados cinéticos dos espermatozoide (EHLING et al., 2012; SMITH et al., 2016), o teste hiposmótico que avalia a funcionalidade da membrana plasmática (SMITH et al., 2016), a avaliação da integridade da membrana plasmática, da cromatina, do acrossoma e o teste de função mitocondrial por meio de fluorescência (RODRIGUES; ROCHA; BELETTI, 2009; PARTYKA et al., 2012; SMITH et al., 2016; GÓIS, 2018; PARTYKA et al., 2012).

Uma vez obtidos e submetidos à análise inicial, os espermatozoides devem ser processados em um meio diluente que lhes proporcione ação tamponante, nutrientes, substrato energético, estabilidade da membrana plasmática e manutenção da pressão osmótica (DONOGHUE et al., 2000). Em aves já foram descritos a utilização de diluentes para refrigeração e congelamento de espermatozoides tais como o ácido N, N-bis (2-hidro-hidroxietil) -2-aminoetano sulfônico (BES), ácido N-Tris (hidroximetil) metil-2-

aminoetano sulfônico (TES) (DONOGHUE et al., 2000), Água de Coco em Pó (ACP) (RONDON et al., 2008; FREITAS et al., 2018), Beltsville Poultry Semen Extender (BPSE) (BAKST; SEXTON, 1979; van der LAAN, 2007) e o OVODYL™ (MORRELL et al., 2005; CAVALCANTE, 2006; SŁOWIN'SKA et al., 2007; 2012, CIERESZKO et al., 2011).

Outro fator de suma importância para o sucesso da criopreservação de espermatozoides é a escolha dos crioprotetores e suas concentrações adequadas, capaz de reduzir os danos causados pelas baixas temperaturas (BONGALHADO, 2013). Essas substâncias são divididas em crioprotetores externos e internos dependendo do seu local de ação em relação a célula (van der LAAN, 2007). Alguns exemplos de crioprotetores externos já relatados em criopreservação de espermatozoides de aves são a gema de ovo de galinha (SANTIAGO-MORENO et al., 2012; ABOUELEZZ et al., 2015) e a Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) (van der LAAN, 2007; SHAHVERDI et al., 2015). Quanto aos crioprotetores internos, já foram utilizados em aves o glicerol (WISHART, 1995), o etilenoglicol (EG) (KURBATOV et al., 1980), a dimetilformamida (DMF) (EHLING et al., 2012), o dimetilsulfóxido (DMSO) (SMITH, 2016), e a metilacetamida (MA) (EHLING et al., 2012; PARTYKA et al., 2012; SMITH, 2006).

Assim, tendo em vista a importância das emas, justifica-se a realização deste estudo por possibilitar a compreensão de eventos relativos à sua maturação espermática no epidídimo e armazenamento no ducto deferente. Além disso, pretende-se obter informações relativas à aplicação de metodologias de obtenção de espermatozoides em animais abatidos e o desenvolvimento de um protocolo para a criopreservação de espermatozoide. Tais conhecimentos poderão auxiliar a conservação da espécie através da formação de bancos de germoplasma.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. As emas (*Rhea americana*)



Figura 1. Ema (*Rhea americana*) no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da Universidade Federal Rural do Semi-árido. Fonte: ufersa.edu.br

As emas (*Rhea americana*) (Figura 1) são aves pertencentes a Ordem Rheiforme caracterizada por aves pernaltas de grande porte, não voadoras, e que abrange o grupo das ratitas. Seus demais representantes são o avestruz (*Struthio sp.*) na África, o casuar (*Casuarius sp.*) e emu (*Dromaius sp.*) na Austrália e o quivi (*Apteryx sp.*) na Nova Zelândia (STEWART, 1994).

Sendo uma espécie nativa da América do Sul, a *Rhea americana* tem grande parte do território brasileiro como seu hábitat natural (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2016). As emas podem sobreviver até os 40 anos e apresentam extrema rusticidade e adaptabilidade vivendo em áreas de Pampas, Campos Sulinos e em várias fitofisionomias do Cerrado, sendo que na estação de reprodução buscam áreas próximas aos rios e lagos (SCHOMMER, 1999). É um animal que vive em grupos com cerca de 40 indivíduos, apresenta hábitos diurnos (BRUNING, 1974) e é onívora, com dieta composta de gramíneas, leguminosas e pequenos animais como cobras, ratos, lagartos e insetos (AGUIAR; MAURO, 2004). Essas aves podem atingir de 1,34-1,70 m de altura, os machos podem pesar 34,4 kg e as fêmeas 32 kg (OLSON 1983; SICK 1985).

Suas características anatômicas e comportamentais, fazem das emas uma opção interessante para criação comercial (HOSKEN; SILVEIRA, 2003). Cada ave adulta

fornece em torno de 10 a 13 quilos de carne muito macia e com baixos níveis de colesterol (GIANNONI, 2002). Sua pele é utilizada na indústria de calçados e bolsas, óleos apresentam propriedades farmacológicas e cosméticas, suas penas/plumas são utilizadas na confecção de fantasias e espanadores, seus ovos além de consumidos, também são utilizados na produção de xampus e artesanatos (SILVA, 2001).

Apesar de ser encontrada em centros de criação comercial, a ema é considerada pela legislação brasileira uma espécie silvestre (WESTENDORF; ALTIZIO, 1995). Segundo a União Internacional para Conservação da Natureza (BIRDLIFE INTERNATIONAL 2016), as emas *Rhea americana* encontram-se globalmente quase ameaçadas, havendo suspeitas de um declínio populacional moderadamente rápido e contínuo. No estado brasileiro de Minas Gerais, a espécie já é classificada como ameaçada (MACHADO et al. 1998). Esse decréscimo na população das emas se deve principalmente à caça pela pele da espécie e carne, bem como a destruição e fragmentação de seu habitat, além da destruição de ovos por máquinas agrícolas, queimadas e predação (DANI 1993; BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2016).

Em sua grande maioria os predadores das emas são os cães do mato (*Speothos venaticus*), o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), a onça-pintada (*Panthera onca*), os cães selvagens (*Canis familiaris*), o lagarto tegu (*Tupinambis teguixin*) e algumas aves de rapina (SICK 1997). Nesse contexto, o declínio da população de emas pode afetar o equilíbrio da biodiversidade local porque, além da manutenção de seus predadores, as emas são consideradas dispersoras de sementes, realizando tal tarefa com eficácia (AZEVEDO, et al., 2013). Assim, o estudo de sua biologia reprodutiva, o desenvolvimento e aperfeiçoamento de biotécnicas reprodutivas são de extrema importância para contribuir para a conservação e multiplicação em cativeiro dessa espécie.

2.2. Aspectos reprodutivos dos machos

Nas emas, os machos atingem a maturidade sexual aos dois anos de idade (CODENOTTI; ALVAREZ, 1997), são maiores que as fêmeas e diferenciam-se por possuírem um colar de penas escuras na base do pescoço (SICK, 1985). Quando se inicia a estação reprodutiva, o macho forma haréns compostos de um indivíduo com 2 a 12 fêmeas (CODENOTTI; ALVAREZ, 2001). Com o cortejo, as fêmeas são atraídas para o

harém, depois ocorre a cópula e várias fêmeas põem ovos em um mesmo ninho construído por um único macho (CODENOTTI; ALVAREZ, 2001). O macho também possui ativa participação na incubação e cuidado com os filhotes (FERNANDEZ; REBOREDA, 2003).

No tocante ao período de reprodução das emas, no Brasil é observada uma variação de acordo com a localização geográfica e o clima. Por exemplo, nos estados da Bahia, Goiás, São Paulo e Mato Grosso essas aves reproduzem-se nos períodos mais secos, antes do início das chuvas, de junho a setembro (CODENOTTI et al., 1995; CODENOTTI e ALVAREZ, 1997); já no estado do Rio Grande do Norte, no criadouro científico da Universidade Federal Rural do Semi-Árido em Mossoró, foi observada uma variação anualmente, porém o período reprodutivo costuma ser de até cinco meses, iniciando-se entre os meses de maio ou junho e indo até novembro ou dezembro (dados não publicados). Durante a estação reprodutiva, é observado um aumento no tamanho do falo, uma coloração mais intensa nos animais e maior agressividade explicada pelo aumento da concentração plasmática de testosterona durante o período reprodutivo (53,28 ng/ml) comparada ao período de repouso sexual (5,57 ng/ml) (GÓES et al, 2010).

Os órgãos genitais masculinos das emas são representados por dois testículos, dois epidídimos, dois ductos deferentes, e pelo órgão copulatório, o falo, e pela cloaca (SANTOS et al., 2011). Os testículos da ema possuem formato alongado como o de um feijão (Figura 2) e estão localizados na cavidade celomática, na região intra-abdominal dorsal, desta forma, devido a esta posição dos testículos, a espermatogênese é realizada a uma temperatura corporal interna de 40-42°C (SANTOS et al., 2011; FROMAN; KIRBY, 2004). Além disso, os testículos possuem comprimento e larguras médias de $7,6 \pm 1,2$ cm e $2,6 \pm 0,7$ cm nos adultos; $4,5 \pm 1,5$ cm e $0,9 \pm 0,4$ cm nos jovens; e $0,8 \pm 0,3$ cm, e $0,2 \pm 0,1$ cm nos filhotes (SANTOS et al., 2011). No entanto, dependendo do estágio do ciclo reprodutivo, o tamanho dos testículos pode variar nas aves, devido ao incremento no tamanho dos túbulos seminíferos e do número de células intersticiais (BENEZ, 1998; LAKE et al. 1981). Os testículos das emas também apresentam variações de coloração. Nos animais adultos em atividade sexual, estes apresentam uma cor creme, enquanto que nos animais mais jovens apresentam coloração variando de tons avermelhados a marrom (SANTOS et al., 2011). A respeito do epitélio seminífero das emas, este é constituído de dois tipos de células: as células de sustentação e as células da linhagem espermatogênica (espermatogônias, espermátócitos primários, espermátócitos secundários, espermátides e os espermatozoides) (SANTOS et al., 2011).

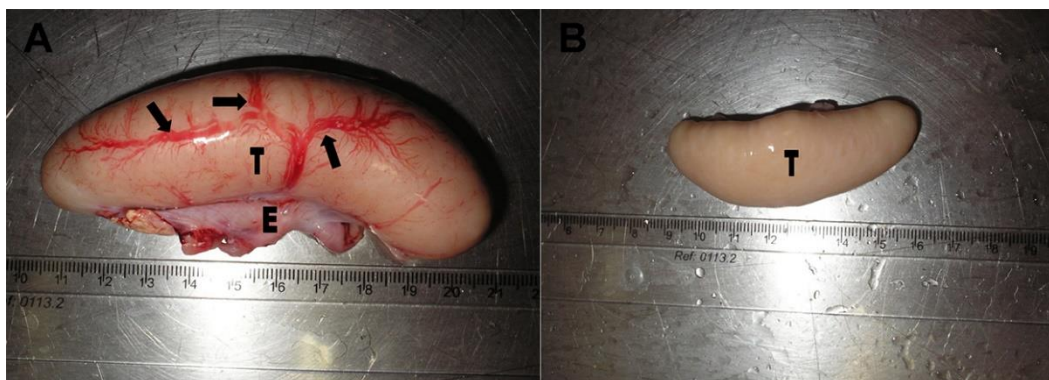


Figura 4. Testículos de emas (*Rhea americana*). A -Testículo e Epidídimo (E) durante a estação reprodutiva, as setas indicam a vascularização sob a túnica albugínea. B - Testículo (T) durante o repouso reprodutivo. Fonte: Carvalho, 2009.

Nas aves o epidídimo é pouco desenvolvido e sem as subdivisões (cabeça, corpo, cauda) (FRANZO; VULCANI, 2010). Em emas, o testículo separa-se do epidídimo por uma faixa de tecido conjuntivo, que possui ductos, estes ductos foram caracterizados como a rede testicular, que está posicionada extra-testicular; o epidídimo é alongado e fusiforme, junto a margem medial do testículo (SANTOS et al., 2011). Acredita-se que nas aves a estocagem dos espermatozoides e fluidos ocorre na luz do ducto deferente (VIEGAS, 2004). Nas emas, o ducto deferente emerge na porção caudal do epidídimo apresentando um trajeto sinuoso, em “zigzague” diminuindo o enovelamento na porção distal e tornando-se retilíneo próximo a cloaca, que apresenta formato de cone de onde o falo é projetado (SANTOS et al., 2011).

O falo nas emas é um órgão fibroso linfático, bem desenvolvido, constituído por duas porções: uma proximal, rígida, bifurcada e contorcida e outra distal, tubular, espiralada e flexível (Figura 3).



Figura 5. Falo da ema com ereção, espiralado, ejaculando. Fonte: Góes, 2004.

Com relação as glândulas sexuais acessórias das aves, diferentemente dos mamíferos, a vesícula seminal, próstata, glândula de Cowper e glândula uretal não são encontradas (BAKST, 1993); no entanto, o termo vesícula seminal tem sido utilizado por alguns autores para determinar a porção terminal do ducto deferente que tem a função de armazenar espermatozoides (BHAT; MAITI, 2000).

O desenvolvimento dos espermatozoides nos testículos das emas e a ultraestrutura do espermatozoide maduro já foram relatados, utilizando-se a microscopia eletrônica de transmissão. Phillipis e Asa (1989) descreveram que uma manchete circular envolve o núcleo das espermátides jovens e mais tarde, os microtúbulos da manchete circular são reorganizados em uma manchete longitudinal. Observa-se também um centríolo longo distal e um curto proximal, o centríolo distal se associa à membrana plasmática e o flagelo cresce a partir dele e o centríolo proximal associa-se ao núcleo. Nas espermátides jovens o complexo de Golgi apresenta-se esférico e eletro-denso e são observados adjacentes ao centríolo proximal. Além disso, a manchete longitudinal desaparece e as mitocôndrias subsequentemente se associam ao centríolo distal. Adicionalmente, foi observado no espermatozoide maduro uma cabeça curva e afunilada, uma peça central curta entre a cabeça e a peça principal, esta peça principal é longa e compreende a maior parte do comprimento da célula. O acrossoma se encaixa na porção anterior do núcleo espermático e uma estrutura cilíndrica estreita se estende da porção anterior do acrossoma até dentro do núcleo, também foi observado que a acromatina é compacta. A região do pescoço do espermatozoide apresenta centríolos com cerca 0,4 μm de comprimento e centríolos distais muito mais longo, aparentemente se estendem por todo o comprimento da peça central. A peça central dos espermatozoides contém cerca de 30 mitocôndrias e a peça principal é caracterizada por uma pequena bainha fibrosa e pequenas fibras densas que são observadas apenas nesta região.

No tocante a obtenção de sêmen nas emas, somente a técnica de massagem digital foi relatada (PHILLIPIS; ASA, 1989; GÓES et al., 2010). Essa técnica foi aplicada em 69 animais em estação reprodutiva, dos quais, 46 apresentaram amostras com células espermáticas e destas 27 tiveram amostras limpas e 19 amostras contaminadas, apontando 66% de eficiência dessa técnica na coleta de sêmen em emas (GÓES et al., 2010). As amostras de sêmen apresentaram volume médio de $0,68 \pm 0,14$ ml, motilidade variando de 40 a 80% com média de $61,11 \pm 11,54\%$, concentração de $3,29 \pm 1,33 \times 10^9$ espermatozoides/ml e grande variedade de alterações morfológicas, tais como cabeça

dobrada, cauda dobrada, fortemente dobrada, cauda fortemente enrolada, cauda enrolada e inserção retroaxial (GÓES et al., 2010).

Apesar das valiosas descobertas que já se têm sobre os aspectos reprodutivos das emas, ainda há uma insuficiência de dados importantes que contribuiriam para o conhecimento da fisiologia reprodutiva das emas, bem como para a aplicação de biotécnicas reprodutivas. Não existem, por exemplo, informações sobre a maturação do espermatozoide no epidídimo e seu armazenamento no ducto deferente. Sabe-se que o epidídimo das aves possui várias funções entre elas o transporte e a maturação dos espermatozoides, secreção e reabsorção dos fluidos e remoção de espermatozoides degenerados (FRANZO; VULCANI, 2010). Em termos funcionais, aparentemente, o ducto epididimário de aves equivaleria à cabeça do epidídimo de mamíferos e o ducto deferente, nesta classe, corresponderia ao corpo e à cauda epididimários de mamíferos (DE REVIERS, 1975). Assim, seria necessário coletar espermatozoides dos diferentes segmentos e analisa-los para avaliar sua evolução. Também, há uma carência de métodos de obtenção de espermatozoides que possam ser aplicados também em animais mortos, visando recuperar material para a formação de bancos de germoplasma. Ainda, há a necessidade de se adequar técnicas de avaliações espermáticas que melhor indicariam o potencial fertilizante das amostras de espermatozoides para as emas, no intuito de se conhecer seus parâmetros fisiológicos espermáticos, para assim, ser possível a compreensão dos efeitos que os métodos de criopreservação propostos possam ter sobre seu espermatozoide.

2.3.Métodos de obtenção de espermatozoides em aves

O primeiro passo para a conservação eficiente de gametas masculinos se baseia na obtenção adequada do material. Em aves, já foram descritos vários métodos de coleta, no entanto, estes se diferenciam entre as espécies. Para galos e perus domésticos a técnica mais utilizada é a massagem abdominal descrita por Burrows e Quinn (1937), essa metodologia também já foi aplicada em periquitos (PEIXOTO, 2010) e perdizes-vermelhas (VILLAYERDE-MORCILLO et al., 2015). No entanto, este método exige contenção física e, aliado ao manuseio excessivo, pode causar estresse no animal. Além disso, é observado amostras com contaminação com urina dificultando a qualidade das amostras (CARVALHO; FRENEAU; SANTOS, 2006).

Para diversas espécies de aves silvestres, como o araçari-do-bico-branco, araçari-banana, araçari-poca, tucano-de-bico-verde, tucano-de-peito-branco, coruja-diabo, corujão-orelhudo, coruja-das-torres, gavião-pegamacaco, gavião real, urubu-rei, urumutum, jacutinga, cisne-de-pescoço-preto, cisne-coscoroba, papagaio-verde, arara-azul-grande e maracanã-verdadeiro, foi descrito o uso da eletro ejaculação (FREDIANI et al., 2019). Em patos (ONISHI; KATO; FUTAMURA, 1955), marrecos Muscovy (GVARYAHU et al., 1984) e emús, foi descrito o uso de cloaca artificial associado a dois métodos de estimulação do macho: no primeiro método utilizou-se uma fêmea como manequim e no segundo método, o próprio técnico servia de manequim (MALECKI; MARTIN; LINDSAY, 1997). O uso da cloaca apresenta a vantagem de uma reduzida contaminação por urina, fezes e contaminantes orgânicos (SETIOKO; HETZEL, 1984; GRUNDER; PAWLUCZUK, 1991), no entanto, apresenta a desvantagem de que os machos necessitam ser treinados (CARVALHO; FRENEAU; SANTOS, 2006).

Nos avestruzes, Rautenfeld, (1977) foi o primeiro a descrever um método de obtenção de sêmen utilizando massagem digital na papila do ducto seminífero. Este método demonstrou-se eficaz e causador de pouco estresse, uma vez que consiste em colocar o animal em um pequeno brete, um saco de pano é colocado em sua cabeça para acalmá-lo, um assistente introduz a mão na cloaca e expõe o falo, realizando a massagem até a ejaculação. Posteriormente, Góes et al. (2010) extrapolou essa técnica para as emas com algumas modificações obtendo uma eficiência de coleta de 66%.

Apesar de os métodos de obtenção de sêmen de aves se mostrarem promissores, ainda existem entraves, como por exemplo, muitas vezes as amostras apresentam-se altamente contaminada com urina, tornando difícil a determinação dos valores de concentração, volume e pH (CARRER; KORNFELD, 1999; HICKS-ALLDREDGE, 1996).

Em adição, a obtenção de espermatozoides de animais mortos acidentalmente surge como importante alternativa para salvaguardar o animal genético de animais valiosos, visando a formação de bancos de germoplasma. De fato, em mamíferos, a recuperação espermática diretamente do epidídimo já foi relatada em diversas espécies (BEZERRA et al., 2014), proporcionando a obtenção de células morfolologicamente viáveis, possuindo um grau adequado de maturidade, e com capacidade fecundante (FOOTE, 2000; MONTEIRO et al., 2011). Nestes, o método de flutuação, no qual o epidídimo é cortado em um meio já foi relatado com sucesso na obtenção de espermatozoides de várias espécies, como panda gigante (PÉREZ-GARNELO et al., 2004), bisonte europeu (KOZDROWSKI et al., 2011), urso marrom da Cantábria (ANEL et al. 2011) e catetos

(BEZERRA et al., 2014). Do mesmo modo, a lavagem retrógrada do epidídimo, injetando um meio tamponado no ducto deferente, também tem sido aplicada com sucesso em espécies selvagens, como veados (COMIZZOLI et al., 2001), o búfalo africano (HEROLD et al., 2004) e a cutia (SILVA et al., 2011).

Nas aves, porém, é observado que o papel do epidídimo no armazenamento de espermatozoides é desempenhado pelo ducto deferente (RUFINO et al., 2018). Dessa forma, métodos de coletas de espermatozoides a partir dos ductos deferentes de animais abatidos, também já foram descritos (GOPINGER et al., 2012; LEIDENS, 2013; GÓIS, 2018). Em codornas foi possível recuperar espermatozoides viáveis (60%) e com motilidade ($79,16 \pm 0,95\%$) (GÓIS, 2018) e em perdiz-vermelha (LEIDENS, 2013) observou-se que ~70% das células apresentaram mitocôndrias funcionais e membranas e DNA íntegros. Neste sentido, por meio da aplicação das metodologias descritas, fomenta-se a possibilidade de obtenção de espermatozoides tanto dos epidídimos quanto dos ductos deferentes de emas recém abatidas.

2.4. Criopreservação de espermatozoides em aves

O principal uso da criopreservação de sêmen em aves é o manejo ex situ de recursos genéticos no contexto de uma dramática diminuição da biodiversidade genética aviária. Isto é conseguido através dos criobancos de germoplasma, e atualmente, os três principais programas de criobancos de germoplasma aviário em operação estão na América do Norte, Holanda e França (EHLING et al., 2012), sendo extremamente limitada a atuação do Brasil no tocante a formação destes criobancos em aves.

A criopreservação pode ser definida como o processo pelo qual células ou tecidos inteiros são preservados indefinidamente para uso futuro, reduzindo a temperaturas abaixo de zero, como $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Neste processo, a célula ou tecido passa para o estado de criptobiose em resposta a condição adversa (SMITH, 2016). No entanto, é necessário que, após a descongelação, a célula ou tecido retome sua função para que o protocolo de congelação seja considerado eficiente.

Para a manutenção de bancos de germoplasma, fazem-se necessários estudos aperfeiçoando os protocolos de criopreservação e aplicação em novas espécies de interesse. Sabe-se que a estrutura e composição das células é específica da espécie e do indivíduo, com composição e propriedades moleculares únicas que determinam a sensibilidade da célula aos processos de criopreservação, exigindo protocolos

especializados para uma ótima sobrevivência *in vitro* e *in vivo* após o degelo (BLESBOIS et al., 2005).

Métodos eficientes para congelar sêmen de galos de diferentes raças tem sido estudados desde a segunda metade do século XX e, posteriormente, extrapolados para perus, galos d'angola, patos, gansos e algumas espécies selvagens (BLESBOIS, 2007). Em avestruzes, Smith (2016) congelou o sêmen testando os crioprotetores dimetilacetamida, metilacetamida e dimetilsulfóxido em diferentes concentrações de 4 a 16%, no qual observou-se que os parâmetros avaliados pós-descongelção (morfologia normal, integridade funcional da membrana, viabilidade da membrana, motilidade progressiva, motilidade, velocidade curvilínea, velocidade linear e velocidade média) foram mantidos no mesmo nível após a adição e o equilíbrio do crioprotetor durante os estágios de pré-processamento, quando a dimetilacetamida foi utilizada em uma concentração de 16%. Embora a congelação e a descongelção tenham reduzido acentuadamente os parâmetros espermáticos em ~50%, a maior integridade e funcionalidade espermática foi mantida pela dimetilcetamida a 16%. Nas emas ainda não foi descrita a criopreservação de espermatozoides, fazendo-se necessário o desenvolvimento de um protocolo eficiente visando a formação de um banco de germoplasma da espécie.

Sabe-se que os métodos de criopreservação expõem as células espermáticas a severas alterações. Para minimizar os danos causado durante o processo são utilizadas substâncias como: diluentes, crioprotetores externos e internos, antioxidantes, antiotibióticos. Além disso, buscam-se as concentrações adequadas dessas substâncias para cada espécie (BLESBOIS; BRILLARD, 2007).

2.4.1. *Diluentes*

A adição de diluentes ao sêmen, além de maximizar o uso do ejaculado, diminui os custos da inseminação artificial (CHRISTENSEN, 1995) e, por este motivo, vários diluentes têm sido desenvolvidos e vem sendo utilizados comercialmente. Um bom diluente deve apresentar a ação tamponante, fornecer nutrientes, substrato energético, estabilidade da membrana plasmática e manutenção da pressão osmótica (BORTOLOZZO et al., 2005).

Nas aves, vários diluentes já foram testados na refrigeração. Em periquitos-australianos, Peixoto (2010) testou os diluentes Lake®, TRIS-citrato-gema de ovo e TES-

TRIS para a refrigeração a 5°C. Sendo constatado que o meio Lake® apresentou melhores resultados para o resfriamento do sêmen após 24 horas, com média de motilidade de 29,67% diferindo do Tris- citrato (4,83%) e Tes-tris (17,30%).

Outro diluente comercial que já foi relatado em aves é o OVODYL™. Seu uso já foi relatado em perdizes machos (*Rhynchotus rufescens*) no qual o sêmen foi diluído e refrigerado até 48 horas, observando-se uma motilidade de $37,1 \pm 23,7\%$ após 24 horas e uma queda para $24,7 \pm 18,8\%$ após 48 horas de refrigeração (CAVALCANTE, 2006). Na primeira refrigeração a 5°C de sêmen de galo-lira e galo-silvestre foi utilizado o diluente OVODYL™ sendo observado que após 48 horas as amostras de sêmen de galo lira apresentaram $37,5 \pm 20,8\%$ de motilidade e o sêmen de galos silvestres $54,0 \pm 14,4\%$ (CIERESZKO et al., 2011). Adicionalmente aos trabalhos envolvendo refrigeração, o diluente OVODYL™ também já foi utilizado na congelação de espermatozoides. Nos galo-lira e galo-silvestre, tendo sido observado que a criopreservação garantiu de 40 a 60% de motilidade pós-descongelação (CIERESZKO et al., 2011).

Atualmente, a água de coco em pó (ACP) vem ganhando destaque na preservação de espermatozoides de várias espécies, seu uso já foi relatado na refrigeração de sêmen de capotes (*Numida meleagris*), sendo obtida uma média de 88% de motilidade no sêmen refrigerado a 4°C (RONDON et al., 2008). Além disso foi relatado o uso da ACP como preservante de sêmen de galos (FREITAS et al., 2018). A ACP que é transformada em material pulverizado mantém as propriedades fundamentais do líquido *in natura* com estabilidade e longevidade, que pode ser empregada em processos biotecnológicos, substituindo produtos importados, quimicamente constituídos e com preços elevados (MOREIRA-NETO et al., 2009). Por ser uma solução natural estéril, ligeiramente ácida, composta de proteínas, sais, açúcares, vitaminas, gorduras neutras, além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, que lhe conferem densidade e pH compatíveis com o plasma sanguíneo, a água de coco fornece os nutrientes necessários para manter a sobrevivência e a viabilidade dos gametas masculinos e femininos criopreservados (LAVOR; CÂMARA, 2012).

2.4.2. Crioprotetores

Os agentes crioprotetores são substâncias que oferecem proteção aos espermatozoides durante o processo de congelação bem como durante a descongelação (SQUIRES et al., 1999; ARRUDA, 2000). Estes apresentam a função de evitar danos ocasionados pela redução da temperatura como a formação de cristais de gelo, reduzir o estresse osmótico por meio da reposição de água necessária para manutenção do volume celular, interagir com íons e macromoléculas e reduzir o ponto de congelação da água (MEDEIROS et al., 2002).

Os crioprotetores são classificados em intracelulares ou penetrantes e extracelulares ou não penetrantes. Crioprotetores intracelulares são pequenas moléculas que penetram pela membrana da célula por difusão, formam pontes de hidrogênio com moléculas de água presente no interior da célula, reduzindo a formação dos cristais de gelo (JAIN; PAULSON, 2006). A gama de crioprotetores utilizados nos espermatozoides de aves inclui glicerol, dimetilsulfóxido, dimetilacetamida, etilenoglicol, dimetilformamida e propileneglicol (BLESBOIS, 2007). A metilcetamida foi testada em avestruz e embora a concentração mais alta (12%) tenha se mostrado como a mais eficaz, os resultados pós-descongelação ainda foram insatisfatórios (MALECKI; KADOKAWA, 2011). Já Sood et al. (2011) consideraram a dimetilcetamida a 9% ideal para a viabilidade máxima pós-descongelação dos espermatozoides de emú.

Em combinação com os crioprotetores intracelulares, são utilizados crioprotetores extracelulares nos meios de congelação visando diminuir a concentração destes dentro da célula e, conseqüentemente, a toxicidade (PEREIRA; MARQUES, 2008). Os crioprotetores não penetrantes possuem alto peso molecular e permanecem no meio extracelular (VAJTA; NAGY, 2006), aumentando a osmolaridade do meio extracelular, sendo responsáveis pela passagem da água do interior da célula espermática para o meio extracelular, impedindo, assim, a formação de cristais de gelo no seu interior durante a congelação (KEITH, 1998). Um exemplo de crioprotetor externo é a gema de ovo, componente comumente utilizado para suplementar diluentes de sêmen, é rica em lipoproteínas de baixa densidade (LDL), cujos principais fosfolipídios são a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina (ANTON et al., 2003). O uso da gema de ovo de galinha como crioprotetor já foi relatado em espermatozoides de galo a 15% associada a DMA a 6% onde observou-se uma maior proteção espermática, com uma motilidade pós descongelação de 14,3% no entanto exerce um papel contraceptivo no trato genital

da galinha (SANTIAGO-MORENO et al., 2012). Em galos vermelhos da selva indiana a gema de ovo foi testada nas concentrações de 10, 15, 20 e 25% em comparação ao glicerol na concentração de 20%, e, observou-se que os melhores resultados pós-descongelção foram com a gema a 15% ($75,0 \pm 2,8\%$ de motilidade, $79,3 \pm 1,8\%$ de integridade de membrana plasmática e $75,9 \pm 1,5\%$ de integridade do acrossoma (RAKHA et al., 2018). Sabe-se que as propriedades protetoras da gema do ovo são atribuídas ao seu conteúdo de LDL, possivelmente a membrana do espermatozoide incorpore fosfolipídios e colesterol dessas lipoproteínas e seu uso isolado também têm sido proposto para o espermatozoide de aves (BERGERON et al., 2004; SHAHVERDI et al., 2015).

2.5.Métodos de avaliação espermática

A avaliação de uma amostra de sêmen é de grande importância para prever a capacidade fecundante antes ou após um protocolo de criopreservação (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2009). Os parâmetros rotineiramente avaliados nos ejaculados são a motilidade, concentração, morfologia e integridade das membranas plasmática e acrossomal por meio da microscopia de óptica (CRESPILHO et al., 2009). Com o objetivo de aumentar a acurácia em prever o potencial de fertilidade do sêmen, novos métodos de avaliações e outros testes complementares vêm sendo utilizados rotineiramente. Dentre estes, podem ser citados as avaliações por meio da Análise Computadorizada de Sêmen (CASA) na qual é possível avaliar os parâmetro cinéticos dos espermatozoides (VERSTEGEN et al., 2002), o teste hiposmótico, que avalia a funcionalidade da membrana plasmática (JEYENDRAN et al., 1984), a microscopia de fluorescência que associada as sondas fluorescentes torna possível uma avaliação mais fidedigna da integridade da membrana plasmática, da cromatina, do acrossoma e da atividade mitocondrial (CELEGHINI et al., 2007; RODRIGUES; ROCHA; BELETTI, 2009).

2.5.1. Morfometria e Morfologia espermática

A morfologia e a morfometria espermáticas tem sido consideradas importantes na avaliação espermática desde o início do desenvolvimento das técnicas de reprodução artificial. As dimensões medidas com precisão das estruturas das células espermáticas

(especialmente a cabeça) podem ser usadas como indicadores de influências ambientais, para melhorar o entendimento das estratégias reprodutivas e evolutivas e para otimizar técnicas de reprodução assistida como por exemplo a criopreservação de espermatozoides (SANTIAGO-MORENO et al., 2016). Nesse sentido, o tamanho da cabeça do espermatozoide influencia o volume de água transportado pela célula, bem como a permeabilidade da membrana celular à água e ao crioprotetor, afetando, por sua vez, as taxas de sobrevivência das células (SANTIAGO-MORENO et al., 2016).

Uma das formas de se analisar a morfometria espermática é por meio de análise computadorizada (CASA-Morph), esta fornece um método preciso e confiável para avaliar a morfometria espermática, reduzindo o problema de subjetividade associado à avaliação visual humana. Os sistemas computadorizados foram padronizados para uso com sêmen de diferentes espécies de mamíferos. No entanto, os espermatozoides aviários, são filiformes, limitando sua análise com esses sistemas, que foram desenvolvidos para examinar as cabeças aproximadamente esféricas dos espermatozoides de mamíferos (SANTIAGO-MORENO et al., 2016). Outra forma de análise morfométrica dos espermatozoides aviários é a utilização da microscopia óptica associada a programas de captura de imagem, no entanto, os dados obtidos por esta metodologia são relativamente escassos (Du PLESSIS L; SOLEY, 2014).

A avaliação da morfologia espermática além de fornecer dados sobre a qualidade das células espermáticas pode fornecer também dados sobre o sistema reprodutor do macho, pois qualidade do sêmen por meio do estudo da morfologia do espermatozoide também pode refletir a saúde dos túbulos seminíferos e epidídimos (BARTH; OKO, 1989). Uma alta frequência de espermatozoides anormais ou alta incidência de um único defeito podem reduzir a fertilidade (ARRUDA et al., 2011).

Na avaliação da morfologia espermática de aves são contadas 200 células espermáticas por amostra de sêmen, anotando-se as formas anormais. Os defeitos espermáticos geralmente são classificados em defeitos de cabeça [enrolada, turfeita (inchada), dobrada e isolada], defeitos de cauda [tumefeitas (inchada), dobrada e isolada], presença de gota e taxa de normalidade RUFINO et al., 2018).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para avaliar a morfologia da célula espermática. A técnica em câmara úmida permite uma avaliação da morfologia espermática, na qual é utilizada a microscopia de contraste de fases ou microscopia de contraste de interferência diferencial sem necessidade de uso de corantes, no entanto

apesar de conservar bem as características morfológicas das células espermáticas, oferece baixa visualização do acrossomo em algumas espécies onde esta estrutura possui um tamanho bem reduzido (ZAMBELLI et al., 1993; SCHÄFER; HOLZANN, 2000; ARRUDA et al., 2011). Para uma melhor visualização podem ser realizados esfregaços de células com corantes (Wright, Rosa de Bengala, Vermelho Congo, Giemsa, Eosina-nigrosina, Karras e outros) e analisadas em microscopia de luz (SOUSA, 2013).

Adicionalmente, para uma maior riqueza de detalhes podem ser realizadas análises morfológicas através da microscopia eletrônica (SILVA et al., 2009). Através das microscopias eletrônicas de varredura e transmissão é possível determinar o tamanho e a forma de estruturas biológicas em escala manométrica, visualizar várias regiões, como acrossomo, cromatina, teca perinuclear, mitocôndrias, axonema, periaxonema e outras estruturas que não são detectáveis por microscopia de luz, permitindo uma descrição mais complexa, detalhada e fidedigna (MORIETTI; SUTERA; COLLODEL, 2016). Em aves o estudo da ultraestrutura do espermatozoide já foi relatado em galos e perus. Nos espermatozoides de galos por meio da microscopia eletrônica de transmissão foi observado um espaço subacrossomal na cabeça que separava o acrossoma de formato cônico do núcleo alongado, a região do pescoço consistia em um complexo centriolar e uma peça de conexão não estriada que se estende apicamente na fossa de implantação. Aproximadamente 30 mitocôndrias circundam o centríolo distal e a porção proximal do complexo axonemal da peça intermediária (BAKST; HOWARTH, 1975). Já nos perus a microscopia eletrônica de varredura permitiu examinar as dimensões médias em micra dos espermatozoides, sendo que o acrossoma possui 1,8 μ , núcleo 9,1 μ , peça central 4,8 μ cauda 61,0 μ , comprimento total de 76,7 μ e o diâmetro máximo da cabeça em sua maior largura foi de 0,8 microns.

Apesar dos enriquecedores dados sobre a morfologia dos espermatozoides de emas já relatados por Góes, (2004) ainda não existem relatos sobre a morfometria e ultraestrutura dos espermatozoides de emas, informações estas de grande importância para o conhecimento da biologia reprodutiva das emas

2.5.2. *Análise Computadorizada de Sêmen*

A Análise Computadorizada de Sêmen (CASA) representa um método objetivo que gera informações importantes a respeito das propriedades cinéticas dos

espermatozoides baseando-se na avaliação individual das células (FERREIRA et al., 1997; JANUSKAUSKA; ZILINSKAS, 2002), além de fornecer um resumo estatístico das subpopulações e a concentração de espermatozoides/mL (VERSTEGEN et al., 2002). Os parâmetros de movimento analisados pelo CASA são: Velocidade Curvilínea (VCL), que consiste na velocidade média do trajeto real do espermatozoide; Amplitude Lateral da Cabeça (ALH), amplitude de deslocamento médio da cabeça do espermatozoide no seu trajeto real; Frequência de Batimento Cruzado (BCF), frequência com que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento; Velocidade Linear Progressiva (VSL) corresponde a velocidade média em função da reta estabelecida entre o início e o fim do trajeto espermatozoide; Velocidade Média da Trajetória (VAP), que é a velocidade média da trajetória do espermatozoide; Índice de Progressão (STR), relação entre VSL e VAP e Índice de Linearidade (LIN), relação entre VSL e VCL (VERSTEGEN et al., 2002; MATOS et al., 2008). Este método já foi relatado para espermatozoides de perus (KOTŁOWSKA et al., 2007; 2012), galos (EHLING et al., 2012) e avestruzes (SMITH et al., 2016), mas os parâmetros cinéticos dos espermatozoides de emas permanecem por serem descritos.

2.5.3. *Teste Hiposmótico*

O teste hiposmótico é realizado com o intuito de identificar a reação do espermatozoide, contento uma membrana celular funcional. Quando o espermatozoide é colocado em solução hiposmótica, permite a passagem da água através da membrana, até o restabelecimento do equilíbrio osmótico entre fluidos extra e intracelular (JEYENDRAN et al., 1984). Com a passagem da água para o interior da célula, há um aumento do volume celular (edema), ocasionando assim o dobramento da cauda (JEYENDRAN *et al.*, 1984).

Para aplicação em diferentes espécies, é necessário determinar a osmolaridade específica das soluções que serão utilizadas no teste em relação às espécies que estão sendo avaliadas (SANTOS et al., 2013). Em geral, a solução hiposmótica ideal deve exercer um estresse osmótico grande o suficiente para causar um aumento observável no volume, mas pequeno o suficiente para evitar lises da membrana espermática (JEYENDRAN et al., 1984).

Em perus, o teste hiposmótico foi aplicado com sucesso nos espermatozoides de perus, onde o inchaço máximo das caudas dos espermatozoides ocorreu na água com uma osmolalidade de apenas 19 mOsm/kg (DONOGHUE et al., 1996). Já em falcões peregrinos, as células espermáticas foram expostas a uma solução de NaCl a 50 mOsm/kg por 10 minutos causando morte da maioria dos espermatozoides em contraste com os espermatozoides de três espécies de águias, que eram muito mais tolerantes (BLANCO et al., 2000).

Em emús, mostrou-se que a osmolalidade de mOsm/kg era adequada para se realizar o teste hiposmótico (MALECKI; REED; MARTIN, 2005). Em outro estudo com emús as osmolalidades de 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250 e 300 mOsm/Kg foram testadas e observou-se a resposta máxima de 70% a 50 mOsm/kg, sendo significativamente maior ($p < 0,001$) do que a 75 mOsm/kg e as demais osmolalidades (MATSON; KAPPELLE; MALECKI, 2009).

Em periquitos, a água destilada foi utilizada como solução hiposmótica para avaliar espermatozoides em microscopia de contraste de fases, sendo observado pequeno percentual de dobramento de cauda (PEIXOTO, 2010).

É válido ressaltar que em emas o teste hiposmótico nunca foi aplicado, sendo necessário testes com soluções de diferentes osmolaridades para definir a que melhor se adequa a espécie.

2.5.4. Avaliação da integridade da membrana plasmática

A membrana plasmática é uma das partes mais sensíveis do espermatozoide e por isso é uma das primeiras estruturas a sofrerem modificações (KROGENAES et al., 1994). Nesse sentido, avaliar a integridade da membrana plasmática é essencial para garantir a qualidade da amostra de espermatozoides. Podendo ser avaliada por meio da utilização de esfregaços corados com substâncias que possuem ação dependente da capacidade da membrana celular ser permeável ou não à penetração dos mesmos no compartimento nuclear do espermatozoide (OLIVEIRA et al., 2009). Um exemplo de corante que pode ser utilizado para avaliar a integridade da membrana plasmática da célula espermática é a eosina-nigrosina, um corante supravital, que penetra em espermatozoides possuidores de membrana lesionada, e ao penetrar na célula promove uma coloração rosa ao núcleo (TARTAGLIONE; RITTA, 2004). O uso da eosina e

nigrosina para avaliação da integridade da membrana plasmática já foi relatado em galos por Góes et al., (2011) em espermatozoides de perdizes se mostrando uma técnica eficaz.

Outro exemplo de corante que pode ser utilizado para a avaliação da integridade da membrana plasmática celular é o Azul de Bromofenol que foi descrito por Derivaux (1980) para sêmen bovino, sendo uma coloração simples, de fácil preparação, baixo custo e aplicável à campo (MEDEIROS et al., 2006). A coloração com o azul de bromofenol é realizada com o intuito de avaliar a membrana através da confecção do esfregaço com uma alíquota de sêmen e a mesma proporção do corante. O corante penetra na célula que apresenta membrana desintegrada e cora em azul (SOUSA et al., 2013). É válido ressaltar que o uso desses corantes na avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides de emas ainda não foi relato e que essas técnicas são de baixo custo e facilmente aplicadas a campo. Assim, seu uso poderia incrementar os espermogramas de emas com informações valiosas.

Várias sondas fluorescentes podem ser utilizadas para a avaliação da integridade da membrana plasmática espermática tais como: Iodeto de Propídio, SYBR-14®, YoPro-1, Hoechst 3342 e 3258 e Diacetato de Carboxifluoresceína (SILVA; GUERRA, 2012). Todavia, o iodeto de propídio (IP) vem se destacando em pesquisas pela sua facilidade de preparação e aplicação da técnica, estabilidade e eficiência na avaliação da integridade da membrana. Esta sonda possui afinidade pelo DNA e é impermeável à célula marcando em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada. (ARRUDA et al., 2003). Associado ao IP podem ser utilizados fluoróforos permeáveis a membrana plasmática como o Hoechst (H3342) atuando como marcador de membrana íntegra emitindo fluorescência azul (MAXUEWLL et al., 1997).

Já foram relatados estudos utilizando a associação de sondas fluorescentes SYBR-14 e o IP para avaliar a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides do frango doméstico (*Gallus domesticus*), peru doméstico (*Meleagris gallopavo*), águia-dourada (*Aquila chrysaetos*), águia-de-bonelli (*Hieraaetus fasciatus*), águia-imperial (*Aquila adalberti*), falcão-peregrino (*Falco peregrinus*) e grou-canadiano (*Grus canadenses*), obtendo-se bons resultados de viabilidade no sêmen fresco (BLANCO et al., 2000). Em galos também foi utilizado IP mostrando que essa sonda é eficiente para avaliação da integridade da membrana plasmática (CELEGHINI et al., 2007). Nos periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) foram utilizadas a associação dos fluoróforos IP e

CFDA, que embora apresentasse bons resultados com o sêmen fresco não possibilitou a visualização de marcação nos espermatozoides descongelados (PEIXOTO, 2010).

2.5.5. Avaliação da integridade do acrossoma

Alguns métodos foram desenvolvidos para detectar o status acrossomal dos espermatozoides. Dentre estes, o uso da coloração com o Azul de Coomassie G-250 mostrou-se simples e rápido para avaliação da integridade do acrossoma de humanos, bovinos, suínos, coelhos, porquinhos-da-índia e camundongos (LARSON; MILLER, 1999). Nesta técnica, os espermatozoides inicialmente são fixados, posteriormente submetidos a lavagens e corados para então serem avaliados conforme a coloração observada no acrossoma (THIANGTUM et al., 2006).

A integridade do acrossoma, bem como a manutenção de suas enzimas, são cruciais para que ocorra a fertilização (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Nesse sentido, a avaliação dessa estrutura é fundamental. A integridade do acrossomo pode ser verificada por diferentes técnicas de fluorescência. Pelo fato do acrossoma intacto possuir natureza ácida sondas acidofílicas tais como o LysoTracker Green DND-26 (LYSO-G) podem ser utilizadas como marcadores da integridade acrossomal (THOMAS et al., 1997). Marcadores dos constituintes acrossomais também podem ser enzimáticos ou imunológicos. Neste caso, marcadores enzimáticos da acrosina, como inibidores da protease serina podem ser ferramentas fluorescentes de mensuração da integridade acrossomal (PALENCIA et al., 1996). Técnicas de imunofluorescência também podem identificar acrossomas lesados por preenchimento secundário com fluoróforos, como o uso de anticorpos anti-acrosina (THOMAS et al., 1997) e anticorpos anti-hialuronidase (BACCETTI et al., 1999). Adicionalmente, devido o caráter glicoprotéico dos componentes acrossomais pode-se avaliar a integridade acrossomal, por preenchimento fluorescente da matriz acrossomal lesionada com lecitinas marcadas (GRAHAM et al., 1990). As aglutininas, tais como aglutinina de *Pisum sativum* (PSA), aglutinina de *Ricinus communis* (RCA), aglutinina de *Arachis hypogea* (PNA) (CROSS; MEIZEL, 1989) ou *Concanavalia ensiformis* (ConA), que possuem especificidade a glicoproteínas da membrana crossomal, têm sido usadas para determinar a integridade acrossomal. Para a visualização do acrossoma em microscopia de fluorescência, as aglutininas devem ser conjugadas a fluoresceínas, como o isotiocionato de fluoresceína (FITC)

(FARLIN et al., 1992; HOLDEN et al., 1990). Em galos utilizou-se o FITC- PSA na avaliação da integridade do acrossoma demonstrando que essa sonda é eficaz nesta análise (CELEGHINI et al., 2007; SHAHVERDI et al., 2014).

2.5.6. *Avaliação da condensação da cromatina*

A condensação do material nuclear é um importante evento da diferenciação nuclear durante a espermatogênese. Estudos mostram que a permanência de histonas somáticas ou ocorrência de anormalidades nas protaminas podem levar à formação de distúrbios de condensação da cromatina dos espermatozoides que se torna frouxa (RODRIGUES; ROCHA; BELETTI, 2009). Nesse sentido, mesmo com espermogramas normais os reprodutores podem se comportar como subfêrteis, tendo como uma possível explicação as alterações na compactação da cromatina dos espermatozoides (BRITTO; MELLO, 1988).

Desse modo, vários métodos para avaliar a integridade da cromatina em espermatozoides já foram descritos. Com relação as análises a nível de condensação da cromatina, destacam-se as análises citoquímicas que podem ser realizadas utilizando corantes nucleares em microscopia óptica, como o Azul de Toluidina (TALEBI et al., 2012). O Azul de Toluidina é um corante metacromásico, isto é, promove alterações de cor devido à ligações em estruturas particulares de células e tecidos, neste caso ele tem sido associados a condensação da cromatina devido à redução das pontes de dissulfeto entre as protaminas, ligando-se a grupos fosfatos livres no DNA, corando de azul escuro à violeta cromatinas espermáticas anormais (EXBRAYAT, 2013; ANDREETTA et al., 1995; MELLO, 1982).

A detecção de anomalias na cromatina dos espermatozoides em aves já foi verificada em galos. Soares e Beletti (2006) compararam as alterações morfológicas e de compactação de cromatina com a fertilidade de dois lotes de galos. Eles observaram que, no lote com os galos mais férteis, foi encontrado maior número de espermatozoides com alterações morfológicas, enquanto no lote com menor fertilidade foi encontrado um maior número de alterações na compactação da cromatina, mostrando a importância desta característica na fertilidade dos galos. Além disso, Rodrigues, Rocha e Beletti (2009) testaram a avaliação de condensação da cromatina utilizando o corante Azul de toluidina e um software para a leitura das lâminas e observaram que os espermatozoides de galos velhos apresentaram mais alterações na cromatina que os de galos jovens.

2.5.7. *Avaliação da função mitocondrial*

A função mitocondrial pode ser avaliada sob microscopia de fluorescência por diversas sondas: Rodamina 123 (R123); o MitoTracker green FM (MITO); o iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1); o 8-(4'-clorometil)-fenil-2,3,5,6,11,12,14,15-octahidro-1H,4H,10H,13H-diquinolizino-8H-xanteno (H2-CMXRos) e o cloreto de 8-(4-clorometil) fenil 2,3,5,6,11,12,14,15 octahidro-1H,4H,10H,13H-diquinolizino-8H-xantilio (CMXRos- Mito Tracker red®) (CELEGHINI, 2009). O CMXRos é um marcador catiônico e fluorescente intrinsecamente. Devido ao seu potencial de membrana, mitocôndrias funcionais absorvem este marcador. Uma vez que a sonda esteja acumulada na mitocôndria, o grupo clorometil pode reagir com nucleófilos acessíveis, incluindo grupos tiol de peptídeos e proteínas, para formar um conjugado fixável ao aldeído (POOT et al., 1996).

3. JUSTIFICATIVA

Devido ao seu papel econômico e a relevante função ecológica é de extrema importância o conhecimento acerca da sua biologia reprodutiva e pesquisas envolvendo aplicação de técnicas reprodutivas em emas, pois essas informações poderão auxiliar a conservação da espécie, bem como sua reprodução em cativeiro. Atualmente são escassas as informações acerca da biologia reprodutiva e praticamente inexistente a aplicação de biotécnicas aplicadas a reprodução das emas, por exemplo, ainda não existem relatos detalhados acerca dos eventos que envolvem a maturação espermática no epidídimo e ducto deferente, não foram propostas metodologias para conservação de espermatozoides e ainda há necessidade de um protocolo de avaliações espermática mais completo que melhor indicaria o potencial fertilizante de uma amostra.

Desse modo, as informações que o presente estudo irá proporcionar poderão contribuir para o conhecimento da biologia reprodutiva das emas, bem como para o aprimoramento dos protocolos de avaliação espermática, além de propor a criopreservação espermatozoides de emas. Consequentemente, tais informações poderão auxiliar a formação bancos de germoplasma masculino, úteis para a conservação de indivíduos geneticamente vulneráveis.

4. HIPÓTESES

- É possível a obtenção de espermatozoides viáveis a partir dos epidídimos e ducto deferente de emas por meio das técnicas de lavagem retrógrada e flutuação
- A utilização de água destilada (0mOsm/L) para o teste hiposmótico de espermatozoides de emas é eficaz para a avaliação da função de membrana espermática nesta espécie.
- A integridade da membrana plasmática de espermatozoides de emas pode ser eficientemente avaliada por meio do corante Azul de Bromofenol.
- A avaliação da integridade do acrossoma utilizando a sonda fluorescente FITC-PSA é mais eficiente que o corante Azul de Coomassie para espermatozoides de emas.
- O método de avaliação de condensação da cromatina de espermatozoides utilizando o corante Azul de Toluídina é eficiente para emas.
- A associação das sondas fluorescentes Iodeto de Propídio, Hoechst 3342 e Mito traker red® são competentes para avaliar a integridade da membrana plasmática e a atividade mitocondrial de espermatozoides de emas.
- O diluente OVODYL™ é superior aos diluentes TRIS, TES e ACP na manutenção dos parâmetros espermáticos de emas durante a criopreservação.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo Geral

- Estabelecer protocolos eficientes para a obtenção, avaliação e conservação de espermatozoides de emas (*Rhea americana*).

5.2. Objetivos Específicos

- Testar os métodos de obtenção de espermatozoides por flutuação e lavagem retrógrada do ducto deferente em emas.
- Caracterizar as mudanças estruturais que ocorrem durante a maturação do espermatozoide ao longo do seu trajeto no epidídimo e ducto deferente
- Caracterizar a morfometria do espermatozoide de emas.
- Testar e validar métodos adequados para avaliações de integridade e funcionalidade da membrana plasmática, atividade mitocondrial, morfologia, condensação de cromatina e integridade do acrossoma de espermatozoides de emas.
- Comparar os diluentes TRIS, TES, ACP e OVODYL™ na criopreservação dos espermatozoides de emas.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Locais de execução e bioética

Os animais utilizados serão provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS), da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). O CEMAS é registrado no IBAMA como criadouro científico sob o número 12.492-0004. A UFERSA está localizada a 5°11' de latitude sul e 37°20' de longitude oeste e altitude média de 16m em uma região caracterizada por clima tropical semiárido, apresentando classificação climática de Köppen do tipo seco e muito quente, com temperatura anual média de 27,4°C. A obtenção dos espermatozoides a partir dos complexos epidídimo-ducto deferente, avaliações e refrigeração serão realizados no Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal (LCGA), o processamento das amostras para as microscopias eletrônicas será realizado no Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada e as imagens serão obtidas no Laboratório de Microscopia Eletrônica da UFERSA.

O projeto será submetido ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO) e ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEU -UFERSA) para apreciação e adequação as normativas vigentes de bem-estar animal.

6.2. Animais experimentais e manejo

As emas do CEMAS serão alimentadas com ração concentrada a base de milho, farelo de trigo e farelo de soja, também são fornecidas frutas e a água é fornecida à vontade para os animais diariamente.

Para o experimento, serão utilizadas carcaças frescas de animais que tenham vindo a óbito ou animais que tenham se acidentado sendo necessária a eutanásia. Para a eutanásia, as aves serão anestesiadas e será realizado o procedimento de exanguinação Estes animais deverão ser adultos em idade reprodutiva $\pm$ 2,0 anos de idade e com peso médio de 34,0 kg. A coleta dos complexos testículos-epidídimos ocorrerá durante a estação reprodutiva, entre os meses de maio ou junho e indo até novembro ou dezembro. Para cada fase experimental espera-se um “N” de pelo menos 5 animais.

6.3. Desenho Experimental

A presente tese será dividida em três experimentos:

- No primeiro experimento, os espermatozoides serão obtidos por flutuação de diferentes seguimentos do complexo epidídimo-ducto. As amostras serão processadas para as microscopias eletrônicas de varredura e transmissão afim de se caracterizar as mudanças que ocorrem durante a passagem do espermatozoide por essas estruturas. Além disso, uma alíquota das amostras de espermatozoides será utilizada para a caracterização morfométrica através do software ImageJ®.
- No segundo experimento os espermatozoides serão obtidos pelas técnicas de flutuação e lavagem retrograda, para se comparar esses dois métodos de coleta. Após a obtenção dos espermatozoides, serão validadas diferentes técnicas de avaliações espermáticas: CASA, teste hiposmótico, integridade da membrana plasmática, acrossoma e cromatina espermática, e, atividade mitocondrial.
- No terceiro experimento, os espermatozoides serão obtidos pela melhor técnica testada no experimento 2 e avaliados conforme os testes validados também no experimento 2. Posteriormente, as amostras serão criopreservadas testando-se os diluentes descritos na figura 4.

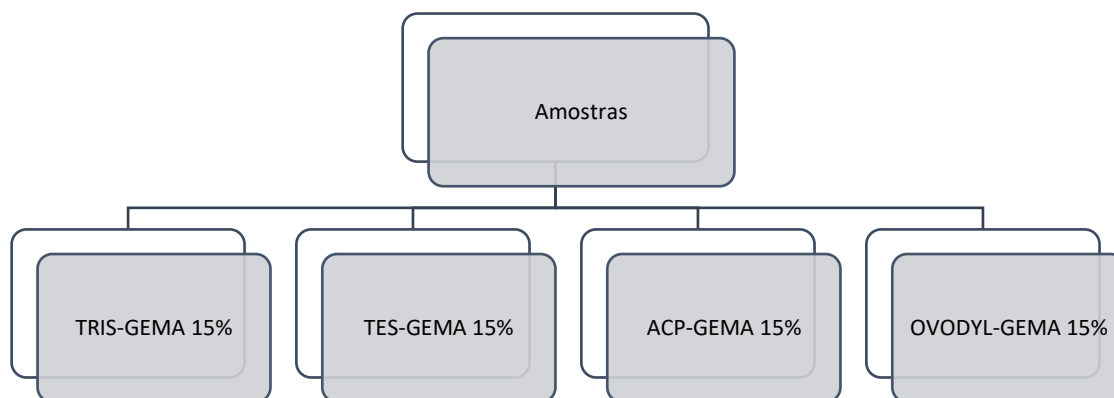


Figura 4. Tratamentos testados no experimento 3

6.4. Experimento 1

6.4.1. Obtenção dos espermatozoides

Após a eutanásia dos animais, os complexos testículos-epidídimos-ductos deferentes serão coletados, envoltos em gaze umedecida com solução fisiológica 0,9% a

38°C colocados em Becker, todos estéreis, e transportados imediatamente até o Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal. Os complexos testículo-epidídimo-ducto deferente esquerdo e direito serão dissecados e lavados externamente com solução fisiológica a 38°C. Será utilizada a técnica de flutuação separadamente em diferentes seguimentos do complexo epidídimo-ducto deferente. Resumidamente, esses seguimentos serão fatiados com bisturi em uma placa de Petri contendo solução fisiológica a 38°C. Após 5 minutos em posição estática, os tecidos serão removidos e a suspensão será avaliada (CARY et al., 2004).

6.4.2. Morfometria Espermática

Esfregaços de rosa de Bengala serão preparado utilizando-se uma alíquota de 5 µL de espermatozoides que será incubada com 45 µL do corante Rosa de Bengala. Posteriormente, serão retirados 10 µL da amostra e depositados sobre uma lâmina que será coberta com uma lamínula e selada para posterior análises. Campos aleatórios da lâmina serão fotografados através a microscopia de luz conectada a software analisador de imagem. Com células serão analisadas a partir das fotomicrografias medindo-se estruturas espermáticas como cabeça, peça intermediária e cauda separadamente por meio do software ImageJ® (SAYED et al., 2017).

6.4.3. Processamento e avaliação por Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

Para a análise da MEV, os espermatozoides serão fixados no reagente de Karnovsky (paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2) a 27 ° C. Após o período de fixação as amostras serão centrifugadas a 800 × g por 10 min, em seguida três lavagens de 5 min cada serão realizadas com tampão de cacodilato de sódio 0,1 M. Posteriormente, os pellets formados serão desidratados e submetidos a banhos de acetona em concentrações crescentes (50, 70, 90 e 100%) por 10 minutos cada. Os pellets serão desfeitos e uma gota (300 µL) da suspensão será depositada em uma lamínula de vidro e seca ao ar. As lamínulas serão montadas em stubs com a ajuda de fita de carbono. Para metalização, os stubs serão colocados em um metalizador e metalizados com uma camada de ouro de 20 nm para posterior observação com um microscópio eletrônico de varredura (BEZERRA et al., 2018).

6.4.4. Processamento e avaliação por Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET

Para a análise da MET, será utilizada a metodologia de Soares e Beletti et al (2006) com modificações, resumidamente, os espermatozoides serão fixados em glutaraldeído a 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Após a fixação por 48 horas, as amostras serão centrifugadas a 800 x g por 10 min, em seguida lavadas em tampão cacodilato (0,1 M, pH 7,2) duas vezes por 10 minutos e então, pós-fixados por quatro horas em glutaraldeído a 3% e uma hora em tetróxido de ósmio a 1% mais ferrocianeto de potássio a 1,25%. Finalmente, o pellet será incluído em resina Epon e posteriormente será cortado em ultramicrotomo para obtenção de cortes ultrafinos. Os cortes serão contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Por fim os cortes serão examinados em microscópio eletrônico.

6.5. Experimento 2

6.5.1. Obtenção dos espermatozoides

No segundo experimento, os espermatozoides serão coletados por flutuação, porém, diferentemente do primeiro experimento o ducto deferente será fatiado integralmente sem divisões. Também será utilizada a lavagem retrógrada, resumidamente, serão realizadas ligaduras nas duas extremidades do ducto deferente, a fim de evitar o extravasamento dos espermatozoides. Na sequência, o segmento será mantido em posição vertical, a ligadura da extremidade inferior retirada e será feita a injeção de solução fisiológica a 38°C no lúmen, com auxílio de uma seringa e agulha imediatamente abaixo da ligadura superior remanescente, fazendo com que os espermatozoides sejam carreados e recuperados na outra extremidade, sendo acondicionados em tubos apropriados (SILVA et al., 2011).

6.5.2. Avaliações espermáticas

Após a coleta dos espermatozoides, será mensurado o volume recuperado utilizando pipetas e tubos graduados. Uma pequena alíquota da solução contendo espermatozoides será depositada sobre lâmina de vidro e levada ao microscópio de luz (100x, 400x), onde

serão avaliados a motilidade espermática (0-100%) e o vigor (0-5). A concentração espermática será avaliada em câmara de Newbauer (SMITH, 2016).

Para avaliação das características morfológicas dos espermatozoides, serão confeccionados esfregaços com o corante Rosa de Bengala. Onde serão analisadas 200 células espermáticas por lâminas sob microscopia de luz (100x), sendo classificadas em morfolologicamente normais ou portadores de alterações subdivididas de acordo com a região espermática afetada (cabeça, peça intermediária, cauda) (GÓES, 2003)

6.5.3. *Teste Hiposmótico*

Alíquotas de sêmen (10 μ L) serão adicionadas a 90 μ L de várias soluções hiposmóticas e incubadas por 40 minutos a 37 ° C. Para tanto, serão utilizadas água destilada (0mOsm / L) e soluções de frutose (50, 100, 150 e 200mOsm / L). Após a incubação, as avaliações serão realizadas sob microscopia de contraste de fase (x1000). Um total de 200 espermatozoides serão contados em pelo menos cinco campos e classificados como reativos ou não reativos com base na presença ou ausência de caudas enroladas (inchadas), respectivamente. A porcentagem de espermatozoides com defeitos na cauda (com base na avaliação da morfologia espermática) será subtraída da porcentagem de espermatozoides reativos (SANTOS et al., 2013).

6.5.4. *Flash Frozen*

Para a validação das avaliações de integridade da membrana plasmática, acrossoma, cromatina e atividade mitocondrial será realizado o *flash frozen*. Resumidamente, as amostras serão divididas em duas alíquotas: uma mantida viável e a outra submetida à congelação rápida em nitrogênio líquido, seguida de descongelação lenta por três vezes consecutivas para causar injúrias à membrana celular (CELEGHINI, 2005). Três tratamentos serão feitos a partir destas alíquotas com as seguintes proporções de espermatozoides frescos e espermatozoides submetidos ao *flash frozen*: 100:0 (T100), 50:50 (T50) e 0:100 (T0).

6.5.5. *Integridade da membrana plasmática por corantes vitais*

Será testado o corante Azul de Bromofenol e Eosina-Nigrosina, para tanto, esfregaços

serão confeccionados a partir de 10 µl de amostra que serão misturadas ao mesmo volume dos corantes, a mistura será depositada em uma lâmina e arrastada com o auxílio de outra lâmina. Após a secagem da lâmina em temperatura ambiente, serão contadas 200 células em microscopia óptica (400x), no qual, para os espermatozoides corados com o Azul de Bromofenol, as células transparentes serão consideradas como possuidoras de membrana plasmática íntegra e as células coradas em azul serão consideradas como células possuidoras de membrana plasmática degenerada (SOUSA et al., 2013). Já para os espermatozoides corados com Eosina-Nigrosina aqueles que apresentarem coloração rosa serão os considerados com membrana plasmática íntegra (CHALAN et al., 1999).

6.5.6. *Avaliação da integridade do acrossoma*

Para avaliação acrossomal, amostras de espermatozoides serão fixadas em 0,5 mL de solução de paraformaldeído a 4% em temperatura ambiente por 15 min e, em seguida, armazenadas a 4°C até serem processadas para coloração acrossomal. Os espermatozoides fixos serão então centrifugados por 8 min a 3000g e o sobrenadante descartado. Os pellets serão lavados duas vezes com 0,5 mL de acetato de amônio 0,1 M (pH 9,0) e o sedimento ressuspensado em aproximadamente 50 µL da solução de acetato de amônio. Uma alíquota desta suspensão será espalhada nas lâminas de microscópio e deixada secar à temperatura ambiente. Após a secagem, as lâminas serão inundadas com coloração de Coomassie (Coomassie Blue G-250 a 0,22%; 50% de metanol, 10% de ácido acético glacial e 40% de água desionizada) por 90 s (Larson e Miller 1999), lavada com água desionizada, seca à temperatura ambiente e preservada permanentemente, colocando uma lamínula sobre uma gota de meio de montagem. De cada amostra, 200 espermatozoides serão avaliados individualmente quanto à integridade acrossomal, utilizando microscopia de campo claro a 1000x. A integridade acrossômica será classificada como: (1) intacta (coloração escura uniforme sobre a região do acrossoma com coloração clara ou inexistente da região pós-acrossomal); (2) danificado (coloração não uniforme ou irregular sobre a região acrossomal); ou (3) não intacto (ausência total de coloração acrossomal ou coloração apenas no segmento equatorial; a região pós-acrossomal geralmente é levemente corada em azul) (THIANGTUM et al., 2006).

6.5.7. *Avaliação da Condensação da Cromatina*

Para a avaliação da integridade da cromatina serão confeccionados esfregaços utilizando-se 10µl das amostras que serão fixados em 3:1 etanol:ácido acético por 1 min e em etanol a 70% por 3 min, posteriormente, serão submetidos a imersão em solução 4M de HCl por 25 min, lavados em água destilada e secados a temperatura ambiente. Em seguida, 5µl de Azul de toluidina serão depositados sobre o esfregaço, sendo coberto por uma lamínula e imediatamente avaliado em microscopia de campo claro, serão contadas 500 células e classificadas em negativos e positivos. Os espermatozoides levemente corados em azul claro serão considerados normais (negativos) e aqueles corados em azul escuro à violeta serão considerados com cromatina alterada (positivos).

6.5.8. *Integridade da membrana plasmática e acrossomal, e atividade Mitocondrial por Fluorescência*

A associação das sondas fluorescentes Iodeto de Propídeo, Hoechst33342, FITC-PS e CMXRos (Mito Tracker Red) será utilizada para avaliar simultaneamente a integridade de membrana plasmática, acrossomal e atividade mitocondrial. Para tanto, serão colocados 150µL das amostras (25×10^6 spz/mL) em um microtubo, posteriormente será adicionado 2µL de Hoechst 33342 (40 µg/mL em DPBS) que serão incubar por 10 minutos a 37° C, em seguida serão adicionados 3 µL de PI (0,5 mg/mL em DPBS), 0,5 µL de CMXRos (500 µM em DMSO) e 50 µL de FITC-PSA (100 µg/mL em DPBS) e incubados por 8 minutos a 38,5° C. Em seguida, as lâminas para microscopia poderão ser preparadas, colocando uma alíquota sobre uma lâmina e recobrimo com lamínula. As avaliações serão realizadas em microscopia de epifluorescência (1000x). Serão avaliadas 200 células, espermatozoides marcados em vermelho (IP) serão considerados com membrana degenerada, espermatozoides marcados em azul (Hoechst) serão considerados com membranas íntegras, espermatozoides com acrossoma marcado em verde-amarelado serão considerados com acrossoma lesionado e espermatozoides com peças intermediárias marcadas em vermelho serão considerados com atividade mitocondrial (CELEGHINI et al., 2007).

6.6. Experimento 3

6.6.1. Congelação e descongelção dos espermatozoides de emas

Para a congelação dos espermatozoides de emas, serão utilizadas como base, as metodologias propostas por Santiago-Moreno et al. (2012) e Smith et al. (2016) com algumas modificações. Dessa forma, inicialmente as amostras serão diluídas nos tratamentos conforme mostrado na figura 4. Serão resfriadas a uma taxa de 1°C/min até a temperatura final de 5°C. Posteriormente será adicionada a dimetilcetamida pré-resfriada de modo que a concentração final seja 6% e a concentração de espermatozoides seja de 100 milhões/ ml. As amostras então serão equilibradas por 15 min a 5°C, em seguida envasada nas palhetas, em seguida, congeladas uma taxa padronizada de 5 °C/min de 5 °C a -20 °C, nucleação a -20 °C e de -20 °C a -80 °C a uma taxa de 10 °C/minuto. Depois disso, as palhetas serão mergulhadas em nitrogênio líquido a -196°C. As palhetas serão então descongeladas após pelo menos uma semana por 1 minuto e 20 segundos a 5 °C, posteriormente, as amostras serão transferidas para tubos em banho maria a 38° C e serão avaliadas conforme citado para o material fresco.

6.7. Análise Estatística

Todas as variáveis serão expressas como média e erro padrão, a análise de homocedasticidade será realizada pelo teste de Levene e a normalidade será verificada através do teste de Shapiro-Wilk e partir desta análise inicial, serão estabelecidos os testes estatísticos mais adequados para a comparação das médias.

7. RESULTADOS ESPERADOS

Ao final da pesquisa, espera-se contribuir com conhecimentos acerca da biologia reprodutiva das emas (*Rhea americana*), fornecendo base para futuras aplicações de outras biotécnicas reprodutivas. Tais conhecimentos poderão auxiliar a formação de bancos de germoplasma visando a preservação da espécie bem como sua reprodução em cativeiro e assim, aprimorar sistemas de produção sustentáveis desta espécie.

REFERÊNCIAS

- ABOUELEZZ, F. M.; CASTANO, C.; TOLEDANO-DIAZ, T.; ESTESO, M. C.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; *et al.* Sperm-egg penetration assay assessment of the contraceptive effects of glycerol and egg yolk in rooster sperm diluents. **Theriogenology**, 83: 1541-1547, 2015.
- AGUIAR, L. M. S.; MAURO, R. A. **Ema - Rhea americana. Fauna e Flora do Cerrado**, 2004. Disponível em: < <http://www.cnpqc.embrapa.br/series/ema/Ema.htm> >.
- ANDREETTA, A.; M.; STOCKERT, J. C.; BARRERA, C. A simple method to detect sperm chromatin abnormalities: cytochemical mechanism and possible value in predicting semen quality in assisted reproductive procedures. **Int J Androl**, 18: 23-28, 1995.
- ANEL, L.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; MARTINEZ-PASTOR, F.; MARTINEZ, F.; CHAMORRO, C.; PAZ, P. Evaluation of three diferente extenders for use in emergency salvaging of epididymal spermatozoa from a cantabric brown bear. **Reprod Dom Anim**, 46: 85-90, 2011.
- ANTON, M.; MARTINET, V.; DALGALARRONDO, M.; BEAUMAL, V.; DAVIDBRIAND, E.; RABESONA, H. Chemical and structural characterization of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. **Food Chemistry**, 83: 175-183, 2003.
- ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2000.
- ARRUDA, R. P.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; LIU, I. K. M. Determinação da integridade da membrana e acrossomo de espermatozoides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. **Acta Scientiae Veterianriae**, 31: 226-227, 2003.
- ARRUDA, R. P.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEME, K. M.; JAIME, J. D. Methods of the assessment of morphology and function of sperm: actual moment and future challenges. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 35: 145-151, 2011.
- AZEVEDO, C. S.; SILVA, M. C., TEIXEIRA, T. P.; YOUNG, R. J.; GARCIA, Q. S.; RODRIGUES, M. Effect of passage through the gut of Greater Rheas on the germination of seeds of plants of cerrado and caatinga grasslands. **Emu**, 113: 177-182, 2013.
- BAKST, M. R. A microscopist's view of poultry reproductive tracts and gamete. **Brit. Poultry Sci.**, 72: 940-43, 1993.
- BAKST, M. R.; HOWARTH, B. The head, neck and midpiece of cock spermatozoa examined with the transmission electron microscope. **Biol. Reprod.** 12, 632-640, 1975.

BAKST, M. R.; SEXTON, T. J. Fertilizing capacity and ultrastructure of fowl and turkey spermatozoa before and after freezing. **J Reprod Fert**, 55, 1-7, 1979.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press; 1989

BENEZ S.M. **Aves: criação, clínica, teoria e prática**. Robe, São Paulo, 1998.

BERGERON, A.; CRÊTE, M-H.; BRINDLE, Y.; MANJUNATH, P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biol Reprod**, 70: 708-717, 2004.

BEZERRA, J. A. B.; SILVA, A. M.; PEIXOTO, G. C. X.; SILVA, M. A.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Influence of Recovery Method and Centrifugation on Epididymal Sperm from Collared Peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). **Zoo Sci**, 31: 338-342, 2014.

BEZERRA, L. G. P.; LIMA, G. L.; COSTA, C. Y. M.; CASTELO, T. S.; SOUZA, A. L. P.; SILVA, A. R. Validation of fluorescent probes for viability evaluation of agouti (*Dasyprocta azarae*) epididymal sperm. *Anais do VII CONERA – Animais Silvestres Acta Veterinaria Brasilica*, 8, Supl. 2, 2014.

BHAT, G.; MAITI, B. R. Sex accessories morphology and during the seasonal testicular cycle of a subtropical wild avian species, the yellow-throated parrot *Petronia xanthocollis*, Burton. **Biol. Rhythm Res.**, 31:41-49, 2000.

BIRDLIFE INTERNATIONAL. *Rhea americana*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T22678073A92754472. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016.3.RLTS.T22678073A92754472.en>, 2016.

BLANCO, J. M.; GEE, G.; WILDT, D. E.; TSELUTIN, K.; DONOGHUE, A. M. Semen cryopreservation in poultry and non-domestic species: A comparative approach to understanding the fundamentals of avian spermatozoa cryobiology, **British Poultry Science**, 41: 6-7, 2000.

BLESBOIS, E.; BRILLARD, J. P. Specific features of in vivo and in vitro sperm storage in birds. **Animal**, 1:1472–1481, 2007.

BLESBOIS, E. Current status in avian semen cryopreservation. **World's Poultry Science Journal**, 63, 213-222, 2007.

BLESBOIS, E.; GRASSEAU, I.; SEIGNEURIN, F. Membrane fluidity and the ability to survive cryopreservation in domestic bird spermatozoa. **Reproduction**, 129: 371-378, 2005.

BLESBOIS, E.; SEIGNEURIN, F.; GRASSEAU, I.; LIMOUZIN, C.; BESNARD, J.; GOURICHON, D.; COQUERELLE, G.; RAULT, P.; TIXIER-BOICHARD, M. Semen cryopreservation for *ex-situ* management of genetic diversity in chickens; creation of the French Avian Cryobank. **Poultry Science** 8:550-565, 2007.

BONGALHARDO, D. C. Production and preservation of rooster semen. **Rev Bras Reprod Anim**, 37: 131-135, 2013.

BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. **Acta Sci Vet**, 33:17-32, 2005.

BRITTO, C. M. C.; MELLO, M. L. Induced nuclear metachromasy evaluated in spermatozoa of “pé duro” bulls. **Brazilian Journal of Genetics**, 11: 349-354, 1988.

BRUNING, D. E. Social structure and reproductive behavior in the greater rhea. **Living Bird**, 13: 251-294, 1974.

BURROWS, W. H.; QUINN, J.P. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. **Poultry Science**, 16: 19-24, 1937.

CARRER, C. C.; KORNFELD, M. E. **A criação de avestruzes no Brasil**. Pirassununga, SP, 304p. 1999.

CARVALHO, S. F. M. **Estudo de morfologia macroscópica, microscópica testicular e epididimária em emas (*Rhea americana*, Linnaeus – 1758) (RHEIDAE)**. Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor Ciência Animal junto a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, 2009.

CARVALHO, S. F. M.; FRENEAU, G. E.; SANTOS, A. L. Q. Methods for semen collecting in ostrich (*Struthio camelus*, Linnaeus, 1758) and emu (*Dromaius novaehollandiae*, Linnaeus, 1758), and some quantitative and qualitative characteristics. **Biosci J**, 22: 159-168, 2006.

CARY, J. A.; MADILL, S.; FARNSWORTH, K.; HAYNA, J. T.; DUOOS, L.; FAHNING, M. L. A. Comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallion. **Can Vet J**, 41: 45-35, 2004.

CAVALCANTE, A. K. S. **Parâmetros reprodutivos de perdizes machos (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro: comparação entre os índices reprodutivos de animais acasalados e inseminados**. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2006.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ALBUQUERQUE, R.; SILVA, F. H. A.; FARIA, D. E.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Utilization of Fluorescent Probe Association for Simultaneous Assessment of Plasmatic, Acrosomal, and Mitochondrial Membranes of Rooster Spermatozoa. **Brazilian Journal of Poultry Science**, 9:143-149, 2007.

CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; SOUZA, L. W. O.; ARRUDA, R. P. Use of CMXRos and JC-1 on mitochondrial function evaluation, associated to fluorescent probes to plasmatic and acrosomal membranes evaluation in bovine spermatozoa. **Acta Scientiae Veterinariae**, 33: 321, 2005.

CELEGHINI, E.C.C. et al. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 62: 536-543, 2010.

CERVI, R. C.; CAFÉ, M. B.; CAVALLIERI, A. L. F.; ANDRADE, M. A. Physical, chemical and microbiological features in ratitas eggs - A review. **Rev. Ciên. Vet. Saúde Públ**, 3: 107-116, 2016.

CHRISTENSEN V. Diluents, dilution and storage of poultry semen for six hours. First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry. Bakst M. R., Wishart G.J. Poult. Sci. Assoc., Savoy, Illinois: 90-104, 1995.

CIERESZKO, A.; DIETRICH, G. J.; LISZEWSKA, E.; KRZYWIŃSKI, A.; KOBUS, A. Short-term storage and cryopreservation of black grouse and capercaillie semen. **European Journal of Wildlife Research**, Springer Verlag, 57: 383-388, 2010.

CODENOTTI, T. L.; BENINCA, D.; ALVAREZ, F. Etograma y relacion de la conducta con el habitat y con la edad en el ñandú. **Doñana, Acta Vertebrata**, Sevilla, 22: 65-86, 1995.

CODENOTTI, T. L.; ALVAREZ, F. Cooperative breeding between males in the Greater Rhea *Rhea americana*. **IBIS**, 139: 568-571, 1997.

CODENOTTI, T. L.; ALVAREZ, F. **Mating behavior of the male greater rhea**. The Wilson Bulletin, 113: 85-89, 2001.

COMIZZOLI, P.; MERMILLOD, P.; COGNIE, Y.; CHAI, N.; LEGENDRE, X.; MAUGE, R. Successful in vitro production of embryos in the red deer (*Cervus elaphus*) and the sika deer (*Cervus nippon*). **Theriogenology** 55: 649-659, 2001.

COSTA, P. M.; MARTINS, C. F. Conservação de recursos genéticos animais através de técnicas de reprodução. **Univ Ci Saúde**, 6(1):39-55, 2008.

CRESPILHO, A. M.; PAPA, F. O.; MARTINS JUNIOR, A.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A. Evaluation of frozen bovine semen: How do semen collection and processing centers evaluate the quality of commercialized samples? **Vet Zootec**, v.16, p.335-342, 2009.

DANI, S. **A ema *Rhea americana***. Belo Horizonte, Fundação Acangaú, 136p, 1993.

DERIVAUX, J. Reprodução dos animais domesticos. **Zaragoza: Acribia**, 446p, 1980.

De REVIERS, M. Transport, survie et pourvoir fecondant des spermatozoides chez les vertébrés. **Ins. Natl. Santle. Rech. Med.**, 26: 35-60, 1974.

DONOGHUE, A. M.; WISHART, G. J. Storage of poultry semen. **Anim Reprod Sci**, 62: 213-232, 2000.

DONOGHUE, A. M. The effect of 24 h in vitro storage on sperm hydrolysis through the perivitelline membrane of ovipositioned turkey eggs. **Poult. Sci.** 75: 1035-1038, 1996.

DU PLESSIS, L.; SOLEY, J. T. Light microscopic features and morphometry of sperm in the meui (*Dromaius novaehollandiae*). **Theriogenology**, 81: 203-209, 2014.

EHLING, C.; TAYLOR, U.; BAULAIN, U.; WEIGEND, S.; HENNING, M.; RATH, D. Cryopreservation of semen from genetic resource chicken lines. **Agriculture and Forestry Research**, 3 (62): 151-158, 2012.

- EXBRAYAT, J-M. **Histochemical and cytochemical methods of visualization**. In: Exbrayat, J-M. (Ed.). Histochemical methods. Boca Raton: Taylor & Francis Group, p.62-136, 2013.
- FARLIN, M. E.; JASKO, D. J.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Assessment of *Psium sativum* agglutinin in identifying acrossomal damage in stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, 32: 23-27, 1992.
- FERNANDEZ, G. J.; REBOREDA, J. C. Male parental care in greater rheas (*Rhea americana*) in Argentina. **Auk: a journal of ornithology**, Lawrence, 120: 418-428, 2003.
- FERREIRA, J. C. P.; NEVES-NETO, J. R.; PAPA, F. O. Avaliação computadorizada das características espermáticas de garanhões com fertilidade comprovada. **Rev Bras Reprod Anim**, 21: 131-32, 1997.
- FOOTE, R. Fertilizing ability of epididymal sperm from dead animals. **J Androl** 21: 355, 2000.
- FREDIANI, M. H.; GUIDA, F. J. V.; SALGADO, P. A. B.; GONÇALVES, D. R.; BLANK, M. H.; NOVAES, G. A.; PEREIRA, R. J. G. Semen collection by electro-stimulation in a variety of bird orders. **Theriogenology**, 125:140-151, 2019.
- FREITAS, B. K. M.; CRUZ, F. G. G; RUFINO, J. P. F.; FEIJÓ, J. C; MELO, R. D.; MELO, L. D. Powdered coconut water as preservant of semi-heavy cocks semen. **Rev Bras Saúde Prod Anim**, 19; 216-222, 2018.
- FROMAN, D. P.; KIRBY T. D. **Reprodução em aves**, p.207-242. In: Hafez E.S.E. (Ed.), Reprodução Animal. 7ª ed. Manole, São Paulo, 2004.
- FRANZO, V. S.; VULCANI, V. A. S. Epidídimo e testículo de aves: Revisão literária. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 21, Ed. 126, Art. 852, 2010.
- GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; ESTESO, M. C.; PÉREZ-GUZMÁN, M. D.; SOLER, A. J. Heterologous in vitro fertilization is a good procedure to assess the fertility of thawed ram spermatozoa. **Theriogenology**, 71: 643-650, 2009.
- GIANNONI, M. L. **Emas e Avestruzes - uma alternativa para o produtor rural**. Jaboticabal: FUNEP, 49, 1996.
- GÓES, P. A. **Características reprodutivas de emas machos (*Rhea americana*) criadas em cativeiro no Estado de São Paulo**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2004.
- GÓES, P. A. A.; CAVALCANTE, A. K. S.; NICHI, M.; PEREZ, E. G. A.; BARNABE, R. C.; BARNABE, V. H. Reproductive Characteristics of Captive Greater Rhea (*Rhea americana*) Males Reared in the State of São Paulo, Brazil. **Braz J of Poultry Sci**, 2: 57-62, 2010.
- GÓIS, R. C. S. **Toxicidade reprodutiva da semente de neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) em codorna (*Coturnix coturnix japônica* Linnaeus, 1758) macho: características seminais, estudo histopatológico e histomorfométrico do parênquima**

testicular. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do SemiÁrido, 2018.

GOPINGER, E.; BORELLI, A. S. F.; XAVIER, E. G.; BONGALHARDO, D. C.; DIONELLO, N. J. L.; ZANUSSO, J. T.; ROLL, V. F. B. Effect of flaxseed oil in the diet of male quail (*Coturnix coturnix coturnix*) on semen characteristics and biometric evaluation of testicles. **RPCV**, 107: 177-181, 2012.

GRAHAM, J. K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R. H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, 43: 55-64, 1990.

GRUNDER, A. A.; PAWLUCZUK, F. A. Comparison of procedures for collecting semen from genders and insemination geese. **Poultry Science**, 70: 1975-1980, 1991.

GVARYAHU, G.; ROBINZON, B.; MELTZER, A.; PEREK, M.; SNAPIR, N. An improved method for obtained semen from Muscovy drakes and some its quantitative and qualitative characteristics. **Poultry Science**, 63: 548-553, 1984.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri, SP: Manole, p. 513, 2004.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, 88: 343-352, 1990.

HEROLD, F. C.; AURICH, J. E.; GERBER, D. Epididymal sperm from the African buffalo (*Sincerus caffer*) can be frozen successfully with AndroMed® and with Triladyl™ but the addition of seminal plasma is detrimental. **Theriogenology**, 61: 715–724, 2004.

HICKS-ALLDREDGE, K. D. **Ratite reproduction**. In: Tully TN, Shan SM. Ratites: management, medicine and surgery. Malabar: Krieger Publishing Company; 188p, 1996.

HOLDEN, C. A.; ROSS, V. H.; SATHANANTHAN, A. H.; TROUNSON, A. O. Assessment of the human sperm acrosome reaction using concavalian A lectin. **Molecular Reproduction and Development**, 25: 247-257, 1990.

HOSKEN, F. M.; SILVEIRA, A. C. **Criação de Emas**. Viçosa: Editora Aprenda Fácil, P362, 2003.

KOTŁOWSKA, M.; DIETRICH, G.; WOJTCZAK, M.; KAROL, H.; CIERESZKO, A. Effects of liquid storage on amidase activity, DNA fragmentation and motility of turkey spermatozoa. **Theriogenology**, 67: 276–286, 2007.

KOZDROWSKI, R.; NIZ'AN'SKI, W.; DUBIEL, A.; OLECH, W. Possibilities of using the European bison (*Bison bonasus*) epididymal spermatozoa collected post-mortem for cryopreservation and artificial insemination: a pilot study. **Reprod Biol Endocrinol**, 9: 31, 2011.

JAIN, K. J.; PAULSON, R. J. Oocyte cryopreservation. **Fertility and Sterility**, 86(3): 1037-1046, 2006.

JANUSKAUSKAS, A.; ZILINSKAS, H. Bull semen evaluation post-thaw and relation semen characteristics to bulls fertility. **Vet Zootech**, 39: 1-8, 2002.

JEYENDRAN, R.; VAN DER VEN, H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, M.; ZANEVELD, L. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relation to other semen characteristics. **J. Reprod. Fertil.** 70:219-228, 1984.

KEITH, S. L. **Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa**. Tese - Mestrado em Ciência: Colorado State University, Fort Collins. Colorado, p.104, 1998.

KROGENAES, A.; BERG, A. K.; HAFNE, A. L.; ENGELAND, E. Membrane alterations in Bull spermatozoa after freezing and thawing and after in vitro fertilization. **Acta Veterinária Scandinavica**, 35:17-26, 1994.

KURBATOV, A. D.; NARUBINA, L.; IVANOV, B.G.; BUBLIAEVA, G. B.; MOSKALENKO, L. I.; Effect of ETG on cock sperm at temperatures above and below 08C. Bull. **VNIRGJ** 43: 15-20, 1980.

LAKE, P. E. **Male genital organs**, p.2-61 In: King A.S. & McLelland J. (Eds), Form and Function in Birds. Vol.2. Academic Press, London, 1981.

LARSON, J. L.; MILLER, D. J. Simple Histochemical Stain for Acrosomes on Sperm From Several Species **Molecular Reproduction and Development**, 52:445-449, 1999.

LAVOR, C. T.; CÂMARA, S. R. Biotecnologia do sêmen e inseminação artificial em aves. **Ciência Animal**, 22: 66-81, 2012.

LEIDENS, D. **Efeitos da exposição ao chumbo no sistema reprodutivo de *Chrysomus ruficapillus* (AVES: Icteridae)**. Dissertação defendida no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada, 2013.

MACHADO, A.B.M.; G.A.B. FONSECA; R.B. MACHADO; L.M.S. AGUIAR & L.V. LINS. **Livro Vermelho das Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna de Minas Gerais**. Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas, 605p, 1998.

MALAVAZZI, G. – **Avicultura: manual de práticas**. São Paulo: Nobel, 156p, 1999.

MALECKI, I. A.; KADOKAWA, H. Viability of ostrich sperm following cryopreservation in straws using N-methyl-acetamide (MA). Unpublished, 2011.

MALECKI, I. A.; MARTIN, G. B.; LINDSAY, D. R. Semen production by the male emu (*Dromaius novaehollandiae*). 1. Methods for semen collection. **Poultry Science**, 76: 615-621, 1997.

MALECKI, I. A.; REED, C. E.; MARTIN, G. B. Hypo-osmotic swelling test for measuring integrity of the emu sperm membrane. **Avian and Poultry Biology Reviews**, 16: 189, 2005.

MATOS, D. L.; ARAÚJO, A. A.; ROBERTO, L. G.; TONIOLLI, R. Computer-assisted sperm analysis (CASA): a review. **Rev Bras Reprod Anim**, 32: 225-232, 2008.

MATSON, P.; KAPPELLE, W.; MALECKI, I. The use of a hypo-osmotic swelling (HOS) test on sperm of the pig (*Sus scrofa domestica*), emu (*Dromaius novaehollandiae*), Asian elephant (*Elephas maximus*), hamadryas baboon (*Papio hamadryas hamadryas*), and central rock rat (*Zyomys pedunculatus*). **Reproductive Biology**, 9: 181-187, 2009.

MEDEIROS, A. A.; ARAUJO, A. A.; MOURA, A. A. A.; CAVALCANTE, J. M. M.; FIGUEIREDO, E. L.; RODRIGUES, L. F. S. Utilizacao do azul de bromofenol conservado a 4°C e 29°C, como metodo de coloracao vital para avaliacao do espermatozoide ovino. **Rev. Cienc. Agrar.**, 46: 287-297, 2006.

MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, 57: 327-344, 2002.

MELLO, M. L. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochemistry**, 74: 387-92, 1982.

MONTEIRO, G. A.; PAPA, F. O.; ZAHN, F. S.; DELL'AQUA, J. A.; MELO, C. M.; MAZIERO, R. R.; et al. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. **Anim Reprod Sci**, 127: 197-201, 2011.

MOREIRA-NETO, J. J. S.; GONDIM, J. O.; RADDI, M. S. G.; PANSANI, C. A. Viability of human fibroblasts in coconut water as a storage medium. **International Endodontic Journal**, 42: 827-830, 2009.

MORIETTI, E.; SUTERA, G.; COLLODEL, G. The importance of transmission electron microscopy analysis of spermatozoa: Diagnostic applications and basic research. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, 62: 171-183, 2016.

MORRELL, J. M.; PERSSON, B.; TJELLSTROÖM, H.; LAESSKER, A.; NILSSON, H.; DANILOVA, M.; HOLMES P. V. Effect of Semen Extender and Density Gradient Centrifugation on the Motility and Fertility of Turkey Spermatozoa. **Reprod Dom Anim** 40, 522-525, 2005.

MOURA, S. G.; MENDONÇA, I. L.; MOURA, W. R. A.; VIEIRA, R. J.; CONDE JÚNIOR, A. M.; SOUZA, J. A. T.; SOUSA JÚNIOR, A. Evaluation of biting lice infestations (*Struthiolipeurus rhea*) in rheas (*Rhea americana*) kept in commercial breeding in the state of Piauí. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 77-82, jan./jun. 2012.

OLIVEIRA, R. V.; NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M.; CAVALCANTE, J. M. M.; MOURA, A. A. A.; ARAÚJO, A. A. Avaliação morfológica de espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) ou TRIS, corados por eosina-nigrosina e azul de bromofenol. **Ci. Anim. Bras.**, 10: 862-869, 2009.

OLSON, S. L. Lessons from a flightless Ibis. **Natural History**, 92: 40-41, 1983.

ONISHI, N.; KATO, Y.; FUTAMURA, L. Studies in artificial insemination of ducks. **Bulletin of Agricultural Science**, 11: 1-16, 1955.

PALENCIA, D. D.; GARNER, D. L.; HUDIG, D.; HOLCOMBE, D. N.; BURNER, C. A.; REDELMAN, D.; FERNANDEZ, G. C. J.; ABUELYAMAN, A. S.; KAM, C. M.;

POWERS, J. C. Determination of activable proacrosin/acrosin in bovine sperm using an irreversible isocoumarin serine protease inhibitor. **Biology of Reproduction**, 55: 536-542, 1996.

PARIZZI, R. C.; MIGLINO, M. A.; MAIA, M. O.; SOUZA, J. A.; SANTOS, J. M.; OLIVEIRA, M. F.; SANTOS, T. C. Morfologia do ovário da ema (*Rhea americana*). **Pesq Vet Bras**, 27: 89-94, 2007.

PARTYKA, A.; ŁUKASZEWICZ, E.; NIZAN'SKI, W. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. **Theriogenology**, 77: 1497-1504, 2012.

PEIXOTO, J. V. **Criopreservação de sêmen e avaliação histológica e funcional do testículo de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus* SHAW, 1805)**. Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, 2010.

PEREIRA, R. M.; MARQUES, C. C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell Tissue Bank**, 9: 267-277, 2008.

PÉREZ-GARNELO, S. S.; GARDE, J.; PINTADO, B.; BORQUE, C.; TALAVERA, C.; DELCLAUX, M.; et al. Characteristics and in vitro fertilizing ability of giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) frozen-thawed epididymal spermatozoa obtained 4 hours postmortem: A case report. **Zoo Biology** 23: 279-285, 2004.

PHILLIPS, D. M.; ASA, C. S. Development of Spermatozoa in the Rhea. **The Anatomical Record**, 223: 276-282, 1989.

POOT, M.; ZHANG, Y. Z.; KRÄMER, J. A.; WELLS, K. S.; JONES, L. J.; HANZEL, D. K.; LUGADE, A. G.; SINGER, V. L.; HAUGLAND, R. P. Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 44: 1363-72, 1996.

RAKHA, B. A.; ANSARI, M. S.; AKHTER, S.; SANTIAGO-MORENO, J.; BLESBOIS, E. Cryoprotectant effects of egg yolk on Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*) Sperm. **Theriogenology**, 119: 150-155, 2018.

RAUTENFELD, D. B. V. Mitteilungen zur kunstlichen besamung geschlechts und alterbestimmung beim straub (*Struthio camelus australis*). **Der praktische Tierarzt**, 5: 359-366, 1977.

RODRIGUES, A. C. N.; ROCHA, J. V.; BELETTI, M. E. Computational analysis of chromatin condensation of rooster spermatozoa. **Arq Bras Med Vet Zootec**, 61:1302-1307, 2009.

RONDON, R. M. M.; RONDON, F. C. M.; NUNES, J. F.; ALENCAR, A. A.; SOUSA, F. M.; CARVALHO, M. A. M. Powdered coconut water (ACP®) at diferente temperatures as extender of guinea fowl (*Numida meleagris*) spermatozoa. **Rev Bras Saúde Prod**, 9, n.4, p. 848-854, 2008.

ROSS, N. L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrossomal status of mammalian sperm. **Biology of Reproduction**, 41: 635-641, 1989.

RUFINO, J. P. F.; CRUZ, F. G. G.; OLIVEIRA FILHO, P. A.; FARIAS, T. M.; MELO, L. D. **Bioteecnologias Aplicadas à Reprodução de Aves**. Manaus: EDUA, 131 p., 2018
SANTIAGO-MORENO, J.; CASTAÑO, C.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; COLOMA, M. A.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.; PRIETO, M. T.; CAMPO, J. L. Cryoprotective and contraceptive properties of egg yolk as an additive in rooster sperm diluents. *Cryobiology* 65: 230-234, 2012.

SANTIAGO-MORENO, J.; ESTESO, M. C.; VILLAVERDE-MORCILLO, S.; TOLEDANO-DIAZ, A.; CASTAÑO, C.; VELÁZQUEZ, R.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; GOYA, A. L.; MARTÍNEZ, J. G. Recent advances in bird sperm morphometric analysis and its role in male gamete characterization and reproduction Technologies. **Asian Journal of Andrology**, 18: 882-888, 2016.

SANTOS, E. A. A.; SOUSA, P. C.; PEIXOTO, G. C. X.; SIMÃO, B. R. OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A.R. Establishing the hypoosmotic swelling test for sperm analysis in collared peccaries (*Pecari tajacu*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 65: 1257-1260, 2013.

SANTOS, T. C.; SOUSA, J. A.; OLIVEIRA, M. F.; SANTOS, J. M.; PARIZZI, R. C.; MIGLINO, M. A. Morfologia dos órgãos genitais masculinos e da cloaca da ema (*Rhea americana americana*). **Pesq Vet Bras**, 31(5):430-440, 2011.

SAYED, M. A. M.; ABOUELEZZ, F. M. K.; ABDEL-WAHAB, A. A. M. Analysis of sperm motility, velocity and morphometry of three egyptian indigenous chicken strains. **Egypt. Poult. Sci.**, 37: 1173-1185, 2017.

SCHÄFER, S.; HOLZMANN, A. The use of transmiration and SpermacTM stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, 59: 201-211, 2000.

SCHOMMER, M. K. **Rhea americana (common rhea, gray rhea and greater rhea)** University of Michigan: june, 1999. Disponível Internet via url: http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rhea_americana.html.

SETIOKO, A. R.; HETZEL, D. J. S. The effect of collecting method and housing system on semen production and fertility of Slabio drakes. **British Poultry Science**, 25: 167-172, 1984.

SHAHVERDI, A.; SHARAFI, M.; GOURABI, A.; YEKTA, A.; ESMAEILI, V.; SHARBATOGLHI, M.; JANZAMIN, E.; HAJNASROLLAHI, M.; MOSTAFAYI, F. Fertility and Flow Cytometric Evaluations of Frozen-thawed Rooster Semen in Cryopreservation Medium containing Low Density Lipoprotein. **Theriogenology**, 83: 78-85, 2015.

SICK, H. **Ornitologia brasileira: uma introdução**. Brasília: UNB, v. 1, 482p, 1985.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro, Editora Nova Fronteira, 862p, 1997.

SILVA, A. R., FONTENELE-NETO, J. D., CARDOSO, R. C. S., SILVA, L. D. M., CHINIRÉA, V. H., LOPES, M. D. Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. **Ciência Animal Brasileira**, 10: 595-601, 2009.

SILVA, E. C. B.; GUERRA, M. M. P. Fluorescent probes: an advance on the evaluation of structural and functional sperm integrity. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, 11: 162-169, 2012.

SILVA, J. B. **Rheacultura-Criação de emas: (manual prático) nutrição, reprodução, manejo e enfermidades**. Guaíba: Agropecuária, 144p, 2001.

SILVA, M. A.; PEIXOTO, G. C. X.; SANTOS, E. A. A.; CASTELO, T. S.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasyprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders. **Theriogenology** 76: 1084–1089, 2011.

SŁOWIN'SKA, M.; LISZEWSKA, E.; DIETRICH, G. J.; CIERESZKO, A. Characterization of proacrosin/acrosin system after liquid storage and cryopreservation of turkey semen (*Meleagris gallopavo*). **Theriogenology** 78: 1065–1077, 2012.

SMITH, A. M. J. **A protocol for liquid storage and cryopreservation of ostrich (*Struthio camelus*) semen**. Thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of doctorate of philosophy in science of agriculture (Animal Sciences), in the Faculty of AgriSciences at Stellenbosch University, 2016.

SMITH, A. M. J.; BONATO, M.; DZAMA, K.; MALECKI, I. A.; CLOETE, S. W. P. Classification of ostrich sperm characteristics. **Anim Reprod Sci**, 168:138-150, 2016.

SOARES, J. M.; BELETTI, M. E. Avaliação da integridade cromatínica de espermatozoides de galos (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758) de linhagem pesada em duas idades. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, 43: 543-553, 2006.

SOOD, S.; TAWANG, A.; MALECKI, I. A.; MARTIN, G. B. Artificial insemination technology for the emu-improving sperm survival. **Reproductive Biology**, 11: 43-49, 2011.

SOUSA, P. C. **ESTUDO DOS DANOS MORFOFUNCIONAIS CAUSADOS PELA CRIOPRESERVAÇÃO NO SÊMEN DE TATU-PEBA, *Euphractus sexcinctus* WAGLER, 1830**. Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, 2013.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWAL, D. K.; McCUE P. M.; BRUEMMER, J. E. **Cooled and frozen stallion semen**, Bulletin nº 9, Fort Collins, Colorado University. 1999.

STEWART, J. Ratites. In: RITCHIE, B. W; et al. *Avian Medicine: Principles and Application*. Florida: Wingers Publishing, 1994. Cap 48. p. 1284-1320.

TALEBI, A. R.; VAHIDI, S.; AFLATOONIAN, A.; GHASEMI, N.; GHASEMZADEH, J.; FIROOZABADI, R. D.; MOEIN, M. R. Cytochemical evaluation of sperm chromatin

and DNA integrity in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions. **Andrologia**, 44: 462-70, 2012.

TARTAGLIONE, C. M.; RITTA, M. N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, 62: 1245-1252, 2004.

THOMAS, C. A.; GARNER, D. L.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in Cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, 56: 991-998, 1997.

THIANGTUM, K.; SWANSON, W. F.; HOWARD, J.; TUNWATTANA, W.; TONGTHAINAN, D.; WICHASILPA, W.; PATUMRATTANATHAN, P.; PINYOPOOMMINTR, T. Assessment of basic seminal characteristics, sperm cryopreservation and heterologous in vitro fertilisation in the fishing cat (*Prionailurus viverrinus*). **Reprod Fertil Dev**, 18:373-382, 2006.

VAJTA, G.; NAGY, Z. P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reprod Biomed Online**, 12: 779-796, 2006.

VAN DER LAAN, G. M. **Criopreservação de sêmen de galos**. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, 2007

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, 57: 149-179, 2002.

VIEGAS, K.A.S. **Contribuição ao estudo morfológico do ducto deferente de codorna doméstica (*Coturnix coturnix*) da variedade italiana: estrutura, histofisiologia e possíveis variações sazonais ao longo do ano**. Dissertação de Mestrado em Anatomia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo. 95p, 2004.

VILLAYERDE-MORCILLO, S.; ESTESO, M. C.; CASTAÑO, C.; TOLEDANO DÍAZ, A.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.; CAMPO, J. L.; SANTIAGO-MORENO, J. Influence of Staining Method on the Values of Avian Sperm Head Morphometric Variables. **Reprod Dom Anim**, 50, 750-755, 2015.

WESTENDORF, M.; ALTIZIO, B. **Ostrich, Emú and Rhea production**. Rutgers Cooperative Extension, 2004. Disponível em: <http://www.rce.rutgers.edu/pubs/pdfs/fs886>

WESTENDORF, M.; ALTIZIO, B. **Ostrich, emu, and Rhea production**. Rutgers Cooperative Extension. N. J. Agricultural Experiment Station. Rutgers, The State University of New Jersey. New Brunswick. 1995.

WISHART, G. J. New approaches to evaluating male and female fertility. In 'Proceedings of the First International Symposium on the Artificial Insemination of poultry'. (Eds MR Bakst, GJ Wishart) pp. 207-223, 1995.

ZAMBELLI, D.; BERGONZONI, M. L.; DE FANTI, C.; CARLUCCIO, A. Tecniche per la valutazione morfologica degli spermatozoi di gatto, coniglio e cane. **Atti del Convegno Nazionale SISVET XLVII Riccione**, 29: 279-283, 1993.

Cronograma de Execução

	2020												2021												2022												
Meses	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	
Levantamento Bibliográfico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Escrita do Artigo de Revisão	X	X	X	X																																	
Seleção dos animais e compra dos reagentes				X													X											X									
Coletas das amostras e Processamento					X	X	X	X	X	X									X	X	X	X	X						X	X	X						
Análise dos resultados											X	X											X	X								X	X				
Escrita dos Artigo													X	X	X	X								X	X	X				X	X	X					
Elaboração da Dissertação																																	X	X			
Defesa da dissertação																																				X	

