

Viabilidade do sêmen de tatus-peba (*Euphractus sexcinctus*) centrifugado e diluído em Tris ou água de coco em pó

Viability of the six-banded armadillos (*Euphractus sexcinctus*) semen centrifuged and extended in Tris or powdered coconut water

Patrícia da Cunha Sousa¹ Erika Aparecida Araújo dos Santos¹ Andréia Maria Silva¹
Thibério de Souza Castelo¹ Gislayne Cristhiane Xavier Peixoto¹ Carlos Iberê Alves Freitas^{II}
Alexandre Rodrigues Silva*

RESUMO

Foram avaliados os efeitos da centrifugação associada ao uso de dois diluentes na manutenção da viabilidade espermática em tatus-peba (*Euphractus sexcinctus*) ao longo do teste de termoresistência (TTR). Amostras de sêmen (n=12), oriundas de 04 machos adultos coletados por eletroejaculação, foram divididas em quatro alíquotas, sendo duas imediatamente diluídas em Tris ou água de coco em pó (ACP-119[®]), e as outras duas centrifugadas (800g10min⁻¹) previamente à diluição. As amostras foram incubadas a 34°C por 3h, e os parâmetros seminais avaliados em intervalos de 1h. Em termos gerais, verificou-se uma redução da viscosidade espermática imediata à diluição em ambos os diluentes, independente do uso da centrifugação. Aos 60 minutos, verificou-se uma redução dos parâmetros avaliados (P<0,05), embora o Tris tenha promovido uma melhor preservação deles (P<0,05), quando comparado ao ACP-119[®] até os 120 minutos de avaliação. Após este período, os dois diluentes se equipararam (P>0,05). Ainda, verificou-se um efeito deletério da centrifugação sobre a qualidade do sêmen de tatus-peba durante todo o teste de termoresistência. Nas condições do presente estudo, conclui-se que o diluente Tris mostrou-se superior ao ACP-119[®] para a manutenção da viabilidade do sêmen de tatus-peba, sendo desnecessária a realização de centrifugação prévia à diluição.

Palavras-chave: tatu-peba, termoresistência, sêmen, centrifugação, diluentes.

ABSTRACT

The effects of the centrifugation associated to the use of two extenders on the viability of six-banded armadillo's (*Euphractus sexcinctus*) sperm were evaluated during a thermo resistance test (TRT). Semen samples (n=12) derived from 04 stud males collected by electroejaculation were divided in four aliquots; two of that were immediately diluted in Tris or powdered coconut water (ACP-119[®]); the two others were centrifuged (800g10min⁻¹) prior to the dilution. Samples were incubated at 34°C per 3h, and

the semen parameters were evaluated at each hour. In general, dilution promoted a reduction in semen viscosity in the use of both diluents using centrifugation or not. At 60min, a decrease was verified for all semen parameters (P<0.05), however they were better preserved in the use of Tris when compared to ACP-119[®] (P<0.05) up to 120min. After that, both diluents equated. In addition, centrifugation procedure presented a deleterious effect on the armadillo's semen quality during all the thermoresistance test. In the present conditions, conclude that Tris extender is more efficient than ACP-119[®] for the preservation of six-banded armadillo semen viability, and the previous centrifugation is unnecessary.

Key words: six-banded armadillo, thermoresistance, semen, centrifugation, extenders.

INTRODUÇÃO

Os *Euphractus sexcinctus*, conhecidos popularmente como tatus-peba ou tatus-amarelos, encontram-se distribuídos em praticamente todos os biomas brasileiros (ANACLETO et al., 2006). Haja vista não serem considerados sob ameaça de extinção, têm sido sugeridos como modelos experimentais para espécies filogeneticamente próximas e em risco de extinção, como os tatus-bola (*Tolypeutes* sp. - IUCN, 2013). Apesar da importância ecológica, estudos relacionados à reprodução dos tatus, bem como de todos os integrantes da ordem Xenartra, são escassos (HEATH et al., 1987; SERAFIM et al., 2010; SANTOS et al., 2011). Este fato tem limitado o desenvolvimento de tecnologias que possam

¹Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal (LCGA), Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), 59625-900, Mossoró, RN, Brasil. E-mail: alexrs@ufersa.edu.br. *Autor para correspondência.

^{II}Departamento de Ciências Animais, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil.

maximizar sua reprodução, como, por exemplo, a preservação de seus gametas seguida de inseminação artificial. Em adição, denota-se a necessidade de elaboração de diluentes adequados às características peculiares do sêmen de tatus-peba, tal como a elevada viscosidade do plasma seminal (SERAFIM et al., 2010; SANTOS et al., 2011; SOUSA et al., 2013).

Fatores relacionados com a elevada viscosidade são considerados limitantes durante o processamento do sêmen em outras espécies (MOSAFERI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2011). A fim de reverter essa problemática, foi descrita a liquefação do sêmen e manutenção da viabilidade espermática em camelos (*Camelus bactrianus*), empregando-se a diluição em solução a base de Tris (MOSAFERI et al., 2005), o qual já foi inclusive utilizado no próprio tatu-peba (SANTOS et al., 2011). Na busca de alternativas de menor custo, têm sido desenvolvidas soluções a base de água de coco (ACP®), que têm demonstrado eficiência tanto na liquefação seminal como na manutenção da viabilidade espermática em espécies silvestres, como os macacos-prego (*Cebus apela*) (OLIVEIRA et al., 2011).

Adicionalmente, a centrifugação tem sido proposta como uma alternativa para remoção do plasma seminal e redução na contaminação por urina na amostra em várias espécies (ALVAREZ-RODRIGUEZ et al., 2013). Embora possibilite a adequação de taxas fidedignas de diluição, já foi demonstrado um efeito mecânico deletério dela sobre os espermatozoides de alguns mamíferos (CASTELO et al., 2010). Nos tatus, entretanto, o efeito da centrifugação sobre as amostra de sêmen permanece desconhecido.

Este trabalho objetivou avaliar o efeito da centrifugação associada ao uso dos diluentes a base de Tris ou água de coco em pó (ACP-119®) sobre a manutenção da viabilidade do sêmen de tatus-peba (*Euphractus sexcinctus*), ao longo do teste de termorresistência.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado com animais provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres – CEMAS da UFERSA (Registro IBAMA nº 1478912), situado em Mossoró, RN, localizada na região semiárida brasileira (5°10'S-37°10'W; temperatura: 27-29°C). Foram utilizados quatro tatus-peba machos adultos, com idade aproximada de dois anos, pesando 3,25±0,2kg. Eles foram confinados em tanques individuais, mantidos sob fotoperíodo natural (~12h), alimentados uma vez por dia com

ração para manutenção de cães (Pedigree®, MARS, Campinas, Brasil), acrescida de vegetais e água *ad libitum*. Exceto quando indicado, todas as substâncias utilizadas no experimento foram provenientes da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.

Cada um dos quatro animais foi submetido a três procedimentos distintos de eletroejaculação em intervalos de 15 a 21 dias, perfazendo um total de 12 ejaculados. Para tanto, estes foram contidos com luvas apropriadas e medicados com xilazina (1mg kg⁻¹ Sedomin®, König S.A., Buenos Aires, Argentina) e cetamina (7mg kg⁻¹ Quetamina Injetável, Vetnil®, São Paulo, Brasil) por via intramuscular (músculo vasto lateral da coxa), seguindo-se a manutenção do estado anestésico por meio de aplicação intravenosa de propofol (5mg kg⁻¹ Propovan®, Cristalia, Fortaleza, Brasil) em bolus (AMORIM et al., 2012). Os animais foram posicionados em decúbito dorsal, realizando-se a higienização das regiões peniana e perianal com solução fisiológica. Utilizou-se um eletroejaculador (Eletrojet®, Eletrovét, São Paulo, SP, Brasil), conectado a uma fonte de 12V, promovendo-se três ciclos sucessivos de estimulação, com 5min de intervalo entre ciclos. O primeiro ciclo consistiu em 10 estímulos de 2, 3, e 4mA, o segundo foi de 10 estímulos de 3, 4 e 5mA, e o terceiro foi de 10 estímulos de 5 e 6mA (SERAFIM et al., 2010). A sonda do eletroejaculador mede 12,5cm (comprimento) e 1,0cm (de diâmetro), apresentando dois eletrodos longitudinais. Cerca de 8cm da sonda foi inserida no reto do animal.

O sêmen foi colhido em tubos plásticos cônicos graduados e avaliado quanto ao aspecto e coloração. O pH foi mensurado utilizando-se fitas apropriadas (Neutralit® Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). A viscosidade das amostras foi avaliada de forma subjetiva. O volume foi aferido com o uso de micropipetas (5 a 100µL). A motilidade (percentual de espermatozoides móveis) e o vigor (qualidade do batimento flagelar numa escala de 0-5) foram avaliados em microscópio de campo claro (Eclipse E200, Nikon, Melville, NY, USA) sob aumento de 100× e 400×. No experimento, foram utilizadas apenas amostras que apresentavam motilidade espermática inicial superior a 70% com vigor superior a 1.

Foram confeccionados esfregaços de sêmen corados com azul de bromofenol (1:1) para avaliação da morfologia espermática e da integridade estrutural da membrana plasmática (DERIVAUX, 1980). Nos esfregaços, foram observadas 200 células/lâmina sob microscopia de campo claro (1000×). O teste hiposmótico foi realizado para avaliar a funcionalidade da membrana celular, utilizando-

se uma alíquota de 5µL de sêmen em 45µL de solução a 50mOsm L⁻¹ (SANTOS et al., 2011). Para determinar a concentração espermática, uma alíquota de 10µL de sêmen foi diluída em solução formolizada (10%) tamponada (1mL) e observada em câmara de Neubauer.

Cada amostra foi dividida em quatro alíquotas, sendo duas imediatamente diluídas em Tris [3.028g Tris-hidroximetil-aminometano, 1.78g ácido cítrico mono-hidratado, e 1.25g D-frutose, dissolvidos em 100mL de água ultrapura; 300mOsm L⁻¹ e pH 6,8] ou água de coco em pó (ACP-119®; 310mOsm L⁻¹ e pH 6,9), preparada de acordo com as recomendações do fabricante (ACP Biotecnologia – ACPBIOTEC, Fortaleza, CE). As outras duas alíquotas foram centrifugadas a 800g10min⁻¹ (WESTENDORF et al., 1975) para a retirada do plasma seminal, e depois diluídas nas mesmas substâncias. O volume de diluente foi calculado a fim de que fosse atingida a concentração final de 15x10⁶ espermatozoides mL⁻¹. Todas as amostras foram incubadas em banho-maria a 34°C, temperatura corpórea do tatu-peba, para realização de um teste de termorresistência (TTR) (SANTOS et al., 2011). Neste teste, procederam-se as análises seminais a cada 60min ao longo de 3h.

Os resultados foram expressos em média e erro padrão (média ± EP) e analisados pelo programa StatView® 5.0 para Windows (Cary, NY, USA). Com exceção dos dados de vigor, os demais resultados foram checados quanto à homocedasticidade, pelo teste de Levene, e submetidos à transformação em Arco Seno. O efeito dos tratamentos sobre os diferentes parâmetros seminais foi comparado pelo teste de Fisher PLSD. As comparações ao longo do tempo foram realizadas pela ANOVA para medidas repetidas (P<0.05). A ação dos mesmos efeitos sobre o vigor foi verificada pelo teste de Mann-Whitney (P<0,05).

RESULTADOS

O sêmen fresco dos tatus-peba apresentou coloração branca e aspecto leitoso-aquoso, pH alcalino próximo 9 e elevada viscosidade. Os ejaculados apresentaram volume de 0,7±0,5mL com concentração de 225,8±161,9×10⁶ espermatozoides mL⁻¹. Foram observados 82,5±2,6% de espermatozoides com morfologia normal. Destes, 77,1±4,4% apresentavam motilidade com vigor 2,1±0,3, bem como 71,2±2,6% de membranas estruturalmente íntegras ao esfregaço corado com azul de bromofenol, sendo que 62,6±4,6% apresentaram integridade funcional ao teste hiposmótico.

O procedimento de diluição, independente do uso da centrifugação, promoveu de imediato uma redução na viscosidade seminal. Entretanto, o fenômeno de *rouleaux* espermático, apresentando-se na forma de dois ou mais espermatozoides agregados cabeça-cabeça, foi verificado no sêmen fresco e persistiu, mesmo após a diluição em ambos os diluentes testados, e no decorrer de todo o experimento.

Ao TTR, observou-se declínio (P<0,05) da motilidade e do vigor espermático (Figura 1AB) já aos 60 minutos após a diluição em ambos tratamentos, sendo mais pronunciado no uso do ACP-119® (P<0,05). Este declínio se acentuou ao longo dos 180 minutos, juntamente com um declínio nos valores referentes à integridade estrutural (Figura 2A) e funcional da membrana (Figura 2B). Aos 180 minutos, nas amostras não centrifugadas, foram verificados valores em torno de 20% de espermatozoides com membranas íntegras do ponto de vista estrutural e funcional, embora estivessem imóveis.

De modo geral, evidenciou-se efeito negativo da centrifugação (P<0,05) sobre os parâmetros seminais, ao longo do TTR, no uso de ambos os diluentes (Figuras 1 e 2). A morfologia espermática foi também avaliada no experimento, porém, não foram observados danos significativos sobre este parâmetro e, aos 180 minutos, valores próximos a 80% de espermatozoides com morfologia normal foram observados em todos os tratamentos.

DISCUSSÃO

Nos tatus-peba, a aplicação de técnicas para a preservação de sêmen encontra desafios relacionados a características inerentes à espécie, como a configuração de aglutinados espermáticos na forma de *rouleaux* e a alta viscosidade do plasma seminal. Estas, associadamente, contribuem para a redução fisiológica do movimento espermático progressivo (SANTOS et al., 2011), como relatado para o tatu *Cabassous unicinctus* (HEATH et al., 1987). Não se sabe ao certo a razão desta elevada viscosidade observada nas amostras de sêmen. Em camelos, há relatos de que seja relacionada à grande presença de glicosaminoglicanos no plasma seminal (MOSAFERI et al., 2005), proveniente de secreções da próstata ou glândulas vesiculares (CARDOSO et al., 1985). Esta característica, além de prejudicar a avaliação da qualidade do sêmen, não permite que ele se misture adequadamente aos diluentes (WANI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011).

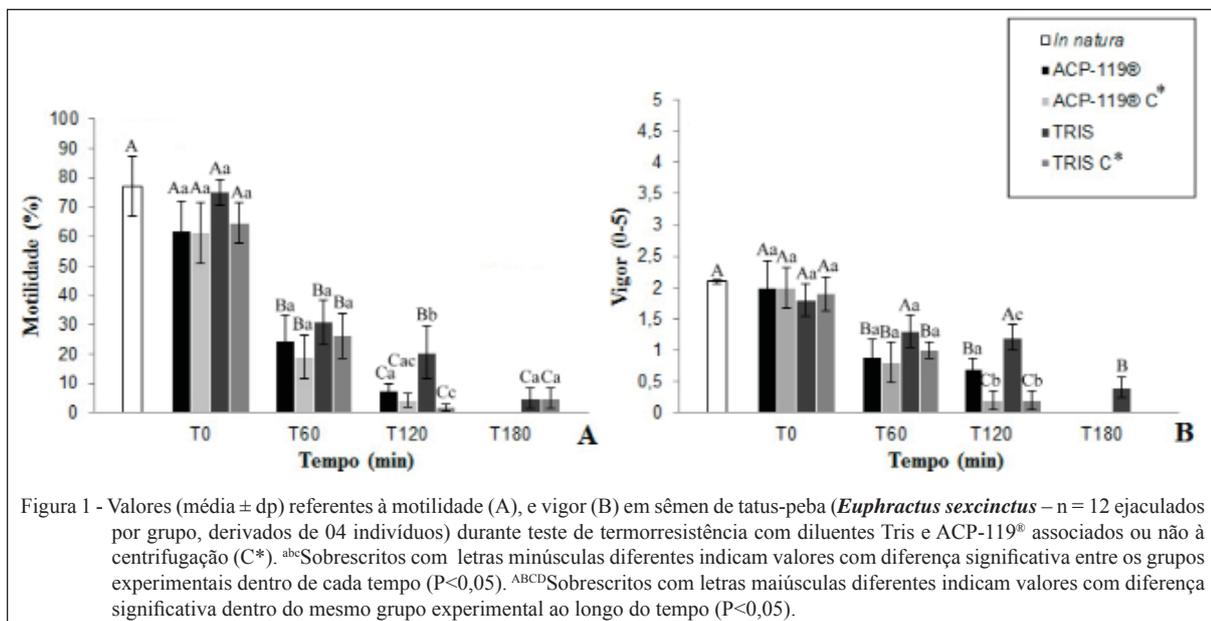


Figura 1 - Valores (média \pm dp) referentes à motilidade (A), e vigor (B) em sêmen de tatus-peba (*Euphractus sexcinctus* – n = 12 ejaculados por grupo, derivados de 04 indivíduos) durante teste de termorresistência com diluentes Tris e ACP-119[®] associados ou não à centrifugação (C*). ^{abc}Sobrescritos com letras minúsculas diferentes indicam valores com diferença significativa entre os grupos experimentais dentro de cada tempo (P<0,05). ^{ABC}Sobrescritos com letras maiúsculas diferentes indicam valores com diferença significativa dentro do mesmo grupo experimental ao longo do tempo (P<0,05).

No presente estudo, ambos os diluentes foram eficientes em promover uma imediata redução de viscosidade no plasma seminal de tatus-peba. De fato, tanto o diluente a base de Tris quanto aquele a base de ACP-119[®] já haviam sido reportados por liquefazer o coágulo seminal em camelídeos (WANI et al., 2008) e primatas (OLIVEIRA et al., 2011), respectivamente. No entanto, apesar da redução da viscosidade, a diluição não foi suficiente para impulsionar progressão aos espermatozoides, devido à persistência dos *roleaux* entre os espermatozoides de tatus-peba. Essas formações foram descritas em outra espécie de tatu (*Cabassous unicinctus*), através de imagens por ultramicroscopia, mostrando dois ou mais espermatozoides empilhados, sendo atribuídas ao formato côncavo da cabeça dos espermatozoides, o que facilita o encaixe e a permanência da junção entre essas células (HEATH et al., 1987). Este fenômeno é também descrito em marsupiais (*Didelphis virginiana*), nos quais se acredita que este evento coesivo favoreça a proteção dos espermatozoides durante sua passagem pelo epidídimo, sendo que sua separação deva ocorrer apenas no trato genital feminino (RODGER & BEDFORD, 1982). Diante deste conceito fisiológico, é possível que os estudos voltados para a tecnologia de sêmen em tatus devam ser focados no desenvolvimento de métodos que permitam a preservação das células mesmo estando elas agregadas, possibilitando a manutenção de sua viabilidade e posterior separação, quando inseridas no trato genital feminino durante a inseminação artificial.

No teste de termorresistência com ambos os diluentes, verificou-se um rápido declínio da motilidade espermática, conforme previamente descrito por SANTOS et al., (2011). Porém, de modo geral, o diluente Tris permitiu uma melhor conservação que o ACP[®] nas avaliações realizadas aos 60 e 120 minutos. Sabe-se que a presença de citocininas, como a cinetina, na água de coco, tende, inicialmente, a aumentar o metabolismo das células (LEE et al., 2006), induzindo a depleção de ATP (CABELLO et al., 2009), quando em temperaturas elevadas, proporcionando uma mais rápida redução na motilidade espermática. Fato este que não ocorre quando o referido diluente é utilizado na preservação de células espermáticas a baixas temperaturas, conforme inclusive já demonstrado em tatus-peba (AMORIM et al., 2012).

Ao longo do TTR, não foram evidenciados danos significativos à morfologia espermática em decorrência da centrifugação. Sabe-se que a ocorrência de danos mecânicos estaria relacionada à sensibilidade característica de cada espécie, de modo que os espermatozoides de tatus-peba parecem, em parte, ser resistentes a este procedimento, conforme descrito para equinos (CROCKETTA et al., 2001) e bovinos (PICKETT et al., 1975). Entretanto, não se pode descartar a ocorrência de danos subletais ao nível manométrico, haja vista ter sido verificado um efeito deletério da centrifugação sobre a motilidade, vigor e integridade de membrana nos tatus-peba, em ambos os diluentes testados. Nos caprinos, resultados similares têm sido atribuídos a danos ultraestruturais,

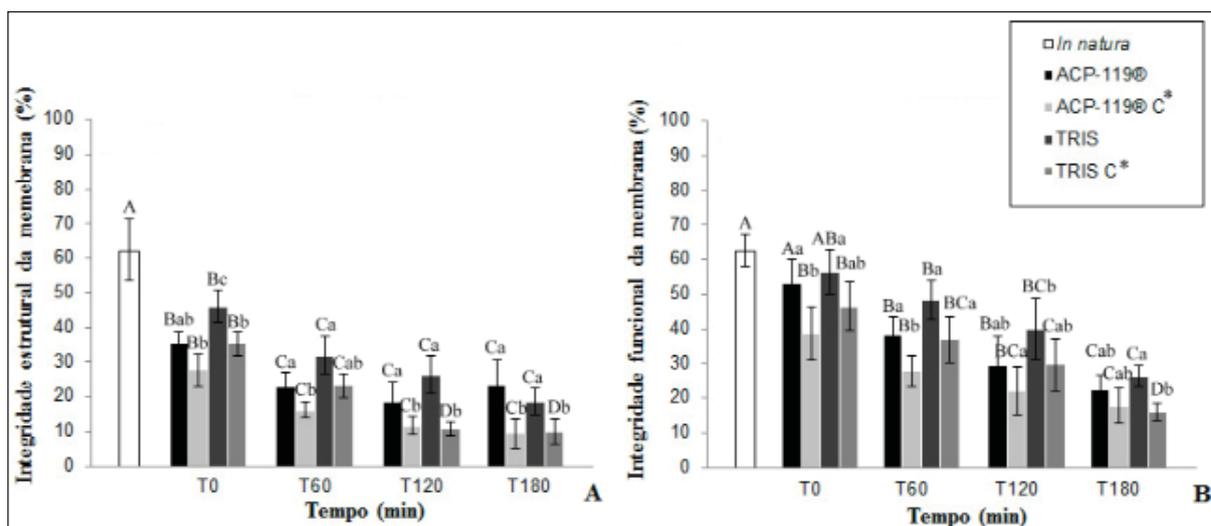


Figura 2 - Valores (média \pm dp) referentes à integridade estrutural de membrana determinada com azul de bromofenol (A) e integridade funcional de membrana determinada pelo teste hiposmótico (B) em sêmen de tatus-peba (*Euphractus sexcinctus* – n=12 ejaculados por grupo, derivados de 04 indivíduos) durante teste de termorresistência com diluentes Tris e ACP-119® associados ou não à centrifugação (C*). ^{abc}Sobrescritos com letras minúsculas diferentes indicam valores com diferença significativa entre os grupos experimentais dentro de cada tempo (P<0,05). ^{ABCD}Sobrescritos com letras maiúsculas diferentes indicam valores com diferença significativa dentro do mesmo grupo experimental ao longo do tempo (P<0,05).

apenas visualizados sob microscopia eletrônica, causados pela centrifugação, e podendo ocasionar redução da viabilidade e, conseqüentemente, perda da fertilidade (VIANA et al., 2006).

O uso de corantes supravitais, como o azul de bromofenol, detecta a integridade física da membrana plasmática, enquanto o teste hiposmótico avalia se ela está bioquimicamente ativa (ARRUDA et al., 2011). Assim, através do teste hiposmótico, verificou-se que o Tris promoveu uma melhor conservação do percentual de espermatozoides com membrana bioquimicamente ativa no sêmen de tatus-peba. Apesar do ACP® ser rico em proteínas, sais, açúcares, entre outras substâncias (BARROS & TONIOLLI, 2011), é possível que o Tris possua uma concentração de eletrólitos mais adequada para manter por um período maior a pressão osmótica fisiológica do sêmen de tatus-peba. Necessário também salientar que os gametas de diferentes espécies respondem de modo diferenciado aos meios aos quais são expostos (PURDY, 2006). Muitas vezes, a razão desta variação é inerente à composição bioquímica de sua membrana plasmática ou a componentes intracelulares que permanecem por serem melhor estudados (HOLT, 2000).

De modo geral, na comparação dos diluentes, observou-se uma melhor eficiência do Tris quanto à preservação dos parâmetros seminais ao longo do TTR, principalmente até os 120min de avaliação. Após este período, os dois diluentes

se equipararam. Diante disso, conclui-se que o diluente Tris mostrou-se superior ao ACP-119® para a manutenção da viabilidade do sêmen de tatus-peba. Em adição, não se recomenda a centrifugação das amostras previamente à diluição, haja vista o efeito negativo que esta exerce sobre a viabilidade seminal.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Os procedimentos foram realizados de acordo com as normas internacionais de bem estar animal e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFERSA, recebendo parecer nº 21/2011, referente ao processo 23091.002754/2011-99.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão de bolsa de mestrado para P. C. Souza e produtividade em pesquisa para A. R. Silva.

REFERÊNCIAS

ALVAREZ-RODRÍGUEZ, M. et al. The addition of heat shock protein HSPA8 to cryoprotective media improves the survival of brown bear (*Ursus arctus*) spermatozoa during chilling and after cryopreservation. *Theriogenology*, v.79, p.541-50, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.11.006>. Acesso em: 24 out. 2013.

AMORIM, R.N.L. et al. Short-term preservation at 5°C of Armadillo's (*Euphractus sexcinctus*) semen. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ANIMAL BIOLOGY OF REPRODUCTION,

- ISABR, 3., 2012, Campinas, SP. **Anais...** Campinas: IV International Symposium on Animal Biology of Reproduction, 2012. V.9, p.971. Disponível em: <<http://www.cbra.org.br/portal/eventos/isabr2012/IV%20ISABR%20Poster%20session%20list%202012-10-05.pdf>>. Acesso em: 24 out. 2013.
- ANACLETO, T.C.S. et al. Estimating potential geographic ranges of armadillos (*Xenarthra, Dasypodidae*) in Brazil under niche-based models. **Mammalia**, v.70, p.202-213, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1515/MAMM.2006.039>>. Acesso em: 24 out. 2013.
- ARRUDA, R.P. et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.145-151, 2011. Disponível em: <<http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v35n2/RB385%20Arruda%20145-151.pdf>>. Acesso em: 24 out. 2013.
- BARROS, T.B.; TONIOLLI, R. Uso potencial da água de coco na tecnologia de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.400-407, 2011. Disponível em: <<http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v35n4/pag%20400-407.pdf>>. Acesso em: 24 out. 2013.
- CABELLO, C.M. et al. The experimental chemotherapeutic N6-furfuryladenine (kinetin-riboside) induces rapid ATP depletion, genotoxic stress, and CDKN1A (p21) up regulation in human cancer cell lines. **Biochemical Pharmacology**, v.77, p.1125-1138, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2008.12.002>>. Acesso em: 23 out. 2013.
- CARDOSO, F.M. et al. Variação sazonal da atividade secretória das glândulas genitais acessórias masculinas de tatus *Dasypus Novemcinctus* Linnaeus, 1758. **Revista Brasileira de Biologia**, v.45, p.507-514, 1985.
- CASTELO, T.S. et al. Effect of centrifugation and sugar supplementation on the sêmen cryopreservation of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*). **Cryobiology**, v.61, p.275-279, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.09.005>>. Acesso em: 24 out. 2013.
- CROCKETTA, E.C. et al. Effect of cooling equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: preliminary results. **Theriogenology**, v.57, p.793-803, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00444-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00444-7)>. Acesso em: 24 out. 2013.
- DERIVAUX, J. **Reprodução dos animais domésticos**. Zaragoza: Acriba, 1980. 446p.
- HEATH, E. et al. Rouleaux formation by spermatozoa in the naked-tail armadillo, *Cabassou unicinctus*. **Journal Reproduction Fertility**, v.79, p.153-158, 1987. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.0790153>>. Acesso em: 23 out. 2013.
- HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v.53, p.47-58, 2000. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00239-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00239-3)>. Acesso em: 23 out., 2013.
- IUCN. **Lista vermelha de espécies ameaçadas da International Union for Conservation of Nature**. 2013. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/search/details.php/8306/all>>. Acesso em: 05 jan. 2013.
- LEE, H.S. et al. Physiological enhancement of early growth of rice seedlings (*Oryza sativa* L.) by production of phytohormone of N2-fixing methyloleophilic isolates. **Biology and Fertility of Soils**, v.42, p. 402-408, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00374-006-0083-8>>. Acesso em: 24 out. 2013.
- MOSAFERI, S. et al. Biophysical and biochemical characteristics of Bactrian camel semen collected by artificial vagina. **Theriogenology**, v.63, p.92-101, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.03.021>>. Acesso em: 24 out. 2013.
- OLIVEIRA, K.G. et al. Semen coagulum liquefaction, sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (*Cebus apella*) semen in coconut water solution (CWS) and TES-TRIS. **Animal Reproduction Science**, v.123, p.75-80, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.11.002>>. Acesso em: 24 out. 2013.
- PICKETT, B.W. et al. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. **Fertil Sterility**, v.26, p.167-174, 1975.
- PURDY, P. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.63, p.215-225, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.02.015>>. Acesso em: 24 out. 2013.
- RODGER, J.C.; BEDFORD, J.M. Separation of sperm pairs and sperm-egg interaction in the opossum *Didelphis virginiana*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.64, p.171-179, 1982. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.0640171>>. Acesso em: 24 out. 2013.
- SANTOS, E.A.A. et al. Assessment of sperm survival and functional membrane integrity of the six-banded armadillo (*Euphractus sexcinctus*). **Theriogenology**, v.76, p.623-629, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.03.015>>. Acesso em: 23 out. 2013.
- SERAFIM, M.K.B. et al. Description of semen characteristics from six-banded armadillos (*Euphractus sexcinctus*) collected by electroejaculation. **Animal Reproduction Science**, v.118, p.362-365, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.08.012>>. Acesso em: 23 out. 2013.
- SOUSA, P.C. et al. Morphology, morphometry and ultrastructure of captive six-banded armadillo (*Euphractus sexcinctus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, v.140, p.279-285, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.05.015>>. Acesso em: 15 out. 2013.
- VIANA, A.K.S. et al. Avaliação *in vitro* do sêmen caprino resfriado, com ou sem centrifugação do plasma seminal e diluído em desnatado-glicose e tris-gema de ovo. **Ciência Animal Brasileira**, v.7, p.67-76, 2006. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/386>>. Acesso em: 23 out., 2013.
- WANI, N.A. et al. Studies on liquefaction and storage of ejaculated dromedary camel (*Camelus dromedarius*) semen. **Animal Reproduction Science**, v.109, p.309-318, 2008.
- WESTENDORF, P. et al. Tiefgefrierung von Ebersperma. Labor- und Besamungsergebnisse mit dem Hülseberger Paillettenverfahren. **DtschTierärztl Wschr**, v.82, p.261-267, 1975.