

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DE DUAS CURVAS DE CONGELAÇÃO E DOIS SISTEMAS DE
REFRIGERAÇÃO PARA A PRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO
COMBINADOS COM TRÊS DILUENTES COMERCIAIS E SUAS
INTERFERÊNCIAS NA MOTILIDADE, VIABILIDADE, POTENCIAL DE
MEMBRANA MITOCONDRIAL E DEFEITOS ACROSSOMAS
ESPERMÁTICOS**

MELCHIANI BAGGIO

**PORTO ALEGRE
2012**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**AVALIAÇÃO DE DUAS CURVAS DE CONGELAÇÃO E DOIS SISTEMAS DE
REFRIGERAÇÃO PARA A PRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO
COMBINADOS COM TRÊS DILUENTES COMERCIAIS E SUAS
INTERFERÊNCIAS NA MOTILIDADE, VIABILIDADE, POTENCIAL DE
MEMBRANA MITOCONDRIAL E DEFEITOS ACROSSOMAS
ESPERMÁTICOS**

MELCHIANI BAGGIO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Biotécnicas da Reprodução, sob a orientação da Prof^ª. Dr^ª. Elizabeth Obino Cirne Lima e sob a co-orientação da Prof^ª. Dr^ª. Ender Rosana Oberst.

PORTO ALEGRE

2012

Melchiani Baggio

AVALIAÇÃO DE DUAS CURVAS DE CONGELAÇÃO E DOIS SISTEMAS DE REFRIGERAÇÃO PARA A PRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO COMBINADOS COM TRÊS DILUENTES COMERCIAIS E SUAS INTERFERÊNCIAS NA MOTILIDADE, VIABILIDADE, POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL E DEFEITOS ACROSSOMAS ESPERMÁTICOS

Aprovado por:

Prof. Dra. Elizabeth Obino Cirne Lima
Orientadora e Presidente da Banca
(Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Prof. Dr. Lucio Pereira Rauber
Membro da Banca
(Instituto Federal Catarinense)

Prof. Dr. Alexandre Floriani Ramos
Membro da Banca
(Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Cenargen)

Prof. Dr. Jeferson Ferreira Fonseca
Membro da Banca
(Embrapa Caprinos e Ovinos)

**Às pessoas raras que encontramos em nossos
caminhos.**

AGRADECIMENTOS

A conclusão de um mestrado exige muito esforço e disciplina, que somente é possível devido ao apoio e a compreensão de muitas pessoas. Este é o espaço da minha dissertação que reservo para agradecer a todas essas pessoas, que em maior ou menor medida, contribuíram para que este projeto se tornasse realidade.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela excelência na qualidade do ensino.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade do meu desenvolvimento profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por ter apoiado financeiramente este projeto.

Ao Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela disponibilização da infra-estrutura necessária para a execução dos experimentos.

À Professora Doutora Elizabeth Obino Cirne Lima, pela orientação acadêmica, por me acolher tão bem, por acreditar em mim, por apostar na execução deste projeto, pelo carinho e pela amizade.

À Professora Doutora Ender Rosana Oberst, pela co-orientação, pela presença, pela disposição, pela amizade e pela disponibilização dos animais.

À Professora Doutora Cláudia Cilene Fernandes Laurino, pela parceria incondicional, pelos valiosos ensinamentos e por toda a ajuda, paciência, risos, abraços e sábias palavras durante todos esses dias.

À Professora Doutora Fátima Rodrigues Guma, pela disponibilização do citômetro de fluxo, essencial para as análises deste experimento.

À Silvia Terra, pela ajuda com as leituras das análises de citometria, que foram determinantes para os resultados deste trabalho.

Ao Santinho Ramos Fontana, pelas ajudas matinais na coleta do sêmen dos animais.

À Paula Barros Terraciano, pelo companheirismo que acrescentou no meu aprendizado.

Ao Ivan Bustamante, pelas dicas e trocas de idéias.

Às colegas e amigas do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Alessandra, Ana Helena, Fabiany, Cristiana,

Marcela, Natália e Helena pela companhia diária, pelo convívio, pelos risos, pelas conversas e pelas trocas de experiências.

Ao Serviço de Reprodução Assistida do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por contribuir com o congelador, utilizado para a congelação das amostras.

Aos meus tios, Celi e Fábio, que não mediram esforços em apoiar-me durante todo esse período, disponibilizando a casa para residir.

Às minhas primas, Camila e Caroline, as quais se privaram de suas liberdades, dividindo quarto comigo durante esse tempo.

Ao meu namorado, Gerson, pelo amor, apoio, companheirismo, estímulo em todos os momentos, pelo exemplo de vida e por me fazer acreditar que tudo é possível.

Ao meu dindo, Flávio, pelos sábios conselhos e pela força.

Às minhas irmãs, Vichória e Isadora, pelo carinho e por entenderem minhas ausências.

Aos meus pais, Ana e Melchior, simplesmente por existirem.

À minha estrela-guia, Ny, por ter me cuidado com tanto carinho, por me ensinar o valor da educação e pelos valores que me passou enquanto comigo esteve. Uma das grandes responsáveis pela pessoa que me tornei.

Ao Tommy e à Lucie, por toda a alegria transmitida diariamente.

A todos vocês, que se fizeram presentes próximos ou distantes, por terem tornado essa caminhada mais prazerosa e agradável e, por uma forma ou outra, contribuírem com a concretização de um grande sonho: Muito Obrigada, vocês são pessoas raras; realmente especiais. Eu tive a sorte de conhecer e conviver com vocês. Obrigada pelo carinho de cada um.

*“Escolhe um trabalho de que gostes e não
terás que trabalhar nem um dia na tua vida”*

Confúcio

AVALIAÇÃO DE DUAS CURVAS DE CONGELAÇÃO E DOIS SISTEMAS DE REFRIGERAÇÃO PARA A PRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO COMBINADOS COM TRÊS DILUENTES COMERCIAIS E SUAS INTERFERÊNCIAS NA MOTILIDADE VIABILIDADE, POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL E DEFEITOS ACROSSOMAS ESPERMÁTICOS

Autor: Melchiani Baggio

Orientador: Elizabeth Obino Cirne Lima

RESUMO

Com os processos de preservação do sêmen, os espermatozoides sofrem danos devido à indução de alterações estruturais e funcionais na membrana e, aliada a estrutura anatômica do cérvix da ovelha, repercute na redução de fertilidade após a inseminação artificial. Muitos protocolos de congelação e de refrigeração aliados a inúmeros diluentes, vêm sendo estudados, a fim de diminuir os danos causados a essas células e aumentar sua capacidade fertilizante. Para otimizar os processos de congelação e de refrigeração, os objetivos deste estudo foram determinar (1) a influência do método de congelação na motilidade, viabilidade, potencial de membrana mitocondrial e nos defeitos acrossomais do semen ovino criopreservado e (2) a influência de três diluentes comerciais na motilidade, viabilidade, potencial de membrana mitocondrial e nos defeitos acrossomais do sêmen ovino refrigerado. Doze ejaculados foram coletados, diluídos e congelados utilizando (A) uma curva manual de congelação (em vapor de nitrogênio líquido) e (B) um congelador programável (CL-8800, Cryologic Freeze Control[®]). Na curva A, as amostras foram refrigeradas e congeladas à 30°C/min. Na curva B, houve uma redução de temperatura de 20°C até -50°C durante 37min. Imediatamente após as curvas de criopreservação, as amostras foram submersas em nitrogênio líquido (-196°C). Para o descongelamento, as palhetas foram submetidas à 37°C por 20seg e analisadas. Para os protocolos de refrigeração, o sêmen diluído em Botubov[®], Bovimix[®] e TYB[®] foi armazenado à 5°C e à 15°C, e avaliado em 0, 24, 48 e 72h pós coleta. As análises de viabilidade e potencial de membrana mitocondrial (MMP) foram realizadas por citometria de fluxo, e a motilidade e os defeitos acrossomais foram avaliados microscopicamente. Motilidade (29%), viabilidade (18%) e MMP (26%) dos espermatozoides criopreservados com o diluente Bovimix[®] e a curva B foram significativamente ($P < 0,05$) superiores do que todos os outros tratamentos. As amostras refrigeradas e diluídas com o diluente Bovimix[®] apresentaram resultados superiores, tanto à 5°C quanto à 15°C, para MMP (44% e 51%, respectivamente) e viabilidade (60% e 53%, respectivamente) 72h pós coleta, quando comparado com as amostras diluídas com Botubov[®] e TYB[®]. Em conclusão, os protocolos de congelação/descongelação e de refrigeração utilizados nestes experimentos, reduziram a motilidade, viabilidade, MMP e aumentaram os defeitos acrossomais quando comparados com o sêmen fresco. Os protocolos de congelação/descongelação prejudicaram mais a função espermática quando comparado com os protocolos de refrigeração. Por fim, os resultados sugerem que as amostras espermáticas diluídas com o diluente Bovimix[®] causou menos danos às células espermáticas do que as amostras diluídas com os diluentes Botubov[®] e TYB[®], tanto nos protocolos de congelação, quanto nos protocolos de refrigeração.

Palavras-chave: sêmen ovino, diluente, criopreservação, refrigeração, viabilidade espermática.

EVALUATION OF THREE SEMEN COMMERCIAL EXTENDERS AFTER TWO DIFFERENT FREEZING CURVES AND DURING TWO DIFFERENT LIQUID STORAGE ON RAM SPERM MOTILITY, VIABILITY, MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL AND DEFECTED ACROSOME

Author: Melchiani Baggio

Adviser: Elizabeth Obino Cirne Lima

ABSTRACT

The process of sperm preservation damages spermatozoa due to induction of structural and functional changes in the membrane, and allied to the ewe cervix anatomy, reflects the reduction in fertility after artificial insemination. Many semen preservation protocols including freezing and cooling rates coupled with different extenders have been studied in order to reduce sperm cryo-damage, increase the fertilizing capacity and increase the time of storage. To improve freezing and cooling processes, the objectives of this study were to determine (1) the influence of freezing method on sperm motility, viability, mitochondrial membrane potential and defected acrosome of cryopreserved sperm and (2) the influence of three commercial extenders on the motility, viability, mitochondrial membrane potential and defected acrosome of liquid stored and frozen-thawed sperm. Twelve semen samples were collected from two mature rams, pooled, and diluted in Botubov[®], Bovimix[®] and TYB[®], and frozen using (A) a manual freezing method (liquid nitrogen vapor) and (B) an automated programmable freezer (CL-8800, Cryologic Freeze Control[®]). For curve A, semen samples were maintained at 37°C and then cooled/frozen at 30°C/min. For curve B, the temperature reduced from 20°C to -50°C during 37min. Immediately, after cryopreservation curves, samples were plunged and stored into liquid nitrogen (-196°C). Then, the straws were thawed at 37°C for 20sec, and analyzed. For cooling studies, pooled ram semen was diluted in Botubov[®], Bovimix[®] and TYB[®], stored at 5°C and at 15°C, and evaluated at 0, 24, 48 and 72 h post collection. For viability and mitochondrial membrane potential (MMP) assessments, semen samples were stained and analyzed by flow cytometry. Motility and defected acrosome assessments were analyzed microscopically. Motility (29%), viability (18%) and MMP (26%) of spermatozoa cryopreserved in Bovimix[®] coupled to curve B were significantly ($P<0.05$) higher than all other treated groups. Semen samples diluted with Bovimix[®] and stored at 5°C and at 15°C yielded better MMP (44% and 51%, respectively) than the samples diluted in Botubov[®] and in TYB[®], and also showed higher viability characteristics at 5°C and at 15°C (60% and 53%, respectively) 72h post collection. In conclusion, freezing/thawing and cooling protocols used in these experiments reduced sperm motility, viability, MMP and increased the defects of acrosomes when compared to fresh semen. Freezing/thawing protocols harmed more spermatozoa function than cooling protocols. Furthermore, our results suggest that the semen samples diluted in the extender Bovimix[®] caused the least cellular injury than the samples diluted in Botubov[®] and in TYB[®] on freezing and on cooling protocols.

Key words: ram semen, extender, cryopreservation, cooling, viability.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 O sêmen.....	15
2.1.1 Os espermatozoides.....	15
2.1.2 O plasma seminal.....	20
2.2 Aspectos funcionais dos espermatozoides.....	22
2.2.1 Capacitação espermática.....	23
2.2.2 Reação acrossômica.....	25
2.2.3 Fecundação.....	27
2.3 Refrigeração.....	29
2.4 Congelação.....	31
2.5 Crioprotetores e diluentes.....	33
2.6 Descongelção.....	37
2.7 Inseminação artificial.....	38
2.7.1 Inseminação artificial com sêmen congelado.....	38
2.7.2 Inseminação artificial com sêmen refrigerado.....	39
2.8 Métodos de avaliação do sêmen.....	40
2.8.1 Motilidade espermática.....	41
2.8.2 Viabilidade.....	42
2.8.3 Potencial de membrana mitocondrial.....	46
2.8.4 Defeito acrossomal.....	48
3 ARTIGO.....	51
4 CONCLUSÕES.....	82
5 PERSPECTIVAS.....	83
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitros
aSFP bovino)	<i>Acidic seminal fluid protein</i> (proteína ácida do fluido seminal
ATP	Adenosinatrifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
BSP bovino)	<i>Bovine seminal plasma protein</i> (proteína do plasma seminal
Ca_{2+}	cálcio
cAMP cíclica)	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i> (monofosfato de adenosine
CASA	<i>Computer assisted semen analysis</i> (análise seminal assistida computadorizada)
CFDA	Carboxifluoresceína
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucléico)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
g	Gravidade
HPBs	<i>Heparin binding proteins</i> (proteínas ligantes à heparina)
HCO_3^-	Bicarbonato
IA	Inseminação artificial
IAC	Inseminação artificial cervical
JC-1	Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'- tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
K_+	Potássio
kDa	Kilodalton
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MP	Motilidade progressiva
MT	Motilidade total
mtDNA	<i>Mitochondrial DNA</i> (DNA mitocondrial)
IP	Iodeto de propídio
PNA	Aglutinina de <i>Arachis Hypogea</i>
PSA	Aglutinina de <i>Pisum sativum</i>
R123	Rodamina 123
SAS	Statistical analysis system (sistema de análise estatística)
TYB	<i>Test yolk buffer</i> (tampão com gema de ovo)
ZP	Zona pelúcida

RELAÇÃO DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
%	porcentagem
®	marca registrada

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da ultra-estrutura do flagelo do espermatozoide de mamíferos.....	17
Figura 2 - Modelo de mosaico fluido da estrutura da membrana plasmática.....	18
Figura 3 - Diagrama da fusão entre espermatozoide e óvulo no processo de fertilização.....	28
Figura 4 - Microscopia de fluorescência de espermatozoide ovino corado com CFDA.....	43
Figura 5 - Viabilidade de sêmen ovino corado com kit de viabilidade Live/Dead e analisado por citometria de fluxo.....	45
Figura 6 - Microscopia de fluorescência de espermatozoide corado com PI e SYBR para identificação da viabilidade espermática.....	45
Figura 7 - Microscopia de fluorescência de espermatozoide corado com JC-1 para identificação de MMP.....	47
Figura 8 - Potencial de membrana mitocondrial de sêmen ovino diluído com Bovimix [®] analisado com JC-1 e avaliado por citometria de fluxo.....	48

1 INTRODUÇÃO

O reflexo da valorização crescente da pecuária nacional, provocada por investimentos maciços em genética, incremento na produção, perspectiva atraente de rentabilidade e aumento no consumo mundial de carnes de maior qualidade (Aro, 2006) tem favorecido o mercado de carne, lã e leite ovino, tornando-o bastante promissor. O Brasil possui um rebanho ovino da ordem de 17.380.600 milhões de animais (FAOSTAT, 2011), e a produção anual alcança 9.700 toneladas de lã, 19.300 toneladas de couro, e cerca de 81.000 toneladas de carne (FAOSTAT, 2010). Porém, dentre os problemas enfrentados pela cadeia produtiva de carne ovina, observam-se deficiências nos aspectos produtivos (sistema de manejo e melhoramento genético), problemas de assistência técnico-econômica, estacionalidade na oferta dos produtos, pouca divulgação dos produtos e abates clandestinos (Brisola e Espírito Santo, 2003).

Considerando os aspectos relacionados à reprodução, as biotécnicas aplicadas à reprodução animal possuem um papel fundamental nos programas de melhoramento; aumentando a fertilidade, incrementando a contribuição de indivíduos de alto mérito genético e, conseqüentemente, contribuindo para rentabilizar o país com grande impacto sócio-econômico. A inseminação artificial (IA) foi a primeira grande ferramenta biotecnológica aplicada para promover a reprodução e a genética nos animais domésticos (Foote, 2002). Para facilitar a utilização da IA, desde o início do século XX, a criopreservação também tem sido amplamente utilizada para a produção animal de interesse zootécnico tal como para a conservação de espécies em perigo (Pesch e Bergmann, 2006).

A difusão da IA nas espécies e a realização do seu total potencial depende do uso do sêmen congelado e assim, das técnicas disponíveis para a obtenção de uma fertilidade aceitável (Papadopoulos *et al.*, 2005). Em ovinos, particularmente, utiliza-se sêmen fresco por via cervical superficial ou sêmen congelado por via intra-uterina de forma laparoscópica (Evans e Maxwell, 1990; Donovan *et al.*, 2001; Paulenz *et al.*, 2002). O uso do sêmen refrigerado permite o melhor aproveitamento dos reprodutores, a introdução de novas linhagens nos rebanhos com segurança sanitária, apresenta menor custo com a simplificação do processo de IA, e assegura a viabilidade do sêmen por até

três dias de armazenamento, sem diminuir sua capacidade fertilizante. Em contrapartida, o sêmen diluído e refrigerado possui um período de vida muito curto, impedindo que as amostras sejam preservadas através dos anos. O uso do sêmen congelado/descongelado possibilita a preservação de material genético, facilita o transporte das amostras, e também está relacionado ao melhor aproveitamento dos reprodutores. Todavia, a utilização do sêmen ovino congelado, em geral, apresenta melhores resultados com a inseminação artificial laparoscópica, uma vez que o sêmen congelado utilizado com inseminação artificial cervical resulta em índices não satisfatórios de gestação, devido ao prejuízo que a congelação acarreta aos espermatozoides e a redução da sua viabilidade e capacidade fertilizante, aliados à estrutura anatômica da cérvix da ovelha, o que dificulta o transporte espermático (Salamon e Maxwell, 1995; Lopez-Saez *et al.*, 2000; Milczewski *et al.*, 2000; Donovan *et al.*, 2001; Paulenz *et al.*, 2002:)

Com o objetivo de aperfeiçoar os métodos de refrigeração e de congelação, aumentar a viabilidade espermática, diminuir o dano celular e aumentar a eficiência das técnicas de congelação e de refrigeração, vários estudos têm sido desenvolvidos. Sendo assim, o presente estudo tem como objetivos avaliar (1) o efeito de diferentes sistemas de congelação para o sêmen ovino, comparando a técnica de congelação convencional (em vapor de nitrogênio líquido) com uma curva automatizada (Cryologic Freeze Control[®]), utilizando três crioprotetores comerciais (Botubov[®], Bovimix[®] e TYB[®]) sobre a motilidade, viabilidade, potencial de membrana mitocondrial e defeitos acrossomais e (2) a motilidade, viabilidade, potencial de membrana mitocondrial e defeitos acrossomais do sêmen ovino por até 72 horas pós-coleta, em sistemas de refrigeração à 5°C e à 15°C com as amostras espermáticas diluídas em Botubov[®], Bovimix[®] e TYB[®].

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O sêmen

O sêmen é uma suspensão celular que contém os gametas masculinos e é composto por duas frações distintas: (i) os espermatozoides e (ii) o plasma seminal. As interações entre os espermatozoides e plasma seminal iniciam-se precocemente na espermatogênese (Tulsiani *et al.*, 1997; Naaby-Hansen *et al.*, 1997).

Os espermatozoides são formados nos testículos (Amann, 1981; de Rooij e Russel, 2000; Franca *et al.*, 2005) e sofrem o processo de maturação nos epidídimos (Dacheux e Dacheux, 2002; Dacheux *et al.*, 2005). As células espermáticas, ao alcançarem o epidídimo, estão com as membranas plasmáticas não bem maturadas e sofrem diversas alterações biológicas durante sua passagem ao epidídimo (Tulsiani *et al.*, 1997); incluindo estabilização da cromatina nuclear, aquisição de motilidade, compactação de fibras do flagelo, alterações na composição da membrana com a incorporação de proteínas, alterações estruturais de açúcares e lipídios, assim como outras modificações bioquímicas (Moore e Hibbit, 1976).

2.1.1 Os espermatozoides

Os espermatozoides são células altamente especializadas, tendo suas características morfológicas, estruturais e bioquímicas adaptadas para a transmissão do genoma masculino (Bustamante, 2010). Estruturalmente, cada espermatozoide pode ser dividido de forma morfológica e funcional, em cabeça e flagelo, os quais são recobertos pela membrana plasmática (Amann e Graham, 1993).

A cabeça possui o acrossoma, que contém enzimas essenciais para a fertilização e o núcleo com o DNA, material genético da célula (Eddy, 1988). O acrossoma é resultante da reorganização do Golgi, onde se acumulam, ao final da espermatogênese, enzimas essenciais para a fertilização. E o núcleo composto por uma cromatina compactada, é resultante das protaminas, proteínas que permitem o enovelamento da

fita de DNA; não havendo assim, expressão gênica no espermatozoide (Eddy, 2006; Sutovsky e Manandhar, 2006).

O flagelo possui as fontes de energia e as estruturas necessárias para gerar a motilidade (Fawcett, 1975; Azevedo, 2006). É composto pela peça intermediária, peça principal e peça final (Figura 1). A peça intermediária está envolvida na produção de energia, por acomodar as mitocôndrias (Eddy, 1988). Compreende a bainha mitocondrial e o axonema, eixo central da estrutura motora do espermatozoide, onde de 75 à 100 mitocôndrias estão dispostas helicoidalmente, e são responsáveis pela produção de energia para o batimento flagelar. Cada mitocôndria possui cópias de genoma mitocondrial (mtDNA) paterno, que podem ser transmitidas ao oócito, porém acredita-se que o mesmo seja degradado após a fertilização (Sutovsky e Manandhar, 2006). O axonema é formado com o rearranjo do citoesqueleto das células espermáticas primordiais e é disposto em 9 + 2 pares de microtúbulos dispostos em paralelo. A peça principal e a peça final são constituídas pelo prolongamento do axonema, circundado pela bainha fibrosa (Eddy, 2006 e Manandhar *et al.*, 2006).

Os espermatozoides são as únicas células de mamíferos que passam por mudanças sistemáticas durante o seu ciclo de vida. Com isso, a membrana espermática é responsável pela interação da célula com o ambiente em que se encontra, seja no sistema reprodutivo masculino ou feminino. Esta interação é mediada por proteínas, peptídeos, ácidos graxos, e o colesterol, que atuarão como fatores capacitantes ou decapacitantes. Sendo assim, a membrana plasmática do espermatozoide sofre mudanças constantes em sua composição, pois funciona como interface entre a célula e o meio, e é por seu intermédio, que são realizadas as comunicações intracelulares (Eddy, 2006; Sutovsky e Manandhar, 2006).

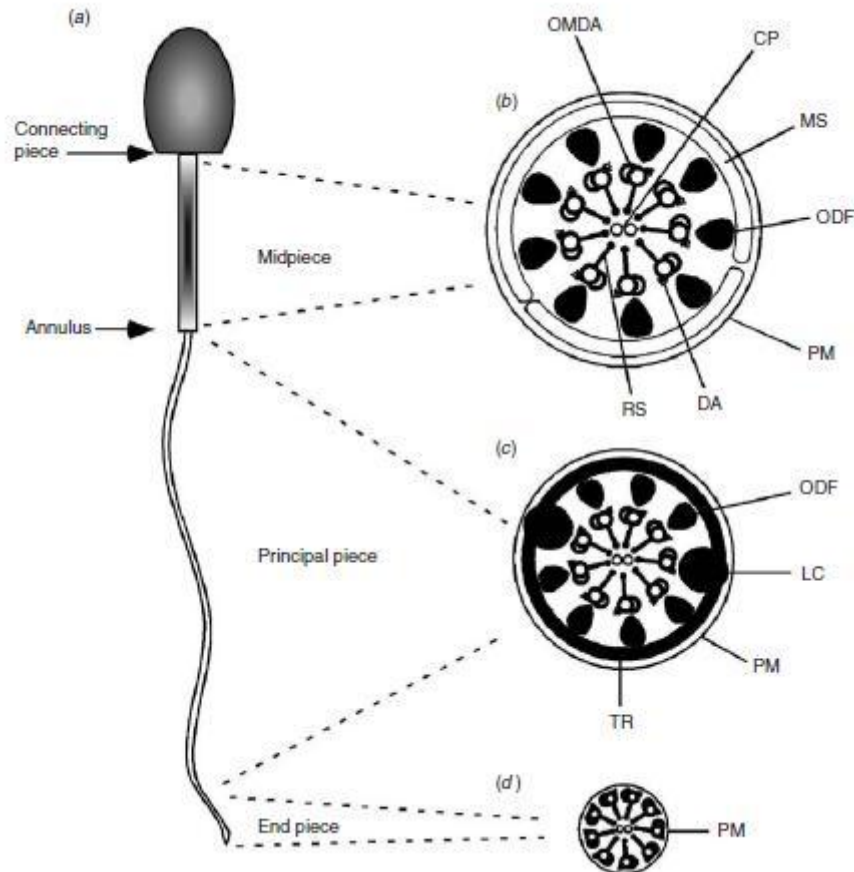


Fig. 1. Representação esquemática do espermatozoide de mamíferos e a ultra-estrutura do flagelo. (a) Espermatozoides de mamíferos são divididos estruturalmente em quatro partes, a peça de conexão, peça intermediária, peça principal e peça final. O final da peça intermediária e o início da peça principal são demarcados por um anel. (b) Secção esquemática de um segmento representativo da peça intermediária mostrando a membrana plasmática (PM) e a bainha mitocondrial (MS) circundando as fibras densas exteriores (ODF). Dentro das ODF estão os componentes do axonema; os nove microtúbulos exteriores do axonema (OMDA) com as proteínas motores associadas (DA) e proteínas multi-unitárias (RS) e o par central de microtúbulos (CP). Em um espermatozoide, muitas projeções estão presentes em contato com o CP. Estes não estão demonstrados no diagrama esquemático. (c) Secção esquemática de um segmento representativo da peça principal mostrando a PM circundando sete ODF e 8 foram substituídos por duas colunas longitudinais da bainha fibrosa (LC). As duas colunas estão conectadas pelos pilares transversos (TR). Os componentes do axonema estão inalterados. (d) Secção esquemática de um segmento representativo da peça final. Os ODF e RS afilados no término da peça principal e não estão presentes na peça final, assim deixando somente a PM para circular o axonema. (American Society of Andrology, Turner, 2003).

A membrana plasmática engloba a célula, envolve todas as estruturas espermáticas e define os seus limites entre o citosol e o ambiente extracelular (Amann e Graham, 1992; Alberts *et al.*, 2004). É composta de moléculas lipídicas e protéicas, unidas principalmente por ligações não covalentes. A bicamada lipídica ficou

estabelecida definitivamente como a base universal da estrutura das membranas celulares. Todas as moléculas lipídicas são anfipáticas, ou seja, possuem uma extremidade hidrofílica ou polar, voltada para o meio externo e uma extremidade hidrofóbica ou apolar, voltada para o meio interno (Squires *et al.*, 1999; Alberts *et al.*, 2004).

Os lipídios de membrana mais abundantes são os fosfolipídios, predominantemente fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e esfingomiélna, compostos de uma cabeça polar e duas caudas de hidrocarboneto de característica hidrofóbica. As diferenças no comprimento e na saturação da cauda de ácidos graxos são importantes, pois influenciam na habilidade das moléculas de fosfolipídios em se agrupar, afetando, conseqüentemente, a fluidez da membrana (Alberts *et al.*, 2004). Os glicolipídios estão localizados na superfície da membrana (Figura 2), enquanto que o colesterol preenche os espaços entre as cadeias de ácidos graxos de fosfolipídios, estabilizando a membrana (Parks e Graham, 1992; Squires *et al.*, 1999).

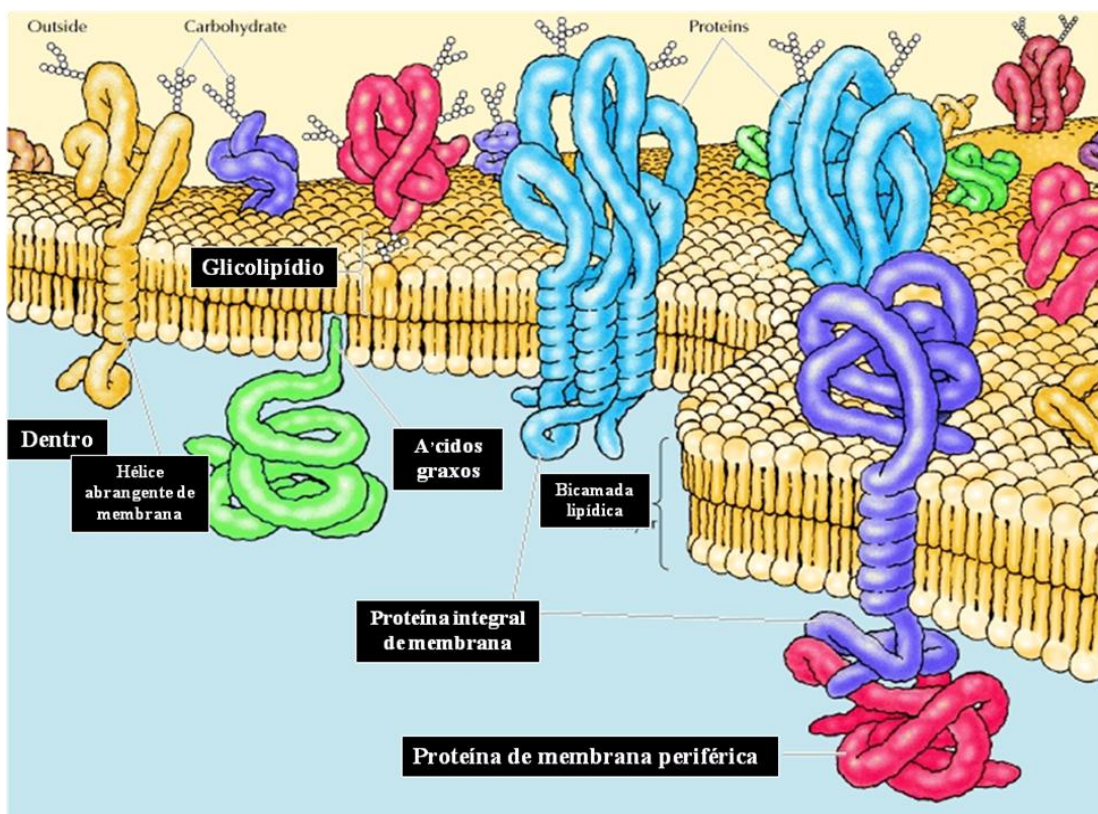


Fig. 2. Modelo de mosaico fluido da estrutura da membrana plasmática (Cooper, 2000).

A membrana plasmática contém quatro grandes grupos de lipídios, que são os fosfolipídios (60-70%), colesterol (12-23%) glicolipídios e diglicéridos (variável entre as espécies, mas em carneiros se concentra em 18%) (Mann e Lutwak-Mann, 1981). Os espermatozoides ovinos possuem uma taxa mais alta de ácidos graxos poliinsaturados e saturados e uma menor proporção de colesterol e fosfolipídios do que as outras espécies (Evans e Maxwell, 1987). Os fosfolipídios de colina representam quase 2/3 dos fosfolipídios da porção anterior da cabeça dos espermatozoides ovinos (Parks e Hammerstedt, 1985).

As proteínas estão entremeadas aos fosfolipídios (Amann e Pickett, 1987; Hafez, 1995), desempenhando a maioria das funções específicas da membrana (Alberts *et al.*, 2004). Estas representam pouco mais de 50% do peso da maioria das membranas e são classificadas como integrais ou periféricas. As proteínas integrais servem como poros ou canais de membrana, receptores para íons e outras moléculas. Muitas proteínas integrais e periféricas contêm cadeias de carboidratos (Amann e Pickett, 1987; Amann e Graham, 1992; Squires *et al.*, 1999), sendo denominadas de glicoproteínas.

A membrana plasmática não é estática. Geralmente todos os componentes estão dispostos aleatoriamente e são livres para movimentarem-se lateralmente. Isso porque a membrana é fluida à temperatura ambiente, denominado estado líquido-cristalino (Parks e Graham, 1992; Squires *et al.*, 1999). A proporção de colesterol/fosfolipídios, assim como a natureza dos fosfolipídios e a temperatura determinam a fluidez da membrana. Em geral, quanto mais colesterol presente, menos flexível ou menos fluida é a porção da membrana (Amann e Pickett, 1987; Amann e Graham, 1992).

Portanto, devido aos espermatozoides serem células formadas especialmente para percorrer o trato reprodutivo feminino, mantendo-se aptas a realizar a fecundação; para desempenhar essa tarefa, os gametas masculinos perdem grande parte de suas organelas, bem como de volume citoplasmático através da interação entre membrana plasmática e o meio. O resultado disso são células de excelente hidrodinâmica, com citoplasma quase inexistente, com o Golgi e as mitocôndrias remanescentes rearranjadas em pólos opostos e com o citoesqueleto adaptado para dar mobilidade ao espermatozoide em matriz líquida (Eddy, 2006), assegurando a transferência do material genético contido no núcleo espermático para o oócito (Eddy e O'Brien, 1994).

2.1.2 O Plasma Seminal

O plasma seminal é um fluido no qual os espermatozoides estão suspensos na ejaculação. Ele fornece o meio de transporte espermático, apresenta diversos fatores essenciais na sobrevivência e na manutenção do potencial fertilizante da célula espermática (Mann e Lutwak-Mann, 1981) e é fonte de energia para o espermatozoide, exercendo capacidade tamponante, mantendo a integridade da membrana espermática (Maxwell e Johnson, 1999).

O plasma seminal é o produto das secreções das glândulas sexuais acessórias (próstata, vesículas seminais e bulbo-uretrais) bem como, dos epidídimos, ductos deferentes e das ampolas dos ductos deferentes (Evans e Maxwell, 1990). E os fatores como a anatomia do útero e o local de deposição de sêmen determinaram evolutivamente, características seminais como volume, concentração e presença de gel (Mann e Lutwak-Mann, 1981).

Sua composição inclui aminoácidos, açúcares, ácido cítrico, minerais, fosfatases e prostaglandinas, além de diversas proteínas de uma faixa ampla de massa molecular (Barth e Oko, 1989). Essa enorme variedade de biomoléculas confere ao plasma seminal uma complexa constituição e, a abundância de biomoléculas, é resultado de uma compensação devido à quase ausência de citoplasma no espermatozoide (Aitken e Baker, 2004).

Composto por secreções do testículo, epidídimo e das glândulas acessórias, o plasma seminal é rico em sais, macro e microelementos, açúcares e proteínas. Ao deixar o testículo, o espermatozoide passa através dos ductos eferentes ao epidídimo, onde glicerilfosforilcolina, carnitina e ácido siálico são encontrados em altas concentrações. São também elevadas as taxas de sódio e de potássio, que são os principais cátions presentes no plasma seminal dos mamíferos (Mann e Lutwak-Mann, 1981).

Os outros componentes do plasma seminal provêm das ampolas, vesículas seminais e próstata. Em algumas espécies, as ampolas secretam frutose e citrato. As vesículas seminais, que produzem 30-60% do volume total de sêmen ejaculado, possuem, dentre as glândulas acessórias, o conteúdo mais rico em proteínas, apresentando altas concentrações de frutose, contribuindo também na produção da

maioria das prostaglandinas existentes no plasma seminal (Mann e Lutwak-Mann, 1981).

A secreção da próstata é ácida e contém putrescina, espermidina e espermina; contribuindo também com diversos minerais. Grande parte da secreção prostática e vesicular é composta de enzimas frequentemente associadas com a membrana plasmática. A secreção das glândulas bulbo-uretrais é mais alcalina que a das glândulas acessórias, neutralizando, assim, o caráter ácido das demais (Miller e Ax, 1988).

O plasma seminal é composto especialmente por proteínas, as quais desempenham um papel crucial em todos os processos relacionados com a capacidade fecundante dos espermatozoides (Moura *et al.*, 2010). Diversas dessas proteínas exercem funções em diferentes estágios do processo de fertilização. Além de influenciar no equilíbrio osmótico e na inibição imunológica, algumas proteínas, especialmente enzimas catalíticas, estão envolvidas no metabolismo espermático (Shivaji *et al.*, 1990). Essas proteínas se ligam aos espermatozoides e influenciam positivamente na capacidade fertilizante da célula (Killian *et al.*, 1993; Jobim *et al.* 2004; Moura *et al.*, 2006).

Outras proteínas desempenham importantes funções na motilidade espermática, na capacitação, na reação acrossômica e na fusão oócito-espermatozoide (Wassarman, 1999). A composição, a conformação e o tamanho dessas proteínas são específicos para cada espécie e elas são estáveis, dependendo das condições do sêmen (Jelínkova *et al.*, 2003). Também, há indicações de que determinadas proteínas são possíveis marcadores de fertilidade e congelabilidade do sêmen ovino (Stryer, 1988; Jobim *et al.*, 2003, Moura *et al.*, 2010).

O plasma seminal também atua modulando a reação acrossomal, evitando que esta ocorra prematuramente, o que levaria falhas na fertilização. A adição de plasma seminal como solução de descongelamento exerce efeito protetor sobre os espermatozoides não capacitados e previne a reação do acrossoma precoce no período pós descongelamento do sêmen ovino (Lausmann *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2005). Isto ocorre devido aos fatores decapacitantes presentes no mesmo, que previnem o desencadeamento do processo de capacitação do espermatozoide por meio da estabilização da membrana plasmática, tanto pela manutenção da razão

colesterol/fosfolipídios, quanto pelo bloqueio da calmodulina, a qual facilita o transporte transmembrânico de cálcio (Ca_{2+}) (Fraser, 1998).

A viabilidade dos gametas masculinos está diretamente ou indiretamente relacionada com as proteínas presentes no plasma seminal, onde estas atuam em mecanismos de proteção da membrana plasmática, na prevenção do estresse oxidativo e na proteção contra reações imunológicas indesejáveis (Moura *et al.*, 2006). A concentração das proteínas do plasma seminal também interfere e atua na proteção dos espermatozoides na congelação e na descongelação do sêmen (Dhami e Kodagali, 1986; Pangawkar *et al.*, 1988; Moore e Hibbit, 1976; Moustafa e Mezaros, 1981; Garcia e Graham, 1987; Al-Somai *et al.*, 1994; Barrios *et al.*, 2000; Aurich *et al.*, 1996).

O estudo destas proteínas presentes no plasma seminal desenvolveu-se principalmente a partir de resultados obtidos em pesquisas em outros sistemas e tecidos, isto é, com a descoberta de proteínas como albumina, imunoglobulinas, insulina e hormônios, que começaram a ser identificadas também no sêmen de mamíferos (Georgiev, 1978; Kemme *et al.*, 1986; Manjunath *et al.*, 1987; Seidah *et al.*, 1987; Scheit *et al.*, 1988; Miller *et al.*, 1990). Posteriormente, as proteínas BSP 30 kDa (Manjunath e Sairam, 1987; Thérien *et al.*, 1998; Manjunath *et al.*, 2007), BSP A1/A2 (Nauc e Manjunath, 2000; Manjunath e Thérien, 2002; Gwathmey *et al.*, 2003), BSP A3 (Roncoletta *et al.*, 2006), clusterina (Howes *et al.*, 1998; Hochgrebe *et al.*, 1999; Humphreys *et al.*, 1999; Ibraim *et al.*, 2000, Ibraim *et al.*, 2001; Reyes-Moreno *et al.*, 2002; Jobim *et al.*, 2004; Moura *et al.*, 2007), P25b (Sullivan e Robitaille, 1989; Lessard *et al.*, 1999; Lessard *et al.*, 2000), osteopontina (Cancel *et al.*, 1997; Bustamante, 2010), aSFP (Einspanier *et al.*, 1991, Einspanier *et al.*, 1993; Moura *et al.*, 2007; Bustamante, 2010) e, inclusive a albumina também foram algumas das proteínas estudadas (Alvarez e Storey, 1985; Jobim *et al.*, 2004).

2.2 Aspectos funcionais dos espermatozoides

Ao alcançarem o epidídimo, as células espermáticas sofrem diversas alterações biológicas (Tulsiani *et al.*, 1997); incluindo estabilização da cromatina nuclear, aquisição de motilidade, compactação de fibras do flagelo, alterações na composição da

membrana com a incorporação de proteínas, açúcares, lipídios e outras modificações bioquímicas (Moore e Hibbit, 1976; Amann, 1993).

Na interação das células espermáticas com o meio espermático, algumas proteínas que são incorporadas aos espermatozoides estão envolvidas na ligação do espermatozoide ao oócito. Sendo assim, os principais fenômenos que devem ocorrer previamente à fecundação do gameta feminino são a capacitação espermática e a reação acrossomal.

A fertilização é o resultado desses eventos moleculares, em que os espermatozoides capacitados se ligam ao oócito e realizam uma série de outros eventos programados antes da penetração na zona pelúcida e ligação com o óvulo (Abou-Haila e Tulsiani, 2000). Os espermatozoides, mesmo apresentando motilidade e aparente normalidade morfológica, logo após a ejaculação, não têm capacidade de fecundar um oócito; esta capacidade é adquirida no trato genital feminino em um processo denominado capacitação espermática (Yanagimachi, 1994; Pérez *et al.*, 1996).

2.2.1 Capacitação Espermática

O termo capacitação descreve o conjunto de alterações fisiológicas realizadas no trato reprodutivo feminino, pelas quais, o espermatozoide se torna competente para se ligar e fertilizar o oócito (Austin, 1951; Bedford, 1983; Delpech e Thibault, 1993; Bazer *et al.*, 1995; Senger, 2003; Gilbert, 2003).

O processo de capacitação ocorre fisiologicamente no útero, especificamente na região do istmo do oviduto (Amann e Graham, 1992; Delpech e Thibault, 1993; Hafez, Hafez, 2000; Bedford *et al.*, 2003; Gadella e Colenbrander, 2003) e precede a reação do acrossoma. A capacitação é necessária para que os espermatozoides tornem-se capazes de encontrar o oócito, ligarem-se a zona pelúcida e iniciarem a reação do acrossoma (Saling e Storey, 1979).

Os agentes capacitantes das secreções do oviduto (glicosaminoglicanos) removem as proteínas periféricas de origem epididimária e/ou do plasma seminal, fatores decapacitantes, que restringem os movimentos de proteínas e lipídios dentro da membrana (King, 1993; Ferreira e Matsubara, 1997; Zúge, 1999). A fluidez da

membrana celular continua a ser alterada através da remoção do colesterol da parte anterior da cabeça, por albuminas e lipoproteínas de alta densidade do trato reprodutivo feminino, observando-se uma diminuição da proporção de colesterol e fosfolipídios (Storey, 1995; Gilbert, 2003).

Uma das primeiras etapas da capacitação espermática é a perda de colesterol da membrana plasmática. Este fluxo de colesterol induz a reorganização lipídica da membrana, aumentando assim sua permeabilidade ao Ca_{2+} , bicarbonato (HCO_3^-) e potássio (K_+). Quando determinada quantidade de colesterol for removida, a membrana torna-se instável com habilidade de fusão com a membrana acrossomal externa, resultando na reação do acrossoma (Purdy e Graham, 2004).

A taxa de capacitação espermática está relacionada com a taxa de fluxo de colesterol da membrana plasmática. Assim, espermatozoides de humanos e bovinos, com alto conteúdo de colesterol, requerem um maior período para capacitarem (8 e 6 horas, respectivamente); enquanto espermatozoides suínos e ovinos, com baixo conteúdo de colesterol, requerem 1 ou 2 horas para capacitação (Yanagimachi, 1994; Frits, *et al.*, 2000).

O aumento da fluidez da membrana, em resposta ao movimento dos lipídios, vai permitir que as proteínas movam-se mais livremente, disponibilizando os receptores de superfície. Estes podem levar à ativação de uma série de sinais de transdução mediados por lipídios (Storey, 1995) importantes para os processos de fusão durante a posterior interação de espermatozoide e oócito (Miller *et al.*, 2002).

Os espermatozoides tornam-se hiperativos, apresentando maior motilidade e vigor. Este fenômeno parece ser mediado através da ativação do cAMP pela adenilciclase. A desestabilização da membrana leva à alteração do seu potencial, o que vai permitir a entrada de Ca_{2+} , pelos canais de Ca_{2+} , os quais estão localizados no flagelo do espermatozoide (King, 1993; Harrison, 1996; Gilbert, 2003) e também, permitir a difusão dos íons de HCO_3^- , presentes nos fluidos do trato reprodutivo feminino, no interior do espermatozoide. Por sua vez, estes íons vão ativar uma enzima solúvel do citosol, a adenilciclase (Alberts *et al.*, 2002).

Portanto, os mecanismos da capacitação espermática estão associados com as modificações da membrana plasmática e com a concentração intracelular de íons. Estas

modificações envolvem a remoção ou a inativação de fatores decapacitantes da superfície do espermatozoide; mudanças na localização, estrutura molecular e na mobilidade de proteínas; adsorção espermática de proteínas do trato da fêmea; alterações na composição lipídica da membrana, em particular na proporção entre colesterol e fosfolipídios; aumento do Ca_{2+} , sódio e pH intracelular; produção de espécies reativas de oxigênio; e aumento do cAMP e da fosforilação da proteína tirosina (Medeiros, 2002).

Os fenômenos associados à capacitação são reversíveis ou inibidos na presença do plasma seminal, o que leva a um conceito de reversibilidade por adsorção (durante a maturação ou ejaculação) e a desadsorção (durante a passagem pelo trato reprodutivo feminino) de fatores decapacitantes ou estabilizadores (Harrison, 1996; Gilbert, 2003).

Dessa forma, a capacitação pode ser vista como uma alteração na sensibilidade da membrana citoplasmática adjacente ao acrossoma, em resposta a um estímulo capaz de induzir a hiperativação e a reação acrossomal (Roldan, 1994; Harrison, 1996).

2.2.2 Reação Acrossomal

A reação acrossômica é um processo exocitótico, que disponibiliza a maquinaria enzimática necessária para a penetração da zona pelúcida (ZP) pelo espermatozoide. Esta é a última etapa de uma sequência de reações dirigidas por sistemas de sinalização celular (Wassarman, 2002), e somente espermatozoides acrossomos reagidos estão aptos a atravessar a ZP, ligar-se a membrana plasmática do oócito e se fundir com o gameta feminino. A reação do acrossoma leva à liberação de uma variedade de enzimas hidrolíticas e proteolíticas, principalmente a acrosina e a hialuronidase, as quais são essenciais para a penetração do espermatozoide na ZP do oócito (Yanagimachi, 1994). A reação acrossomal resulta na modificação de algumas proteínas da membrana plasmática no segmento acrossomal equatorial e pós-equatorial num nível necessário para a fusão com a membrana do oócito (Patrat *et al.*, 2000).

A ZP é uma estrutura espessa (7-15 micrômetros), com características elásticas (Bedford, 2006), constituída por uma matriz glicoprotéica, composta por três grupos de glicoproteínas (ZP1, ZP2 e ZP3), as quais são sintetizadas exclusivamente pelo oócito

maturado (Gilbert, 2003). Essas proteínas aparentam estar presentes em todas as espécies de mamíferos, existindo pequenas diferenças espécie-específicas, que permitem que o reconhecimento e a ligação do espermatozoide à ZP sejam realizados (Hafez, 1993; Gilbert, 2003).

Os eventos moleculares da reação acrossômica são absolutamente dependentes de Ca_{2+} extracelular (Breibart e Spungin, 1997); e proporcionam a ligação à ZP, através da estimulação pelo HCO_3^- . A capacidade de penetração do espermatozoide é completamente dependente deste íon, todavia, também causa a diminuição da viabilidade espermática (Harrison, 1996).

A reação acrossômica é induzida pela ligação do receptor de membrana do espermatozoide, a proteína galactosiltransferase-1, aos resíduos de carboidratos da ZP3, uma glicoproteína sintetizada pelo oócito maturado (Gilbert, 2003). Esta ligação leva a ativação da proteína G da membrana citoplasmática com a membrana externa do acrossoma e à exocitose do conteúdo da vesícula acrossômica em resposta à abertura dos canais de Ca_{2+} (Howes e Jones, 2002) e há a exposição da membrana acrossomal interna e dos conteúdos acrossomais (Yanagimachi, 1994). Todavia, o cálcio extracelular é um requerimento absoluto para a reação do acrossoma (Blackmore *et al.*, 1990; Florman *et al.*, 1989).

A vesiculação do acrossoma libera uma série de enzimas proteolíticas que lisam a ZP. Estas enzimas abrem um túnel na ZP, através do qual o espermatozoide hiperativo percorre um caminho oblíquo até a superfície do oócito (Bedford, 2006). Durante a reação acrossômica, a exocitose das enzimas leva a degradação da região apical do espermatozoide, perdendo-se os receptores de ligação à ZP3. Mas para penetrar a ZP, este tem de se manter ligado a esta matriz (Albert *et al.*, 2002). O espermatozoide reagido que se liga à ZP2, glicoproteína sintetizada pelo oócito maturado, na porção da cabeça, indica que há uma segunda ligação entre proteínas presentes na membrana interna do acrossoma e a ZP2 (Bleil e Wassarman, 1986; Storey, 1995).

A seguir, a membrana citoplasmática, no entorno do segmento equatorial, funde-se com o segmento distal da membrana do acrossoma, de forma a isolar o citoplasma do espermatozoide do ambiente extracelular (Roldan, 1994). As alterações induzidas na composição da membrana citoplasmática da região posterior da cabeça do

espermatozoide, perto da zona equatorial, são essenciais para que esta região se funda com a membrana citoplasmática do oócito após o espermatozoide ter atravessado a ZP (Harrison, 1996; Miller *et al.*, 2002).

Uma vez induzida, a reação do acrossoma é resultado de uma cascata de sinais intracelulares, bem estabelecidos, embora a sequência exata de eventos ainda não esteja completamente elucidada (Graham, 1996; Patrat *et al.*, 2000).

2.2.3 Fecundação

Os principais fenômenos relacionados à fecundação do gameta feminino são a capacitação espermática e a reação acrossomal. No momento da ovulação, o oócito em metáfase II é liberado do ovário sofrendo uma rápida maturação, que o torna apto a ser fertilizado (Albert *et al.*, 2002). Neste estágio, o oócito se encontra recoberto por uma matriz extracelular, a ZP, e é rodeado por uma massa de células foliculares da granulosa, o cumulus (Harrison, 1996).

Após a ejaculação, os espermatozoides devem alcançar o istmo do oviduto ipsilateral, onde ocorre a ovulação (Rodrigues-Martinez *et al.*, 2005). Neste local, os espermatozoides capacitados podem se ligar à zona pelúcida do oócito (Rath *et al.*, 2005). O local da união induz a reação do acrossoma e, assim, os espermatozoides móveis e hiperativos penetrarão na ZP (Flesch e Gadella, 2000).

A hiperativação associada à enzima hialuronidase, presente na parte externa da membrana celular, permite o espermatozoide digerir um caminho através das células do cumulus e chegar até a ZP (Harrison, 1996; Gilbert, 2003). A ZP3 permite a ligação do espermatozoide com o acrossoma intacto à ZP e desencadeia uma resposta enzimática, que promove o início da reação acrossômica (Storei, 1995; Guerra e Peters, 2007) (Figura 3).

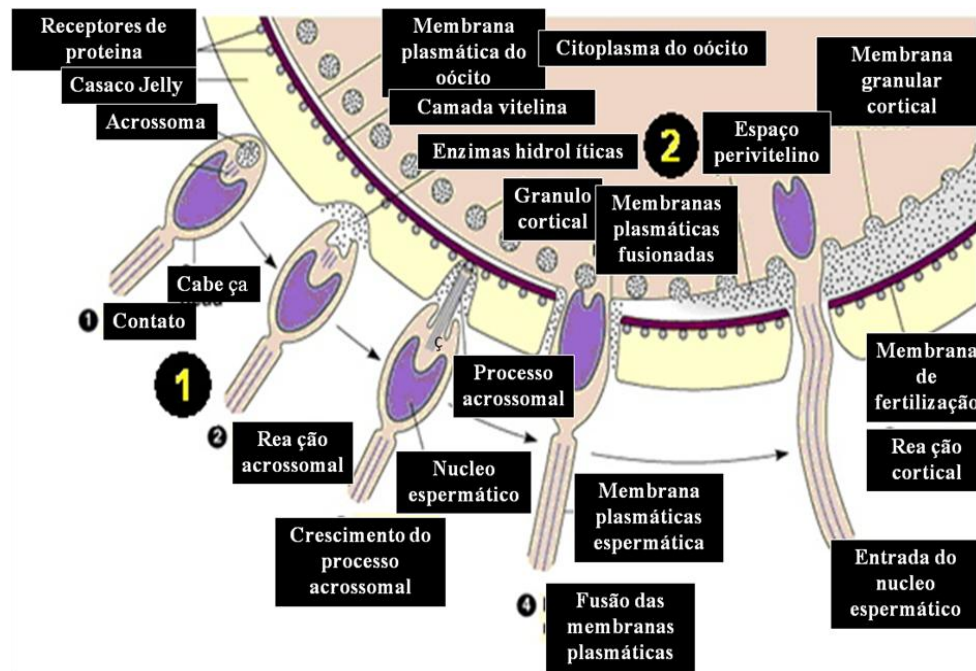


Fig. 3. Diagrama da fusão entre espermatozoide e óvulo no processo de fertilização (Inoue *et al.*, 2005).

A ligação e a subsequente fusão das membranas ocorrem através da região equatorial da cabeça do espermatozoide (Gilbert, 2003). O espermatozoide vai interagir com as microvilosidades da membrana citoplasmática do óvulo (Storey, 1995). As microvilosidades, perto da zona de contato, vão alongar-se e rodear firmemente o espermatozoide permitindo que um mediador de fusão, proteínas da família ADAM (fertilina), presentes na superfície da membrana do espermatozoide, se liguem à integrina, presente na membrana do óvulo, promovendo a fusão entre as membranas (Alberts *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2002). Mais uma vez a fusão é mediada por íons de Ca_{2+} (Storey, 1995).

A fusão do espermatozoide com a membrana do óvulo origina um evento onde Ca_{2+} citosólico ativa o óvulo. Este reinicia o seu programa de desenvolvimento e inicia a reação cortical, que vai alterar a estrutura da ZP, impedindo assim a polispermia (Alberts *et al.*, 2002). Finalmente, as células espermáticas se ligam ao oolema (Evans e Florman, 2002) e, após a fertilização, o DNA condensado do espermatozoide se desdobra e o pró-núcleo masculino é formado e se funde com o pró-núcleo feminino, de maneira que o genoma do novo indivíduo seja formado (Silva e Gadella, 2005).

Após a sua formação, os pró-núcleos haplóides do espermatozoide e do oócito migram até o centro do oócito, as membranas desintegram-se, ocorre a sincarirose e, posteriormente, há o alinhamento dos cromossomos na placa metafásica, para a primeira das várias divisões que irão dar origem ao embrião (Gilbert, 2003).

2.3 Refrigeração

A refrigeração do sêmen diluído é utilizada como principal método de armazenamento do sêmen ovino. É caracterizada pela redução da temperatura que originalmente encontra-se em torno de 37°C, para temperaturas próximas a zero grau Celsius, período este de adaptação do espermatozoide, para a redução de seu metabolismo (Mazur, 1984). Neste período, o espermatozoide sofre inibição reversível de seu metabolismo (Câmara e Guerra, 2011).

Quando se utiliza o sêmen fresco, esse deve ser mantido à temperatura em torno de 30°C, e também, deve ser utilizado no menor tempo possível, pois nessa condição a motilidade e viabilidade seminal são reduzidas rapidamente. Quando se refrigera o sêmen, este pode ser armazenado e utilizado até 48 horas após a colheita (Rojero *et al.*, 2009) porém, ocorre uma queda acentuada na fertilização, quando o sêmen é armazenado por mais de 24 horas na inseminação artificial cervical (Anel *et al.*, 2006; O'Hara *et al.*, 2010).

A refrigeração do sêmen, de 30°C até 0°C, realizada de forma abrupta, pode ocasionar um estresse letal a algumas células, caracterizado como choque térmico (Watson, 2000). O dano às células, causados pela queda da temperatura, está relacionado com alterações no arranjo dos constituintes da membrana, devido a mudanças na viscosidade do diluente (Medeiros *et al.*, 2002).

Inúmeros métodos podem ser utilizados para promover a queda de temperatura, automáticos ou manuais. Todavia, a curva de queda da temperatura deve ser promovida de maneira constante e homogênea, evitando variações bruscas que culminam em choque térmico, com conseqüente redução da viabilidade espermática (Watson, 2000; Medeiros *et al.*, 2002). A redução da temperatura a níveis baixos é utilizada para deprimir o metabolismo dos espermatozoides e prolongar a sua vida fértil (Anel *et al.*,

2006), possibilitando o seu armazenamento e utilização por um maior período de tempo. O armazenamento do sêmen na forma líquida apresenta facilidade no seu processamento, mas possui um tempo hábil bastante limitado.

Uma queda de temperatura lenta também promove tensão na membrana celular (Watson, 2000), por isso a curva de refrigeração deve ser monitorada e padronizada. Bolsas plásticas contendo água são utilizadas com eficiência para controlar a queda de temperatura, quando se utiliza refrigeradores convencionais (Rodello, 2006) ou balcão (Lima *et al.*, 2010).

Sendo assim, para promover a queda na temperatura, podem-se utilizar equipamentos convencionais (refrigerador, garrafas térmicas ou caixas isotérmicas com gelo), ou ainda, equipamentos automatizados. Quando se utiliza refrigerador, as palhetas devem ser colocadas primeiramente em frascos com águas à 30°C, e posteriormente levadas ao refrigerador e mantidas até a estabilização da temperatura. No uso de caixas isotérmicas, com gelo ou água gelada, as palhetas devem ser protegidas com algodão hidrofóbico para evitar o choque térmico, devido ao contato direto com o gelo (Corandin, 2011).

Utilizam-se várias temperaturas no armazenamento do sêmen refrigerado, entretanto as temperatura de 15°C (Yániz *et al.*, 2005; Druart *et al.*, 2009), 5°C (Bucak e Tekin, 2007; Rojero *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2010) e 4°C (Sousa *et al.*, 2010) são as comumente utilizadas.

O armazenamento do sêmen na temperatura de 4°C promove a redução no metabolismo dos espermatozoides, economia das reservas energéticas e boa conservação da motilidade, enquanto a preservação seminal à 15-20°C mantém a atividade celular, tornando os espermatozoides mais sensíveis aos metabólicos tóxicos (Decuadro-Hansen, 2004).

O sêmen mantido à temperatura de 15°C possui um tempo útil bastante inferior àqueles acondicionados à 4-5°C, e para que tenha índices satisfatórios de taxa de fertilização, recomenda-se uso em até 8 horas após o processamento (Anel *et al.*, 2006).

A comparação entre a refrigeração automatizada e a refrigeração convencional não foi diferente estatisticamente para amostras de sêmen refrigeradas com o

congelador automatizado TK 3000[®]. Isso ocorreu devido aos dois sistemas de refrigeração proporcionar um resfriamento gradativo, com redução à 0,5°C/minuto durante um tempo de 90 minutos, para reduzir a temperatura de 32°C até 5°C (Rodello, 2006).

A viabilidade de amostras de sêmen ovino diluídas com leite desnatado, OviPro, Andromed e INRA 96 declinou linearmente com o armazenamento à 15°C quando comparado com a refrigeração à 5°C até 72 horas após a coleta (O'Hara *et al.*, 2010). A taxa de gestação, após a inseminação artificial cervical com sêmen refrigerado à 5°C com a utilização do diluente INRA 96, também apresentou queda com o aumento do tempo de armazenamento, mas obteve um índice satisfatório (52,2%), quando a sua utilização foi em até 24 horas.

O diluente Tris-Gema combinado com a refrigeração à 4°C demonstrou uma grande diferença quando comparado aos diluentes Equimix e Equimix9 Gema, proporcionando proteção às células até 24 horas de armazenamento (Sousa *et al.*, 2010). No entanto, a utilização de gema de ovo pode diferenciar os tratamentos devido à grande variabilidade da sua composição (Anel *et al.*, 2006), dificultando a padronização dos diluentes. Mas o tradicional Tris-Gema pode ser utilizado para conservação do sêmen à 4°C por um período de até 48 horas (Rojero *et al.*, 2009).

2.4 Congelação

A criopreservação induz uma série de estresses osmóticos, químicos e mecânicos aos espermatozoides (Hammerstedt *et al.*, 1990), e deve envolver fases de redução de temperatura, desidratação celular, congelamento e descongelamento do sêmen (Medeiros *et al.*, 2002). A criopreservação pode ser realizada de várias maneiras; contudo, para o sucesso do processo, todas as etapas devem ser realizadas de forma harmoniosa.

Para a criopreservação pode-se utilizar caixas isotérmicas com nitrogênio líquido (N₂); porém, mesmo que viável este método possui difícil padronização das curvas de queda de temperatura. Por isso, a indústria especializada investe em

pesquisas, a fim de lançar aparelhos automatizados, que apresentem uma curva homogênea e que sejam padronizados (Rodello, 2006).

Atualmente, existem dois métodos para a criopreservação de gametas: o congelamento lento e a vitrificação. O congelamento lento possui a vantagem de utilizar uma baixa concentração de crioprotetores em relação à vitrificação; porém, por ser um método rápido e simples, a vitrificação reduz o choque térmico sofrido pela diminuição gradual da temperatura (Arav *et al.*, 2002).

A primeira parte da amostra a ser congelada é o meio intracelular, por isso, a taxa de queda de temperatura no congelamento lento é o principal fator que determina a sobrevivência dos espermatozoides. No caso da vitrificação, utilizava-se a imersão direta no N₂ (-196°C). Hoje, com o avanço tecnológico, o nitrogênio pode chegar a temperaturas de -210°C, aumentando a taxa de congelamento; porém, essa queda de temperatura drástica pode ocasionar lesões nas membranas com redução no potencial de fertilização dos espermatozoides (Arav *et al.*, 2002).

A temperatura entre -5°C e -50°C é definida como um ponto crítico, pois nessa temperatura, a taxa de congelamento determina se a célula permanece em equilíbrio com seu meio extracelular ou torna progressivamente super congelada, elevando a possibilidade de desidratação e formação de gelo intracelular (Kumar *et al.*, 2003).

Também se utilizam suspensão no vapor de nitrogênio líquido, com posterior imersão no líquido para o congelamento do sêmen, nesse caso, o que determina a velocidade da queda da temperatura é à distância com o nitrogênio líquido e o tamanho das palhetas (Leboeuf *et al.*, 2000). A curva de queda de temperatura ideal para o congelamento é uma parábola, conseguida com uma distância de 4-6 centímetros entre as palhetas e o nitrogênio líquido (Salamon e Maxwell, 2000).

Após o descongelamento, não foi possível detectar diferenças entre um sistema automatizado (TK 3000[®]) para o congelamento de sêmen e um sistema manual com a utilização de geladeira e vapor de nitrogênio líquido (Rodello, 2006). Nesse estudo, para o congelamento em vapor de nitrogênio líquido, as palhetas com o sêmen, após atingirem a temperatura de 5°C, foram transferidas para um caixa de polietileno (isopor), contendo 5,5 litros de nitrogênio líquido e logo foram expostas na posição horizontal a três centímetros do vapor de nitrogênio líquido por 20 minutos.

Posteriormente foram submersas no nitrogênio líquido e armazenadas em raques em botijão criogênico.

Uma taxa de criopreservação lenta ($-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) e duas rápidas ($-30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e $-50^{\circ}\text{C}/\text{min}$) foram utilizadas para avaliar o efeito da criopreservação sob os parâmetros qualitativos do sêmen de bovinos, ovinos e caprinos (Kumar *et al.*, 2003). A peça intermediária e cauda dos espermatozoides ovinos (envolvidos na geração e propagação do movimento) podem ser vulneráveis às taxas de congelamento lento, enquanto os espermatozoides caprinos possuem a motilidade espermática prejudicada pela criopreservação rápida. Contudo, independente da espécie, a taxa de $-30^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ é mais eficiente contra a crioinjúria, sendo recomendada entre as temperaturas de -5°C e -50°C (Kumar *et al.*, 2003).

O processo de criopreservação causa danos celulares, que podem afetar a habilidade fertilizante do espermatozoide, sem um impacto concomitante sobre a motilidade. O que significa que uma boa motilidade após o descongelamento nem sempre está relacionada com a boa fertilidade (Grondhal *et al.*, 1992). Todavia, uma maior severidade de danos na membrana plasmática, após o congelamento, ocorre com maior intensidade nos carneiros, assim como a perda de lipoproteínas e de aminoácidos, bem como de fosfolipídios, e fosfatase e colesterol. E a criopreservação também aumenta o conteúdo de sódio e diminui o de potássio nos espermatozoides (Holt, 2000).

Além desses fatores, e ao contrário das outras espécies, alguns aspectos do processo de congelamento tornam a membrana espermática dos espermatozoides ovinos com maturação excessiva, aumentando a proporção de espermatozoides capacitados e com os acrossomas reagidos precocemente (Salamon e Maxwell, 1995; Holt, 2000).

2.5 Crioprotetores e diluentes

Devido ao pouco volume (0,5 à 2,0 mL) e à alta concentração espermática (2 à 5×10^9 spz/mL) do sêmen ovino, utiliza-se diluente para aumentar o volume total do ejaculado e assim obter maior proporção de doses inseminantes, assim como em outras espécies. Também, diluentes são empregados no intuito de aumentar o tempo de

armazenamento seminal e favorecem a sobrevivência dos gametas masculinos (Gonçalves *et al.*, 2001).

Um meio de criopreservação deve fornecer aos espermatozoides nutrientes e energia, como glicose; proteger as células do choque térmico; proporcionar um meio com pH estabilizado e uma pressão osmótica adequada; inibir a proliferação bacteriana e aumentar o volume do ejaculado (Hafez e Hafez, 2004). E, para melhores resultados, deve-se adicionar um diluente ao sêmen de forma cuidadosa, a fim de promover a avaliação do sêmen diluído, para confirmar a sua viabilidade espermática.

A evolução da tecnologia nos diluentes seminais tem mostrado que a sobrevivência dos espermatozoides, por períodos prolongados, é inversamente proporcional à sua atividade metabólica (Anel *et al.*, 2006). Então, várias substâncias orgânicas e sintéticas são utilizadas e lançadas pela indústria para promover proteção aos espermatozoides durante a diluição; porém, o balanço entre concentração e interação desses agentes com o meio celular deve ser sempre mensurado (Salamon e Maxwell, 2000).

Normalmente, os diluentes utilizados para preservação de sêmen de carneiro apresentam pH, capacidade de tamponamento e osmolaridade adequados, e promovem proteção aos espermatozoides de lesões criogênicas (Salamon e Maxwell, 2000). Os diluentes mais utilizados são constituídos majoritariamente por Tris (hidroximetil aminometano) (Maia *et al.*, 2008) e leite desnatado (Hafez e Hafez, 2004). Todavia, diluentes à base de Tris, proporcionam maior proteção em comparação com o diluente à base de leite desnatado (Sandoval *et al.*, 2007).

O glicerol é um dos crioprotetores mais utilizados e possui a capacidade de penetrar na membrana celular e diminuir o estresse osmótico intracelular, causado pela desidratação; entretanto, dependendo da concentração utilizada, sua toxicidade pode ocasionar danos na membrana e, conseqüente, redução na motilidade espermática (Medeiros *et al.*, 2002). A adição de gema de ovo e/ou antioxidantes é utilizada para reduzir a concentração do glicerol e minimizar seu efeito tóxico (Salamon e Maxwell, 2000). No entanto, a adição de glicerol em duas etapas, com diferentes temperaturas, representa o melhor balanço entre citotoxicidade e criopreservação (Anel, 2006).

Um estudo com combinações de agentes crioprotetores, sendo um permeável (glicerol e etilenoglicol) e outro não permeável (trealose e sacarose), mostrou que independentemente do tipo de crioprotetor não permeável, a qualidade seminal após o descongelamento é estatisticamente melhor para os grupos que utilizaram o glicerol como crioprotetor permeável (Sandoval *et al.*, 2007). Os espermatozoides ovinos apresentam uma maior susceptibilidade aos efeitos tóxicos do etilenoglicol, mas em contrapartida, dependendo da concentração de etilenoglicol, pode-se obter motilidade e vigor semelhantes ao glicerol (Moraes *et al.*, 1998; Brisola *et al.*, 1999). O etilenoglicol protege as membranas espermáticas devido à sua maior velocidade de penetração celular, proporcionando uma diminuição da alta concentração de sais no interior do espermatozoide (Moraes *et al.*, 1998).

A dimetilformamida (DMF) associada ou não ao glicerol, como crioprotetor para congelamento de sêmen de caprinos, não influencia a motilidade espermática e vigor (Silva *et al.*, 2006). Já na efetividade da criopreservação de sêmen de ovinos, há redução na qualidade seminal *in vitro* (motilidade, parâmetros cinéticos e integridade de membrana), após a criopreservação (Moustacas *et al.*, 2011). A DMF não possui efeito crioprotetor satisfatório sobre o sêmen de ovinos, como em outras categorias animais (caprinos, caninos, equinos e suínos), devido às diferenças existentes na estrutura da membrana espermática (Moustacas *et al.*, 2011).

Outras substâncias como: dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol, albumina, açúcares, surfactantes, proteínas de peixe, etc, têm sido avaliadas como agentes crioprotetores; entretanto, nota-se efeito inferior ao glicerol (Salamon e Maxwell, 2000).

A gema de ovo é comumente adicionada aos diluentes, devido a sua fração lipoproteica de baixa densidade e alto peso molecular, os quais promovem proteção aos espermatozoides contra o choque térmico, reduzindo a perda de enzimas acrossomais e prevenindo as alterações de membrana durante o armazenamento (Salamon e Maxwell, 2000). Nos diluentes a base de leite desnatado este mecanismo de proteção deve-se também à sua fração protéica (Medeiros *et al.*, 2002).

A adição de surfactantes ao diluente à base de gema de ovo melhora significativamente a qualidade seminal e fertilidade após o processo de criopreservação, devido à manutenção da motilidade e integridade das membranas (Maia *et al.*, 2008). A

gema de ovo atua no meio extracelular protegendo a membrana plasmática dos danos causados pela congelação (Salamon e Maxwell, 2000). O efeito da interação entre as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) da gema de ovo com a membrana celular promove diminuição na perda de fosfolípidios da membrana e aumenta sua tolerância ao processo de criopreservação (Anel *et al.*, 2006).

Diluentes à base de água de coco em pó (ACP-102[®]) apresentam taxa de fertilidade de 48% na inseminação cervical e 70,3% na inseminação laparoscópica em ovinos com sêmen refrigerado à 4 °C (Machado *et al.*, 2006). O leite em pó desnatado, por sua vez, reduz gradualmente a motilidade progressiva e a integridade de membrana plasmática dos espermatozoides submetidos ao processo de criopreservação (Carvalho *et al.*, 2008).

O efeito da adição do detergente lauril sulfato de sódio (OEP) ao diluente Tris, contendo 20% de gema de ovo, sobre a viabilidade seminal, após o congelamento e descongelamento do sêmen ovino, promoveu melhora significativa na motilidade espermática, motilidade progressiva e integridade de membrana (Maia *et al.*, 2008). A queda da motilidade do espermatozoide é uma característica encontrada frequentemente em sêmen congelados, isso se deve principalmente ao estresse da criopreservação que a célula é submetida.

O efeito crioprotetor dos diluentes Tris-gema aditivado com OEP tem efeito direto sobre as membranas espermáticas, reduzindo o estresse osmótico da adição do glicerol, devido ao aumento da permeabilidade da membrana (Maia *et al.*, 2008). Em contrapartida, quando não há adição de OEP, ocorre maior estresse osmótico e maior desidratação celular e redução da motilidade devido à maior lesão da membrana. Este fato reflete a importância da utilização de crioprotetores, que promovem a máxima proteção dos espermatozoides aos danos causados pela congelação.

O diluente comercial Bovimix[®] (Nutricell, Campinas, São Paulo, Brasil) é composto por Tris, ácido cítrico, glicose, penicilina, estreptomicina e gema de ovo. Para o sêmen bovino. Em protocolos de refrigeração lenta, antes da criopreservação, são menos prejudiciais à célula espermática, quando comparados com os protocolos de refrigeração semi-rápida ou rápida sobre a integridade mitocondrial, membrana plasmática e membrana acrossomal (Pereira *et al.*, 2010).

O diluente Botubov[®] (Biotech, Botucatu, São Paulo, Brasil) é um produto que possui em sua composição uma mistura de carboidratos, aminoácidos, tampão, gema de ovo, água destilada e glicerol. Botubov[®] mostra-se mais efetivo para a criopreservação do sêmen bovino, quanto à motilidade espermática e quanto à integridade de membrana, quando comparado com outro diluente comercial, Bioxcell[®] (Carvalho *et al.*, 2008; Celeghini, 2005). Também, amostras espermáticas diluídas com Botubov[®] apresentaram maior viabilidade, quando comparadas ao mesmo diluente (Crespilho *et al.*, 2006). Botubov[®] ainda apresentou amostras com menor subpopulação de espermatozoides bovinos hiperativos e com membranas plasmáticas desestabilizadas, quando comparados com diluentes à base de lecitina de soja (Zaffalon, 2009).

Test Yolk Buffer (Irvine Scientific, Santa Ana, Califórnia, USA) é um meio comercial para congelação de sêmen composto por glicerol, gema de ovo e gentamicina. Sêmen bovino diluído em TYB[®], resfriado lentamente e armazenado por até 48 horas obteve resultados superiores de capacitação espermática das 4 às 48 horas de armazenamento e mostrou-se eficaz para o resfriamento (Ijaz e Hunter, 1989).

2.6 Descongelação

Com a utilização do sêmen criopreservado, a fase de descongelamento é tão importante para a sobrevivência dos espermatozoides quanto o processo de congelamento, pois os espermatozoides que sobreviveram à temperatura de -196°C são submetidos ao aquecimento e atravessam novamente a zona crítica de -60°C à -15°C (Salamon e Maxwell, 2000).

A avaliação da qualidade do sêmen pós-descongelação tem o objetivo de prever seu potencial fecundante (Lima, 2008). Um método simples e comumente utilizado para o descongelamento de sêmen é realizado a partir da utilização de água em banho-maria na temperatura de 37°C, de 20 a 30 segundos (Çoyan *et al.*, 2011; Moustacas *et al.*, 2011).

O descongelamento de amostras em altas temperaturas (60-75°C) apresentou resultados semelhantes ao descongelamento à 38-42°C, quanto à motilidade, integridade de acrossoma e fertilidade dos espermatozoides (Salamon e Maxwell, 2000). Porém, o

descongelamento do sêmen à 37°C, é mais adequado em condições práticas, por excluir o risco de superaquecimento (Leboeuf *et al.*, 2000).

Sendo assim, a partir do descongelamento das amostras espermáticas, torna-se possível realizar a avaliação das características espermáticas, tais como, motilidade, viabilidade, potencial de membrana mitocondrial, morfologia, incluindo todas as modificações ultraestruturais e bioquímicas dos espermatozoides, a fim de analisar os graus variáveis de sucesso da congelação relacionados à fertilidade. Nenhum teste de forma isolada é confiável, mas a partir da combinação de vários testes dos parâmetros espermáticos, é possível estimar com maior acuidade o potencial fecundante do sêmen descongelado.

2.7 Inseminação artificial

Na aplicação de programas de melhoramento animal, a IA é uma ferramenta de biotecnologia da reprodução que propicia maior amplitude de resultados. A adequada seleção dos atributos produtivos e reprodutivos de machos e fêmeas é a base essencial para a maximização do potencial dessa técnica como ferramenta de melhoramento. No entanto, além dessa característica primordial, a IA intensifica o manejo reprodutivo (Bicudo *et al.*, 2000), principalmente quando aliada ao uso da criopreservação do sêmen.

2.7.1 Inseminação artificial com sêmen refrigerado

O sêmen de carneiros, assim como nas demais espécies, pode ser utilizado para a inseminação artificial, de forma fresca, forma refrigerada ou forma congelada (Rojero *et al.*, 2009). As técnicas para a inseminação artificial pode incluir a deposição do sêmen no canal vaginal, transcervical ou intrauterina.

A IA mais utilizada em ovinos é a vaginal ou a transcervical. Há resultados satisfatórios quando esta é aliada à utilização de sêmen fresco ou refrigerado à 15°C; porém, é necessário considerar o curto prazo de armazenamento, e também, a necessidade de utilizar uma alta concentração de espermatozoides por dose (Anel *et al.*,

2006). Por outro lado, a utilização de sêmen fresco ou refrigerado reduz o potencial reprodutor do carneiro, pela necessidade de utilização de uma dose elevada de sêmen, devido à estrutura cervical da ovelha e devido à carencia de maior organização no manejo reprodutivo das propriedades.

Em situações peculiares, o uso de sêmen refrigerado à 5°C pode ser utilizado até três dias após a colheita e processamento; porém, a taxa de gestação é reduzida consideravelmente com o passar do tempo (O'Hara *et al.*, 2010). Também, foram verificados valores aceitáveis na taxa de gestação, quando foi utilizada inseminação artificial cervical (43,7%) com sêmen armazenado por 12 horas à temperatura de 5°C; porém, os valores foram bem superiores (75,0%), quando foi utilizada inseminação artificial intrauterina através de laparoscopia (Rojero *et al.*, 2009).

Utilizando microscopia confocal *in situ* para analisar o trânsito espermático no trato genital feminino, após inseminação artificial com sêmen refrigerado à 15°C por 24 horas, observou-se que a proporção de espermatozoides móveis com deslocamento linear e sua migração da cérvix em direção à tuba uterina foi afetada pela refrigeração e armazenamento do sêmen (Druart *et al.*, 2009).

Com isso, mostra-se a necessidade de estudos a fim de melhorar as técnicas de refrigeração do sêmen em conjunto com a inseminação artificial cervical, objetivando o aumento de tempo de armazenamento, aumento de células viáveis e, em consequência, o aumento da fertilidade para a melhora nos índices zootécnicos.

2.7.2 Inseminação artificial com sêmen congelado

Apesar de encontrar no mercado equipamentos modernos para criopreservação de sêmen, a IA com sêmen congelado só apresenta resultados satisfatórios de fertilização quando o sêmen é depositado diretamente no útero por laparoscopia (Lima *et al.*, 2010). São vários os fatores que afetam a sobrevivência do espermatozoide ovino criopreservado como: diluente, concentração do crioprotetor, embalagem para o envasamento do sêmen, velocidade de congelação e descongelação, e qualidade do sêmen destinado ao processo de criopreservação (Salamon e Maxwell, 2000).

As características morfológicas da cérvix da ovelha, a qual possui cinco tipos de orifícios externos, anéis com diâmetro pequeno, formato de funil e presença de fundos de saco entre os anéis, são fatores que impossibilitam a transposição da cérvix com os aplicadores de inseminação convencionais (Cruz Júnior, 2006). A cérvix constitui a primeira barreira no trânsito espermático, e ainda, se apresenta como um fator limitante na migração dos espermatozoides da vagina até o útero (Druart *et al.*, 2009).

Quando se utiliza a criopreservação associada à sincronização de estro em ovelhas, é necessário ultrapassar a cérvix e depositar o sêmen em região profunda do útero, para alcançar taxas satisfatórias de gestação (Anel *et al.*, 2006). Mas de qualquer forma, devido aos baixos índices de gestação por este meio, a IA por laparoscopia e com a utilização de sêmen congelado, é a única técnica que realmente resulta em índices satisfatórios de gestação, porém, possui limitação devido à sua complexidade, custo elevado, necessidade de técnicos treinados para empregar a técnica, e também, gera problemas relacionados com o bem-estar animal. Sendo assim, a inseminação laparoscópica deve ser utilizada até que as limitações da inseminação transcervical sejam contornadas.

2.8 Métodos de avaliação espermática

As avaliações da qualidade do sêmen após a refrigeração ou após a descongelação têm objetivo de prever o seu potencial fecundante. A análise das taxas de gestação *in vivo* é a forma mais fidedigna de avaliar a capacidade fecundante do sêmen, através da IA. Porém, o tempo necessário para essa avaliação e seus custos limita sua aplicação como rotina.

Usualmente, a avaliação espermática inclui estimativas de volume, concentração, motilidade e morfologia. Atualmente, avaliações que detalham a função do espermatozoide têm sido introduzidas, buscando prever o potencial de fecundação, e em longo prazo revelar a fertilidade do macho, a partir das amostras de sêmen coletadas (Rodriguez-Martinez, 2006).

Entretanto, várias características como motilidade, viabilidade e modificações estruturais ou bioquímicas dos espermatozoides são relacionadas à fertilidade com graus

variáveis de sucesso. Testes isolados não são confiáveis, mas a partir da combinação de vários deles, é possível estimar o potencial dos espermatozoides. Os testes de avaliação de motilidade e viabilidade são alguns dos mais utilizados (Seager e Fletcher, 1972; Evans e Maxwell, 1987; Arruda *et al.*, 2005; Crespilho *et al.*, 2006).

2.8.1 Motilidade espermática

A motilidade é um dos testes realizados de forma mais rotineira, para avaliar a viabilidade dos espermatozoides. Para o sêmen ovino congelado, uma amostra é considerada dentro do padrão quando apresentar motilidade progressiva igual ou superior à 30% (CBRA, 1998).

A motilidade é a característica mais frequentemente avaliada, embora sua correlação com a fertilidade seja controversa. A análise computadorizada da motilidade (CASA - computer assisted semen analysis) vem ganhando popularidade devido a sua objetividade, porém, é utilizada, principalmente em pesquisas, devido ao alto custo do equipamento. E, embora seja fácil a criação de uma grande quantidade de dados usando o CASA (Rathi *et al.*, 2001), ainda não está bem claro quais das características de motilidade mensuradas são de importância fisiológica (Katila, 2001).

O espermatozoide necessita da motilidade para a penetração na junção útero-tubárica, liberação dos sítios de armazenamento espermático na tuba uterina e penetração através de células que circundam o oócito (Amann, 1989; Magistrini, 2000; Neild, 2005). A motilidade espermática pode estar comprometida se as mitocôndrias estiverem danificadas, se a membrana plasmática estiver lesada, se o espermatozoide tiver sofrido choque térmico ou se estiver morfológicamente anormal (Kirk, 2001; Neild, 2005).

Utilizando microscopia óptica convencional, normalmente os valores são expressos em porcentagem. Uma gota de sêmen diluído entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas e mantidas à 37°C, é avaliada por um examinador. O método é simples e de baixo custo, no entanto, apresenta algumas desvantagens como o fato da estimativa variar entre examinadores, a concentração espermática prejudicar esta

estimativa e as porcentagens de células móveis diminuírem em função da temperatura do ambiente (Malmgre, 1997).

2.8.2 Viabilidade

A integridade da membrana plasmática do espermatozoide é um requisito fundamental para a sua viabilidade e, conseqüentemente, é uma predição do seu potencial de fecundação. Anteriormente, a viabilidade espermática era avaliada por meio de colorações supravitais, as quais consistem exclusivamente de eosina, ou esta combinada com nigrosina. Todavia, estas colorações não são apropriadas para avaliações de amostras de sêmen criopreservado, devido à presença do crioprotetor glicerol, o qual interfere na coloração (Garner *et al.*, 1986).

Existem muitas técnicas para a avaliação da integridade da membrana plasmática, utilizando sondas fluorescentes lipossolúveis ou não lipossolúveis à membrana, que detectam assim as membranas íntegras e danificadas. A combinação das sondas fluorescentes com microscopia de fluorescência ou com citometria de fluxo tem provado ser uma avaliação mais objetiva e acurada (Harrison e Vickers, 1990; Garner *et al.*, 1997). O maior benefício da utilização destas sondas fluorescentes é o maior contraste para a observação das células, a menor variabilidade entre as amostras e a maior especificidade para se obter resultados mais confiáveis, quando comparadas às colorações clássicas (Neild, 2005).

A avaliação espermática realizada mediante microscopia óptica tem como inconveniente o fato das contagens serem limitadas a um número reduzido de espermatozoides e a uma manipulação maior do sêmen (Silva *et al.*, 2006). A principal vantagem da citometria de fluxo é a possibilidade de analisar células espermáticas vivas em suspensão em um período de tempo muito curto (Orfao e Buitrago, 1995), a partir de corantes fluorescentes, que marcam estruturas específicas das células e detectam integridade estrutural ou funcionalidade de forma objetiva e reprodutível (Celeghini, 2005). A única desvantagem da citometria de fluxo é que os espermatozoides são classificados quanto ao status acrossômico em apenas duas categorias, reagidos ou intactos, e os estágios intermediários não podem ser diferenciados como na microscopia de fluorescência (Rathi *et al.*, 2001; García-Macías *et al.*, 2006).

O diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), o SYBR-14[®], o iodeto de propídio (IP) e o Hoechst 33258 são alguns dos corantes utilizados para detectar a integridade de membrana celular (Garner *et al.*, 1986; Harrison e Vickers, 1990; Smith e Murray, 1997; Petrunkina *et al.*, 2010).

O CFDA é um composto hidrofóbico capaz de penetrar na membrana celular sem interferência fisiológica. No interior da célula, o diacetato de carboxifluoresceína é hidrolisado por uma interação enzimática e permite que suas esterases o convertam num composto hidrofílico fluorescente, nomeado carboxifluoresceína, o qual não é penetrante à membrana plasmática, se acumula no interior da célula, e torna os compartimentos com membrana íntegra verde fluorescente (Figura 4), quando excitados com luz azul fluorescente (Jones e Seneft, 1985; Harrison e Vickers, 1990; Garner e Johnson, 1995; Graham e Mocé, 2005).

As lectinas mais comumente utilizadas são a aglutinina de *Pisum sativum* (PSA) ou a aglutinina de *Arachis hypogaea* (PNA). A coloração com FITC-PNA tem sido utilizada com sucesso em espermatozoides de humanos, macacos, suínos, caprinos (Cross e Meizel, 1989) e equinos (Casey *et al.*, 1993). O monitoramento do status acrossômico utilizando PSA foi confirmado por microscopia eletrônica (Casey *et al.*, 1993 e Meyers *et al.*, 1995); no entanto, possui a desvantagem de se ligar em resíduos de açúcar da zona pelúcida (Skutelsy *et al.*, 1994).

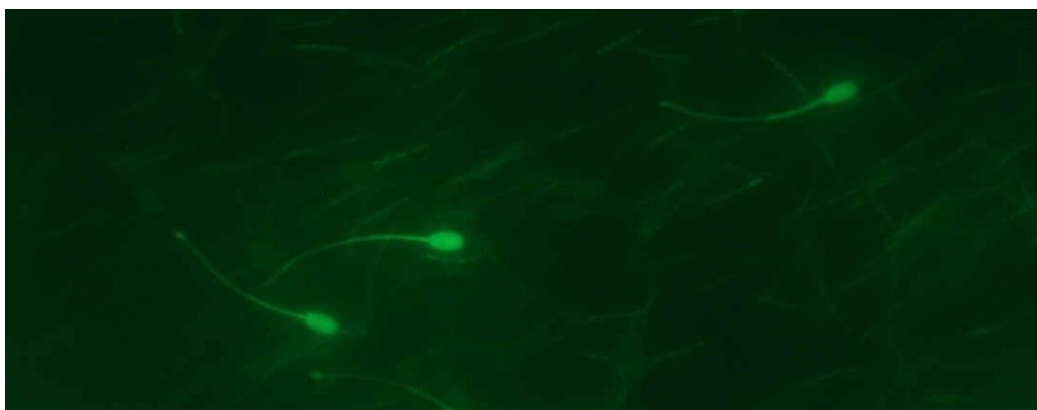


Fig.4. Microscopia fluorescente de espermatozoide ovino viável, corado com CFDA (Baggio, 2011, dados não publicados).

A coloração com FITC-PNA é utilizada em preparações que realizam a prévia permeabilização da membrana plasmática, através do uso de substâncias como o metanol ou o etanol. Dessa forma, a sonda tem acesso a toda superfície da membrana acrossômica, e apresenta fluorescência em todas as células não reagidas, visto que não existe a barreira da membrana plasmática. Diversos padrões de fluorescência representam a fusão parcial da membrana plasmática com a membrana acrossômica externa, característica de células que estão sofrendo a reação acrossômica. A completa fusão da membrana plasmática com a membrana acrossômica externa, indica o fim do processo de reação acrossômica, e resulta na perda da membrana acrossômica e, conseqüentemente, não haverá a fluorescência do espermatozoide (Cheng *et al.*, 1996; Blottner, 1998).

Os corantes fluorescentes com afinidade por DNA são corantes que não são lipossolúveis à membrana plasmática, realizando a penetração nas células somente através de membranas danificadas, e assim, se ligam e coram o DNA. Fazem parte deste grupo o brometo de etídeo, IP, hidroetidine, entre outros (Zúccari, 1998). Em solução salina, tais substâncias coram as células mortas, promovendo fluorescência vermelho-brilhante (Jones e Seneft, 1985; Harrison e Vickers, 1990).

Alguns *kits* de viabilidade espermática (Live/Dead) associam dois corantes fluorescentes e são utilizados tanto para a microscopia fluorescente, quanto para a citometria de fluxo (Figura 5). Esses *kits* permitem analisar, ao mesmo tempo, tanto a viabilidade quanto a morte espermática. O SYBR-14[®] em combinação com o IP é útil ao se estimar proporções de células vivas e de células mortas (Garner e Johnson, 1994). O SYBR-14[®] é um corante lipossolúvel à membrana plasmática do espermatozoide, se liga à fita dupla de DNA das células vivas, e emite luz verde fluorescente (Garner e Johnson, 1995) em um comprimento de onda de 525nm. Por outro lado, o IP não é lipossolúvel à membrana, e então, marca o DNA das células espermáticas comprometidas, emitindo luz vermelha, com fluorescência em um comprimento de onda de 620nm (Figura 6).

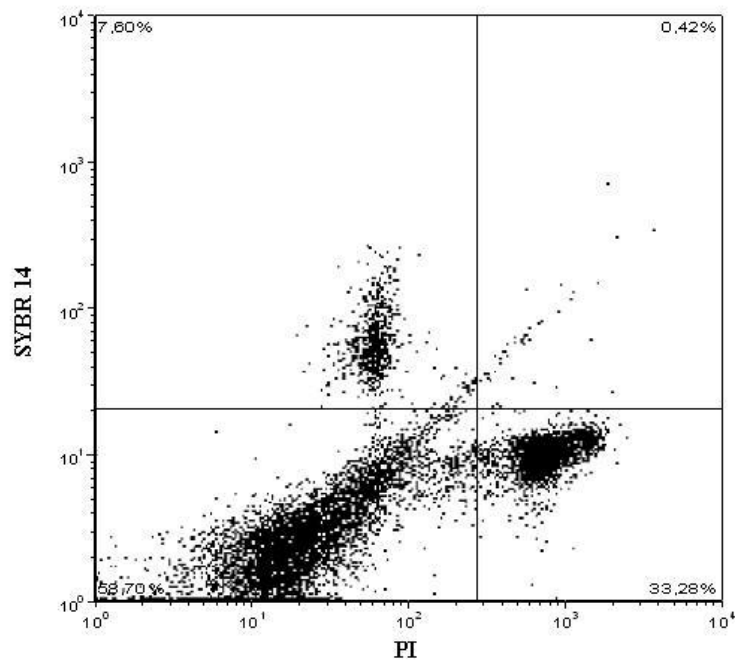


Fig. 5. Viabilidade de sêmen ovino corado com *kit* de viabilidade Live/Dead e analisado por citometria de fluxo (Baggio, 2011, dados não publicados).

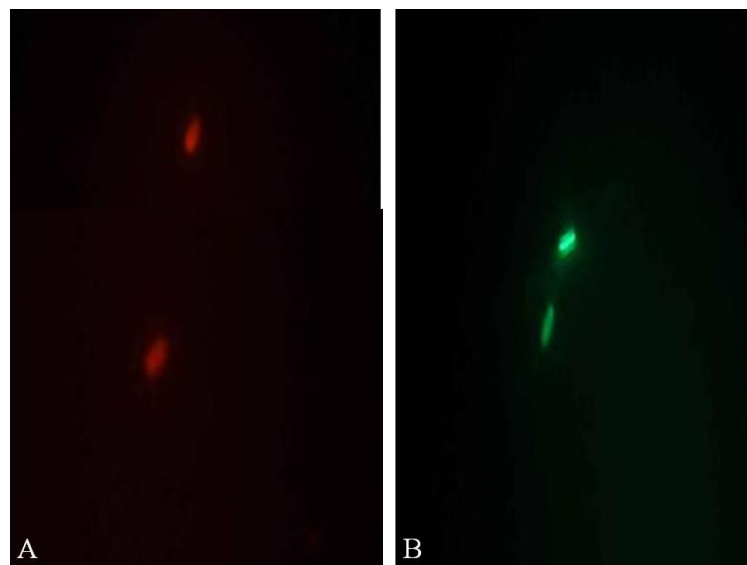


Fig. 6. Microscopia de fluorescência para análise da viabilidade espermática. A. espermatozoides ovinos corados com IP (12uM). B. espermatozoides ovinos corados com SYBR-14[®] (100nM) (Baggio, 2011, dados não publicados).

2.8.3 Potencial de membrana mitocondrial

A síntese de ATP mitocondrial é controlada pelo potencial de membrana mitocondrial interno, o qual é gerado pela cadeia respiratória. A capacidade para monitorar mudanças no potencial de membrana em mitocôndrias *in situ*, dentro de células, pode ser crucial para a interpretação de mudanças na fisiologia celular em várias situações experimentais (Duchen *et al.*, 2003).

Nas células espermáticas, as mitocôndrias estão dispostas de forma helicoidal na peça intermediária, e o ATP produzido serve como suplemento energético para os batimentos flagelares. Para tal, é indispensável que haja produção de ATP pelas mitocôndrias para haver a motilidade espermática (Cosson, 1996).

Muitos indicadores para o monitoramento do potencial de membrana mitocondrial têm sido discutidos usando sondas fluorescentes. Os componentes, com sensibilidade ao potencial de membrana mitocondrial, mais comum, são as rodaminas e as carbocianinas. O sucesso para o uso dessas sondas em células vivas é baseado no fato de não causarem toxicidade (Reers *et al.*, 1991).

Mitocôndrias espermáticas funcionais podem ser detectadas com a utilização de Rodamina 123 (R123), através de avaliações por citometria de fluxo (Graham *et al.*, 1990). No entanto, esta não possui a capacidade de diferenciar as mitocôndrias com alto potencial e baixo potencial (Salvioli *et al.*, 1997).

A sonda fluorescente MITO tem sido utilizada em espermatozoides humanos, para visualizar displasias de bainha mitocondrial (Rawe *et al.*, 2011), e também, em espermatozoides bovinos, para verificar os efeitos da criopreservação (Garner *et al.*, 1997). Esta sonda parece acumular-se preferencialmente na mitocôndria, indiferente do potencial de membrana mitocondrial, tornando-o um instrumento para a determinação da massa mitocondrial (Haugland, 2001).

Um tipo especial de multímeros de carbocianinas, que foi identificado primeiramente por Jelley (1937) e, por isso, chamado J-agregados (3,3''-dipentilthiodicarbocianina), tem sido explorado para visualizar mitocôndrias em uma variedade de células, sendo o mais utilizado, o corante identificado como o iodeto de

5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina, conhecido como JC-1 (Reers *et al.*, 1991).

O JC-1 identifica populações de mitocôndrias com diferentes potenciais de membrana através de uma variação de cores deste corante (Figura 7). Sua cor é alterada do verde para o laranja ou vermelho, e isso determina o aumento do potencial de membrana mitocondrial (Reers *et al.*, 1991; Cossarizza *et al.*, 1993). Sendo assim, a fluorescência verde do JC-1 refere um baixo potencial de membrana mitocondrial, e isto ocorre, devido à formação de monômeros, que apresentam excitação e emissão máximas de 510 e de 527 nm, respectivamente. Por outro lado, a fluorescência vermelha, indica alto potencial de membrana mitocondrial, devido à formação de J-agregados, com excitação e emissão máximas de 485 e de 585 nm, respectivamente (Figura 8) (Haugland, 2001).

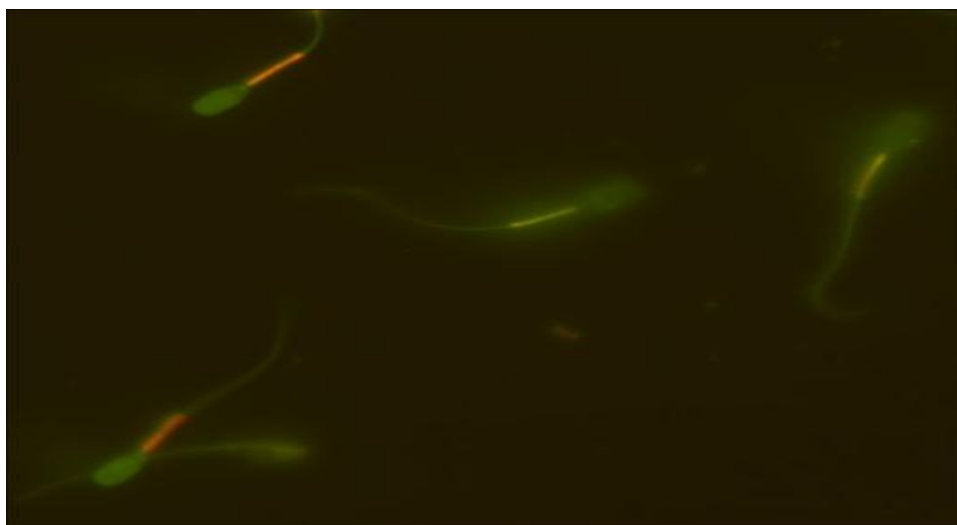


Fig. 7. Microscopia fluorescente de espermatozoide caprino corado com JC-1. Alto potencial de membrana mitocondrial é representado por peça intermediária vermelha fluorescente (Guthrie e Welch, 2008).

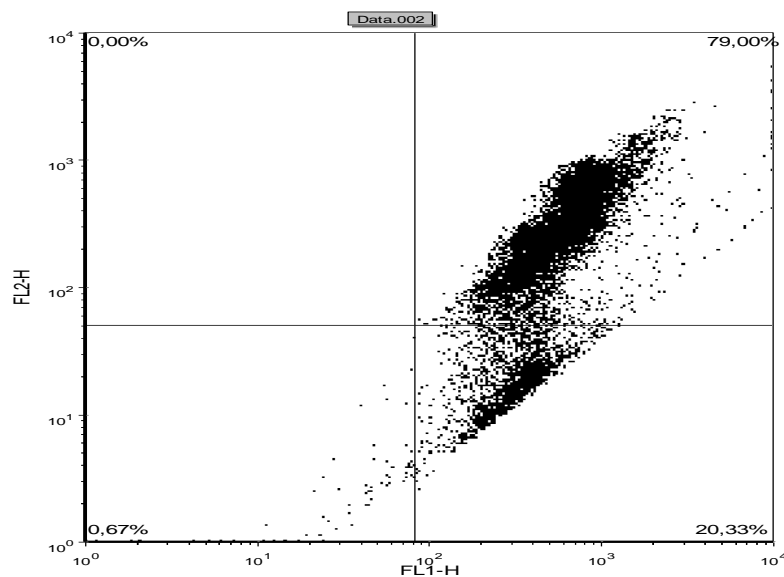


Fig. 8. Potencial de membrana mitocondrial de sêmen ovino diluído com Bovimix[®] analisado com JC-1 e avaliado por citometria de fluxo (Baggio, 2011, dados não publicados).

A sonda fluorescente JC-1, também vem sendo utilizada como um suporte no diagnóstico de infertilidade humana, identificando espermatozoides com baixo potencial de membrana mitocondrial (Troiano *et al.*, 1998). Também pode detectar, acuradamente, mudanças no potencial de membrana de espermatozoides equinos (Gravance *et al.*, 2000), murinos (Gravance *et al.*, 2001) e ovinos (Kasimanickam *et al.*, 2011). Ainda vem sendo utilizada para avaliar os defeitos da criopresevação (Garner *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1998; Garner *et al.*, 2001) e da adição do glicerol sobre o potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides bovinos (Garner *et al.*, 1999) e os efeitos da refrigeração sob membrana mitocondrial de espermatozoides ovinos (Kasimanickam *et al.*, 2011).

2.8.4 Defeito acrossomal

A morfologia espermática, principalmente, a porcentagem de acrossomas intactos, é um importante indicador de fertilidade (Freneau *et al.*, 2000; Saacke *et al.*, 2000; Ostermeier *et al.*, 2001). Porém, há poucos estudos representativos em nível de rebanhos sobre morfologia espermática e sua relação com fertilidade (Foote, 2003).

Inicialmente, as anormalidades espermáticas foram classificadas em primárias, secundárias e terciárias. As primárias foram relacionadas aos defeitos que se originavam no epitélio seminífero durante a espermatogênese. As secundárias, relacionadas aos defeitos que se originavam distalmente ao epitélio seminífero, nas vias intra e extratesticulares, durante o armazenamento e a ejaculação. E as terciárias, aquelas anormalidades originadas devido à manipulação dos espermatozoides após a ejaculação (Lagerlof, 1934).

Posteriormente, a fim de associar a classificação ao grau de importância do defeito para a fertilidade, os defeitos foram classificados em maiores e menores, dependendo da relevância para a fertilidade. Os defeitos maiores constituem de qualquer anormalidade que esteja relacionada com infertilidade ou com a condição patológica do testículo ou do epidídimo, incluindo os defeitos acrossomais. Já os defeitos menores dos espermatozoides, também podem causar infertilidade, no entanto, podem proporcionar fertilização. Em todos os sistemas de classificação, os valores devem ser expressos em porcentagem (Blom, 1973).

As análises de morfologia e de integridade acrossomal podem ser realizadas por microscopia de contraste de fase, ou também, a partir de colorações visualizadas em microscopia comum ou em microscopia de fluorescência. Entretanto, os métodos de coloração empregando corantes fluorescentes (sondas fluorescentes ou fluorocromos), aumentam a possibilidade de uma análise mais criteriosa da integridade estrutural dos espermatozoides (Arruda *et al.*, 2007). As sondas fluorescentes vêm sendo utilizadas isoladamente, ou em combinação, para determinar a integridade e a função celular (Arruda, 2011). E, embora o uso de sondas fluorescentes por meio de microscopia venha sendo um método para avaliação morfológica espermática, o número de espermatozoides examinados por análise, normalmente, não excede 200 (Arruda *et al.*, 2007).

Com o propósito de obter técnicas que demonstre maior reprodutibilidade tanto para avaliar a morfologia quanto a função espermática, diversos sistemas que utilizam a análise computadorizada de imagens têm sido desenvolvidos e empregados nos últimos anos (Arruda, 2000; Celeghini, 2005; Matos *et al.*, 2008; Celeghini *et al.*, 2010). Os programas computadorizados para a avaliação espermática procuram ser mais objetivos, e imprimir maior reprodutibilidade às avaliações do que a habilidade humana em

identificar padrões de motilidade, ou de normalidade espermáticas (Arruda, 2000; Arruda *et al.*, 2002; Matos *et al.*, 2008).

Por outro lado, para que a inseminação artificial possa apresentar melhores resultados, é necessário um estudo mais amplo sobre os vários aspectos relacionados à fisiologia da célula espermática e à melhoria dos testes aplicados, para analisar a viabilidade dos espermatozoides submetidos à refrigeração e à congelação/descongelação, uma vez que, os danos ocasionados pela criopreservação causam prejuízos nas funções celulares, e resultam na redução da fertilidade. Para tal, técnicas de marcações específicas, e mais sensíveis para os diversos compartimentos e funções do espermatozoide, também têm sido desenvolvidas para auxiliar na melhor avaliação da integridade espermática (Andrade *et al.*, 2007; Celeghini *et al.*, 2007; Celeghini *et al.*, 2010).

3 ARTIGO

Artigo nas normas editoriais para publicação na revista eletrônica *Theriogenology*.

1 Effect of different preservation protocols on ram sperm motility, viability,
2 mitochondrial membrane potential and defected acrosome
3 M. Baggio^{abe}, S. Terra^c, C.C.F.C Laurino^b, E. Oberst^{ad}, F.Guma^c, E. Cirne Lima^{ab}

4

5 **Abstract**

6 The process of sperm cryopreservation damages spermatozoa due to induction of
7 structural and functional changes in the membrane, and allied to the ewe cervix
8 anatomy, reflects the reduction in fertility after artificial insemination. Many semen
9 preservation protocols including freezing and cooling rates coupled with different
10 extenders have been studied in order to reduce sperm cryo-damage, increase the
11 fertilizing capacity and increase the time of storage. To improve freezing and cooling
12 processes, the objectives of this study were to determine (1) the influence of freezing
13 method on sperm motility, viability, mitochondrial membrane potential and defected
14 acrosome of cryopreserved sperm and (2) the influence of three commercial extenders
15 on the motility, viability, mitochondrial membrane potential and defected acrosome of
16 liquid stored and frozen/thawed sperm. Ten semen samples were collected from two
17 mature rams (five collections per ram). In the first experiment, ram semen samples were
18 diluted in three commercial extenders and cryopreserved by (A) a manual
19 cryopreservation curve and (B) an automatic and programmable freezer. In the second
20 experiment, ram semen samples were diluted in three commercial extenders, stored at
21 5°C and at 15°C and evaluated 0, 24, 48 and 72h post collection. For viability and
22 mitochondrial membrane potential (MMP) assessments, semen samples were stained
23 and analyzed by flow cytometry. Motility and defected acrosome assessments were
24 analyzed subjectively. Motility (29%), viability (18%) and MMP (26%) of spermatozoa
25 cryopreserved in Bovimix[®] coupled with curve B were significantly ($P<0.05$) different

1 between all other treatments. Bovimix[®] stored at 5°C and at 15°C yielded better
2 (P<0.05) MMP (44% and 51%, respectively) than Botubov[®] and TYB[®], and also
3 showed higher viability characteristics (P<0.05) at 5°C and at 15°C (60% and 53%,
4 respectively) 72h post collection. In conclusion, freezing/thawing and cooling protocols
5 used in those experiments reduced sperm motility, viability, MMP and increased
6 defected acrosome when compared to fresh semen, and freezing/thawing protocols
7 harmed more spermatozoa function than cooling protocols. Our results suggest that the
8 extender Bovimix[®] caused the least cellular injury than Botubov[®] and TYB[®] on
9 freezing and cooling protocols.

10 *Key words:* ram semen, extender, cryopreservation, cooling, viability

11

12 **1. Introduction**

13 The biotechniques connected to the mammalian reproduction have increased
14 over the years and Artificial Insemination (AI) is the most practiced biotechnology to
15 improve livestock quality and increase the rate of genetic progress. AI is an essential
16 and well-established facilitator of genetic improvement in some species. In sheep AI has
17 been problematic and limited because acceptable pregnancy rates have been associated
18 with fresh/cooled semen and cervical artificial insemination.

19 Freezing and thawing processes cause injury to sperm and they have generally
20 recorded low sperm quality and low fertility when compared to cooled semen [1]. The
21 spread of AI in the species and the realization of its full potential depend on the use of
22 frozen semen [2] and thus of the techniques available for obtaining an acceptable
23 fertility [3]. In sheep, particularly, fresh semen is used by superficial cervical and frozen
24 semen by intrauterine laparoscopy form [4-5-6]. The use of cooled semen allows
25 reproducers improvement, introduction of new lineages in herds with health security,

1 propounds lower cost by simplification of AI process, and ensures semen viability for
2 up three days of storage without diminishing its fertilizing capacity. In contrast, diluted
3 and cooled semen has a very short life, avoiding preservation over the years. During
4 liquid storage, sperm viability gradually decreases as much as the days of storage
5 increase [7]. Several extenders have been developed to preserve spermatozoa but none
6 is capable store the sperm for more than 2 or 3d without a drop of fertility [8]. However
7 the techniques have been developed and adapted with the aim of improving ram semen
8 preservation [9-10].

9 The use of frozen / thawed semen enables the preservation of genetic material,
10 facilitates samples transport, and it is also related to reproducers improvement.
11 However, the use of sheep frozen semen generally produces better results when applied
12 with laparoscopic artificial insemination, once the frozen semen was used with artificial
13 insemination, results in unsatisfactory gestation index [11] due to cryo-damage, that
14 results in reduction of viability and fertilizing ability, combined with the anatomical
15 structure of the ewe cervix, which hampers sperm transport [5-6-12-13-14] and it is
16 attributed to irreversible damage caused to the spermatozoa during the process [12-15]
17 and their ability to transverse the ewe cervical barrier and the reproductive tract to the
18 site of fertilization [16].

19 *In vitro* evaluations of sperm quality before cryopreservation, after thawing and
20 during liquid storage have the objective of predict its fertilizing capacity. The defects in
21 the sperm DNA, mitochondrial membrane potential and details sperm motility
22 parameters have been reported to be more meaningful, useful and predictable tools – not
23 only related to fertilization, but also to embryonic development, than other routine
24 semen evaluation parameter [17-18-19-20-21-22-23].

1 To improve freezing and cooling protocols of ram semen, increase sperm
2 viability and avoid cell damage, several studies have been developed. However, the
3 objectives of this study were to (1) evaluate two different freezing methods comparing a
4 conventional freezing on liquid nitrogen vapor to a programmable semen freezer
5 (Cryologic Freeze Control[®]), each one with a specific curve of decreasing temperature,
6 utilizing three commercial extenders (Botubov[®], Bovimix[®] and Test Yolk Buffer[®]) and
7 (2) examine the effect of cooling at 5°C and at 15°C, time of storage, and semen
8 extender on ram sperm motility, viability, mitochondrial membrane potential and
9 defected acrosome.

10

11 **2. Materials and Methods**

12

13 *2.1 Location*

14 This study was carried out in August and September at Federal University of Rio
15 Grande do Sul (UFRGS), in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, situated at
16 30°01'59" S latitude and 51°13'48" W longitude. The local average is 10 m above sea
17 level with humid subtropical climate. The average annual temperature is 20.2°C and
18 annual rainfall is 1300mm³. The local breeding season extends from March to June.
19 Sperm samples were collected at Laboratory of Artificial Insemination of the School of
20 Veterinary Medicine, the sperm analysis and preservation protocols were achieved at
21 Laboratory of Embryology and Cells Differentiation, Experimental Research Center of
22 Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA), and viability and mitochondrial
23 membrane potential were assessed at Biochemistry Department.

24

25 *2.2 Animals and sperm collection*

1 Semen was collected from two fertility proven and mature rams (50% Texel,
2 50% Corriedale) ranging from 3 to 4 years old, by artificial vagina in the winter.
3 Animals were kept afield, fed with concentrate and lucerne diet once a day, and water
4 *ad libitum*. Semen was collected weekly between 8 and 10 a.m. Five collections were
5 made from each male and after collection, each ejaculate was assessed for volume,
6 motility and wave motion. Sperm transportation was accomplished at 37°C. Sperm
7 concentration was determined with a Neubauer-counting chamber and the ejaculates
8 with a concentration scoring more than $2,5 \times 10^9$ /mL were included in these studies.

9

10 *2.3 Preparation and sperm extenders*

11 Ejaculates of each ram were pooled and diluted to a final concentration of 500 x
12 10^6 /mL in each sperm extender. Botubov[®] (Bitotech, Botucatu, Sao Paulo, Brazil) is a
13 bovine extender based in sugars, amino acids, buffer, egg yolk, distilled water and
14 glycerol. Bovimix[®] (Nutricell, Campinas, Sao Paulo, Brazil) is a ruminant extender,
15 tested mainly in bovines, composed by tris, citric acid, glucose, penicillin, streptomycin
16 and egg yolk. Test Yolk Buffer (Irvine, Santa Ana, California, USA), [®] is a freezing
17 medium used for human sperm cryoprotection and has satisfied results on *in vitro*
18 fertilization protocols, this extender is composed by 12% glycerol, 20% egg yolk and
19 $10 \mu\text{l}/\text{mL}$ gentamicin. After sperm dilution in Botubov[®] (BOT), Bovimix[®] (BOV) and/or
20 Test Yolk Buffer[®] (TYB), semen was packaged in 0,5mL plastic straws (Minitub,
21 Tiefenbach, Germany), sealed with polyvinyl chloride powder and prepared as a
22 described sperm preservation protocol.

23

24 *2.4 Experimental design and sperm preservation*

25

1 *2.4.1 Experiment 1: Effect of freezing method and semen extender on motility, viability,*
2 *mitochondrial membrane potential and defected acrosome of ram spermatozoa*

3 Immediately after fill the straws with diluted semen, samples were submitted to
4 two different freezing protocols. For the freezing curve A (A), semen samples were
5 placed on liquid nitrogen vapor for 10 min and then immersed into liquid nitrogen (-
6 196°C). For the freezing curve B (B), samples were placed in an automatic freezer
7 system (Freeze Control; CL-8800, Cryologic Freeze Control PTY. LTD; Australia). The
8 beginning temperature of programmable freezer was set at 20°C decreasing 2°C/min
9 until 5°C; at 5°C semen samples were held for 10 min; from 5°C to -5°C the ramp was
10 reduced to 1.5°C/min and was held for 5 min at -5°C; from -5°C to -30°C, the ramp was
11 increased to 6°C/min, and from -30°C to -40 a rate of 4°C/min was utilized. The
12 samples were then plunged into liquid nitrogen (-196°C) for storage. After 20 days,
13 samples from cryopreservation curves were thawed at 37°C for 20 sec before *in vitro*
14 analysis. Samples were immediately analyzed to measure motility, viability,
15 mitochondrial membrane potential and defected acrosome, and denominated BOT/A,
16 BOV/A, TYB/A, BOT/B, BOV/B, and TYB/B regarding extender and curve.

17

18 *2.4.2 Experiment 2: Influence of time of storage, temperature of storage and semen*
19 *extender on motility, viability, mitochondrial membrane potential and defected*
20 *acrosome of ram spermatozoa*

21 Pooled ram semen was diluted in the extenders BOT, BOV and TYB. Semen
22 samples were stored at 5°C and at 15°C. Motility, mitochondrial membrane potential
23 and defected acrosome were assessed each 0, 24, 48 and 72 h after semen collection and
24 during liquid storage.

25

1 2.5 Sperm evaluation

2

3 All sperm parameters were assessed after early dilution of fresh semen and after
4 freezing/thawing protocols. During liquid storage semen samples were analyzed at 0,
5 24, 48, 72 h post collection. Microscope based parameters were measured by the same
6 observer throughout the study.

7

8 2.5.1 Motility

9 Motility was assessed subjectively on a warm slide (37°C) and four fields were
10 evaluated on a microscope (Nikon Eclipse, TE-2000-U, Japan); 40x. Results were
11 determined in percentage.

12

13 2.5.2 Viability

14 Spermatozoa were stained as per the manufacturer's guidelines using Live/Dead
15 Sperm Viability Kit (Molecular Probes, Oregon, USA). Briefly, 10µL diluted sperm
16 (final concentration 1×10^6) was added in 1mL of warmed HEPES solution (10mM
17 HEPES, 150mM NaCl, 5% BSA). Then, 2µL SYBR 14 (final concentration 100nM) and
18 5µL Propidium Iodide (final concentration 12µM) were added. Samples were incubated
19 at 37°C for 15min. Later, samples were analyzed in a flow cytometry (FACScalibur
20 BD, Franklin Lakes, USA) with a 480nm argon laser and 15mW. Data corresponding to
21 the red (620nm band-pass filter) and green (525nm band-pass filter) fluorescence of
22 acquired particles were recorded. A maximum of 10,000 sperm events were
23 accumulated for each sample at a flow rate of 200events/s. Sperm DNA fragmentation
24 was qualified by the color shift from green (FL-1) to red (FL-3) fluorescence and
25 displayed as live versus dead, respectively. The results were stored as list mode files

1 and further analyses of the parameters were performed using De Novo Software
2 (version 4, Los Angeles, USA). Software calculated the percentage of live and dead
3 cells.

4

5 *2.5.3 Mitochondrial membrane potential*

6 A sample of 1 μ L diluted sperm was added in 1000 μ L of warmed PBS and 10 μ L
7 JC-1 (final concentration 2 μ M) was added. Samples were incubated at 37°C for 20min.
8 After incubation samples were centrifuged at 1500rpm for 5min and the resulted pellet
9 were resuspended in 500 μ L PBS. Mitochondrial membrane potential was assessed in a
10 flow cytometry (FACScalibur BD, Franklin Lakes, USA), utilizing an argon laser with
11 the excitation at a 488nm wave length. Sperm emitting green fluorescence (FL-1, JC-1,
12 monomers), with low membrane potential and sperm emitting orange/red fluorescence
13 (FL-2, JC-1 aggregates) with high membrane potential, were collected at the emission
14 wave length of 535nm and 595nm, respectively. A dot plot drawn against FL1 and FL2
15 was used to calculate MMP percentage with De Novo Software (version 4, Los
16 Angeles, USA).

17

18 *2.5.4 Defected acrosome*

19 An aliquot of 10 μ L treated semen was diluted in 500 μ L of warm solution 4%
20 formulated 2.94% sodium citrate, analyzed between a slide and coverslide. 100 cells
21 were counted on a phase contrast microscope (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Germany) and
22 the results were determined in percentage.

23

24 *2.6 Statistical analysis*

1 Freezing protocols were analyzed using a Generalized Linear Model (GLM) to
2 test the influence of multiple factors on target values, including extender type and
3 freezing method on sperm motility, viability, mitochondrial membrane potential and
4 defected acrosome parameters. Pairwise comparisons among the groups, adjusted for
5 multiple tests using the Bonferroni inequality, showed a significant difference ($P<0.05$).
6 The statistical analyses were performed using SPSS (SPSS Inc, Version 18.0, Chicago,
7 USA) for Windows (Microsoft, Redmond, USA). For cooling protocols the data are
8 descriptive.

9

10 **3. Results**

11

12 *3.1 Experiment 1*

13

14 Semen samples were analyzed before freezing protocols and fresh semen
15 showed 81.4% of motility. All the treatments with curve A obtained motility close to
16 zero. The group treated with extender Bovimix[®] and the freezing B showed 29% of
17 motility and it was significantly higher ($P<0.05$) than all other treatments (Fig. 1).

18 Fresh semen showed 66% of mitochondrial membrane potential (MMP). On
19 curve A, the extender BOV showed 22% of MMP and it was significantly higher
20 ($P<0.05$) than other curve A treatment. On curve B, the highest estimated MMP was
21 26% with extender BOV and it was significantly superior ($P<0.05$) between treatments
22 of curve A and curve B (Fig. 2).

23 Fresh semen showed 60% for viability parameters and the extenders BOT, BOV
24 and TYB showed the same viability on curve A. On curve B, viability was higher

1 (P<0.05) with extender BOV. In any case, the treatment BOV/B was significantly
2 higher than BOT/A, BOV/A, TYB/A, BOT/B and TYB/B (Fig. 3).

3 Defected acrosome showed 5% for fresh semen. On curve A, defected acrosome
4 ranged from 67 to 88.5% for all the treatments. On curve B, this variation was between
5 74 and 81%. Despite these results, TYB[®] showed superior (P<0.05) defected acrosome
6 values on curves A and B than other extenders (Table 1).

7

8 *3.2 Experiment 2*

9

10 There was a motility reduction during time of storage for all treated groups at
11 5°C. Bovimix[®] showed better results at 0, 24, 48 and 72h post collection among the
12 other treatments. At 15°C there was a motility reduction in the first 24h post collection
13 for all treatments. After that, motility remained stable in two of the treatments until 72h
14 post collection. Otherwise, semen samples treated with the extender Botubov[®] showed
15 50% of motility reduction in the last 24h post collection at 15°C (Fig. 4).

16 At 5°C and at 15°C there was a MMP reduction in all treated groups during time
17 of storage. Comparing all the treatments, semen samples diluted with the extender
18 Bovimix[®] showed better results at 5°C and at 15°C 72h post collection (Fig. 5).

19 It was observed a viability decreasing from 0 to 72 h post collection at 5°C and
20 at 15°C in all treated groups. Nevertheless, samples treated with extender Bovimix[®]
21 showed better values at 5°C and at 15°C 72h post collection when compared to other
22 treatments (Fig. 6).

23 For defected acrosome parameters, it was not observed differences between the
24 treatments overtime. Defected acrosome remained stable at 5°C and at 15°C from 0 to
25 72h post collection (Table 2).

1

2 **4. Discussion**

3

4 The obtained results for ram semen parameters after freezing/thawing protocols
5 indicated that only the treatment BOV/B showed motility rate acceptable, $29\% \pm 9$. Even
6 lower than the least motility rate (30%) required by Brazilian Animal Reproduction
7 Institute (CBRA), it is a subjective analysis and this result would be acceptable.

8 The superior results found with samples treated with Bovimix[®] should be
9 probably due to its composition (tris, citric acid, glucose, penicillin, streptomycin and
10 egg yolk). This extender has also conferred satisfied bull sperm motility with rapid (40-
11 88.8%), semi-rapid (43.3-82.5%), semi-slow (40-87.2%) and slow (36.7-88) cooling
12 before cryopreservation [24].

13 The semen samples diluted with the extender Botubov[®] showed motility rate
14 close to 0 after freezing on curve A and on curve B and showed inefficiency to preserve
15 ram sperm motility after cryopreservation. Celeghini *et al* [25] compared two
16 commercial extenders for bovine semen freezing, Botubov[®] and Bioxcell[®]. Botubov[®]
17 showed satisfactory motility rate for bovine semen after cryopreservation (40.1%), and
18 it showed better results than Bioxcell[®] (24.1%).

19 When sperm viability was analyzed by flow cytometer in this study, BOV/B
20 showed higher mean (18%) when compared to other treatments again, and showed
21 similar values to motility. It is known that freezing/thawing processes reduce
22 considerably this parameter, decreasing great number of viable cells. Goularte *et al* [26]
23 evaluated two extenders on ram semen freezing. The sperm viability extenders
24 composed by glycerol or by trealosis ranged by 13 and 14%, and sperm motility 19 and

1 22%, respectively. These results are lower than the results found on our experiments,
2 even for viability as for motility parameters.

3 The factor of glycerol contents in the extender also may affect the ram sperm
4 parameters. Most investigators found that the optimal glycerol concentration have been
5 within the range of 6–8%, and spermatozoa frozen rapidly by the pellet method have
6 survived better with 3–4% of glycerol concentration in the extenders [16]. Despite that,
7 the optimum glycerol concentration also depends of the extenders composition [27-28]
8 and it may be influenced by the egg yolk concentration used in the extender, as
9 increased concentrations of egg yolk may reduce the required concentration of glycerol
10 [29].

11 It was observed that elevated concentrations of egg yolk may reduce the required
12 concentration of glycerol [29]. Bernstein and Petropavlovsky [30] referred that solutions
13 containing 18% of glycerol had a toxic effect on ram spermatozoa. The extender TYB[®]
14 using in these experiments, contents 12% of glycerol, and this concentration could have
15 harmed the performance of ram semen freezing.

16 The extender Botubov[®] is also composed by glycerol but due to industry sigil,
17 there is not information about and its concentration. Otherwise, the extender which
18 obtained the best results on these experiments, Bovimix[®], does not contain glycerol in
19 the composition.

20 The cationic dye JC-1 (5',6',6'-tetrachloro-1,1',3',3'-
21 tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) exhibits potential-dependent
22 accumulation in mitochondria, indicated by a fluorescence emission shift from green
23 (~529nm) to red (~590nm). Consequently, mitochondrial depolarization is indicated by
24 a decrease in the red/green fluorescence ratio. And as it was verified on motility, higher
25 (P<0.05) MMP result was obtained with Bovimix[®] allied to curve B of

1 cryopreservation, it also indicated that extender and curve were more effective to
2 preserve mitochondrial function.

3 Maia *et al* [31] evaluated ram sperm viability after dilution with four
4 noncommercial extenders and cryopreservation. High mitochondrial membrane
5 potential ranged from 1.2 to 2.3% among the treated groups, and these results were
6 lower than the results found in our studies.

7 On this parameter, the extender TYB[®] harmed more mitochondrial function than
8 other extenders. However, semen samples cryopreserved with TYB[®] and curve B
9 reduced 50% when compared with curve A, and this finding was not observed in
10 samples cryopreserved with Bovimix[®] and Botubov[®]. The curve B had an initial
11 temperature decreasing 2°C/min and this fact probably caused spermatozoa damage
12 associated with the low protective action of this extender.

13 Authors have referred the ideal cryopreservation curves should reduce the
14 temperature at 5°C/min [14]. The reduction of temperature during cryopreservation
15 protocols is one of the most important steps on this process. It may avoid undesirable
16 variations and sperm alterations, on plasma membrane or on organelles, essentials to
17 sperm function [32].

18 Pereira *et al* [33] tested three different cooling rates before bovine semen
19 freezing, and all samples were diluted with Bovimix[®]. The results showed that the
20 protocols preserved bovine spermatozoa morphology after freezing. CBRA indicates
21 45% as the acceptable defected acrosome index regarding semen fertility. Data showed
22 on this study indicated that all treatments exceeded this index and did not show
23 satisfactory results for this parameter, but the samples treated with the extender TYB[®]
24 showed more acrosome defects than other extenders (P<0.05).

1 However, although the found results, sperm cryopreservation reduced motility,
2 damaged plasma and acrosomal membranes, as well as decreased mitochondrial
3 function. Despite this, the sperm cryopreservation seen on protocol with curve B of
4 freezing and extender Bovimix[®], is probably due to its efficiency to preserve cell
5 integrity.

6 Milczwski *et al* [14] found 42% on ram sperm progressive motility in samples
7 diluted with Tris-Yolk and stored at 5°C during 8h. However, the result obtained with
8 the extender Tris-Yolk (42.17%) was lower than the results obtained with Cornell
9 University Extender[®] (64.34%), Cornell University 16[®] (61.73%), glycine-yolk
10 (55.22%) and skim milk (67.72%). Considering only the commercial extenders, the
11 cooling protocol used in our experiment with Bovimix[®] showed 70% of motility 24h
12 post collection, obtaining higher results than Cornell University Extender[®] 8h post
13 collection.

14 O'Hara *et al* [34] evaluated three commercial extenders for ram semen cooling,
15 at 5 and 15°C. Ram semen diluted in AndroMed[®] showed better motility (3.2 – on a
16 scale from 0 to 5) and viability (62.7%) at 5°C than other treatments. Samples treated
17 with Bovimix[®] in our experiments, showed 55 and 60% of motility and viability,
18 respectively. Then, the values obtained on both studies were very similar after 72h post
19 collection.

20 Kasimanickam *et al* [35] showed 50% on mitochondrial membrane potential
21 with ram semen diluted in soy based extender during liquid storage at 4°C after 72h post
22 collection. In our experiments we obtained a similar result 51% of mitochondrial
23 membrane potential 72h post collection.

1 Motility, viability, MMP decreased during time of storage and the defected
2 acrosome increased during time of storage until 72h post collection. Bovimix[®] at 5 or at
3 15°C showed higher results for those parameters for ram spermatozoa preservation.
4 Overall, our results suggest that freezing/thawing impaired semen parameters and the
5 alterations of motility, viability, mitochondrial membrane potential and defected
6 acrosome induced by the cryopreservation protocols were not apparent at the cooling
7 protocols. This observation indicates that freezing/thawing damages spermatozoa
8 function and cooling is still the best system to preserve spermatozoa because it causes
9 less cell injuries and membrane damage. Besides that, Bovimix[®] caused the least
10 cellular injury than Botubov[®] and TYB[®] on freezing and on cooling protocols.

11

12

13

14

15

16

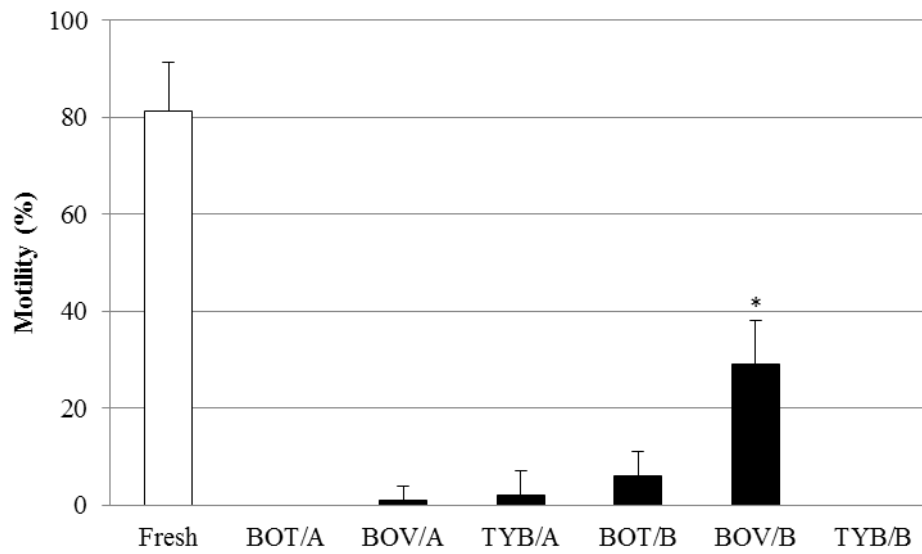
17

18

19

20

21



1

2

Fig. 1. Effect of storage extenders (BOT, BOV and TYB) and freezing curves (A/B) on the percentage of spermatozoa motility.

3

4

* $P < 0.05$

5

6

7

8

9

10

11

12

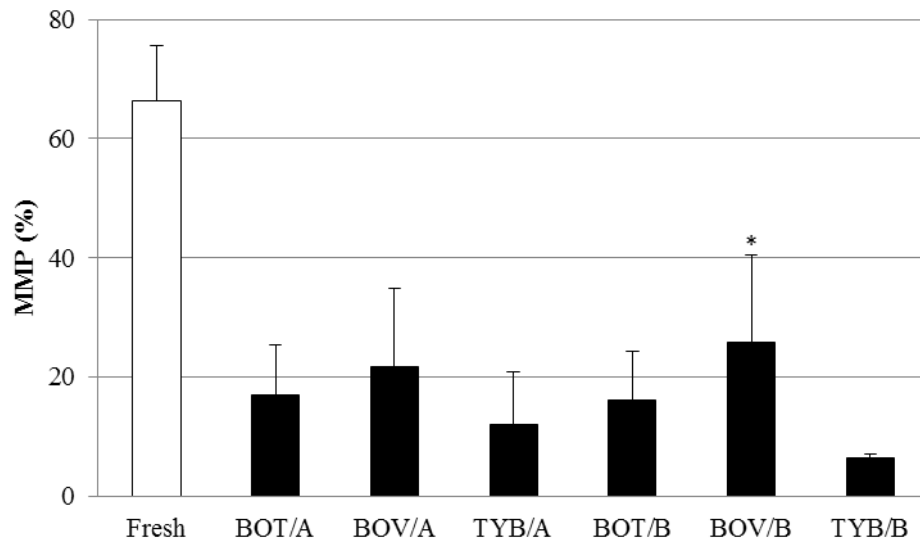
13

14

15

16

17



1

2

Fig. 2. Effect of storage extenders (BOT, BOV and TYB)

3

and freezing curves (A/B) on the percentage of spermatozoa

4

MMP (MMP).

5

*P<0.05

6

7

8

9

10

11

12

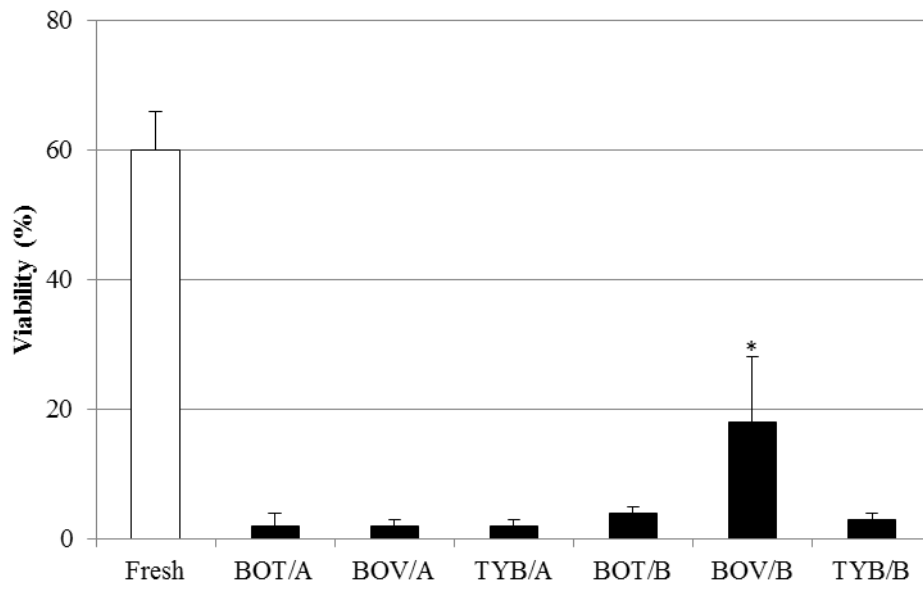
13

14

15

16

17



1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

Fig. 3. Effect of extenders (BOT, BOV and TYB) and freezing curves (A/B) on the percentage of spermatozoa viability after thawing.

*P<0.05

1 Table 1: Mean estimates of sperm defected
 2 acrosome after freezing/thawing (Experiment 1).

Extender	Freezing curve	Defected acrosome (%)
Fresh	-	5
Botubov [®]	A	67 ^a
Bovimix [®]	A	70 ^a
TYB [®]	A	88.5
Botubov [®]	B	75 ^b
Bovimix [®]	B	74 ^b
TYB [®]	B	81

3 ^aP<0.05 compared with extender TYB and curve A.

4 ^bP<0.05 compared with extender TYB and curve B.

5

6

7

8

9

10

11

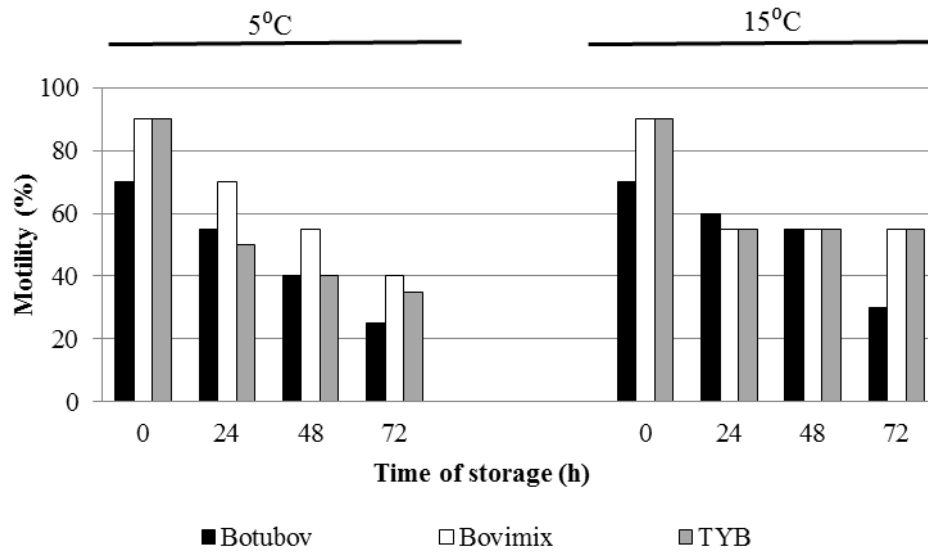
12

13

14

15

16



1

2 Fig. 4. Effect of different extenders (BOT, BOV and TYB),
3 temperature of storage (5°C and 15°C) and time of storage (0, 24,
4 48 and 72h) on spermatozoa motility.

5

6

7

8

9

10

11

12

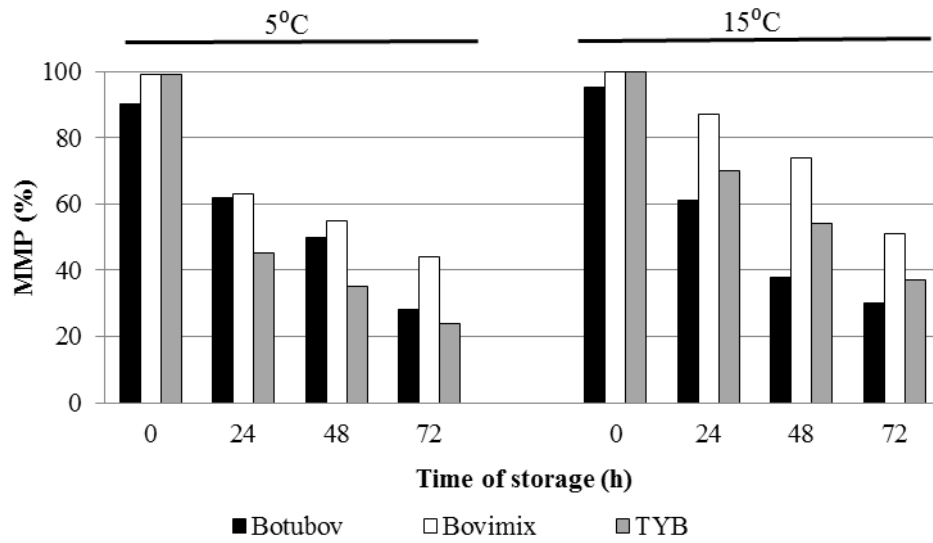
13

14

15

16

17



1

2

Fig. 5. Effect of extender,(BOT, BOV and TYB) temperature of storage (5°C and 15°C) and time of storage (0, 24, 18,72h) on spermatozoa mitochondrial membrane potential.

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

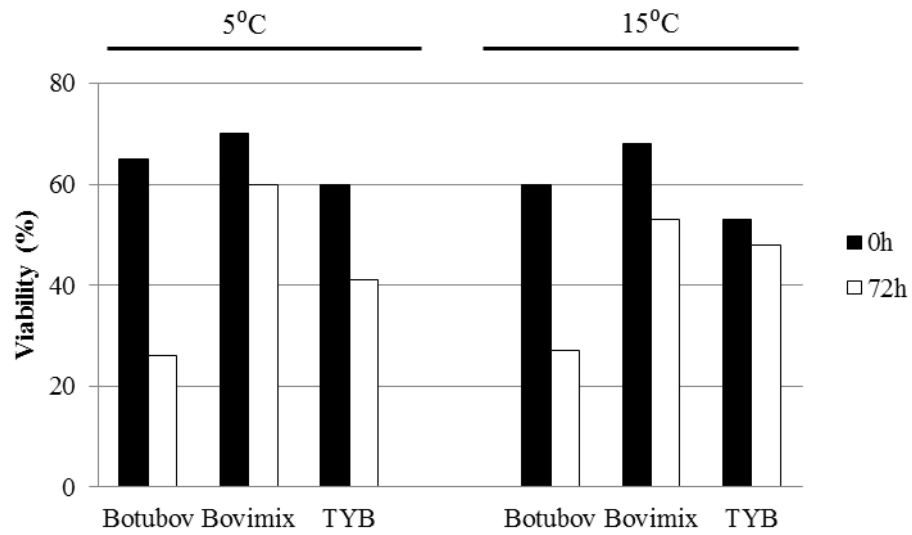
13

14

15

16

17



1
2 Fig. 6. Effect of extender, temperature of storage and
3 time of storage on semen viability.
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17

1 Table 2: Mean estimates of sperm defected acrosome after
 2 cooling (Experiment 2)

Temperature		Defected acrosome %			
Extender	°C	Storage (h)			
		0	24	48	72
Botubov [®]	5	7	6	7	5
Bovmix [®]	5	3	4	2	5
TYB [®]	5	5	6	4	4
Botubov [®]	15	1	2	3	7
Bovimix [®]	15	4	4	2	7
TYB [®]	15	7	6	7	8

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

1 5. References

2

3 [1] Maxwell WMC, Watson PF. Recent progress in the preservation of ram semen.

4 Anim Reprod Sci, v.42, p.55-65, 1996.

5

6 [2] Donovan A, Hanrahan JP, Lally T., Boland MP, Byrne GP, Duffy P, et al. AI for

7 sheep using frozen-thawed semen. End of Project Report: Sheep Series No. 11.

8 Teagasc, Agriculture and Food Development Authority, 2001.

9

10 [3] Papadopoulos S., Hanrahan J.P., Donovan A., Duffy P., Boland M.P., Lonergan P.

11 (2005). In vitro fertilization as a predictor of fertility from cervical insemination in

12 sheep. Theriogenology, v.63, p.150-159.

13

14 [4] Evans G. e Maxwell W.M.C. (1990). Inseminación Artificial de Ovejas y Cabras.

15 Zaragoza: Editorial Acribia, p.1-6, 19-32.

16

17 [5] Donovan A., Hanrahan J.P., Lally T., Boland M.P., Byrne G.P., Duffy P., et al.

18 (2001). AI for Sheep Using Frozen-Thawed Semen. End of Project Report: Sheep

19 Series No.11. Teagasc, Agriculture and Food Development Authority.

20

21 [6] Paulenz H., Adnoy T., Fossen O.H., Soderquist L., Berg K.A. (2002). Effect of

22 deposition site and sperm number on the fertility of sheep inseminated with liquid

23 semen. Veterinary Record, v.150, p.299-304.

24

- 1 [7] Maxwell WM, Salamon S. Liquid storage of ram semen: a review. *Reprod Fertil*
2 *Dev*, v.5, p.613-38, 1993.
- 3
- 4 [8] Vishwanath R, Shannon P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim*
5 *Reprod Sci*, v.62, p.23-53, 2000.
- 6
- 7 [9] Gil J, Lundehein N, Soderquist L, Rodriguez-Martinez H. Influence of extender,
8 temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen.
9 *Theriogenology*, v.59, p.1241-55, 2003.
- 10
- 11 [10] Matsuoka T, Imai H, Kohno H, Fukui Y. Effects of bovine serum albumin and
12 trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa. *J*
13 *Reprod Dev*, v.52, p.675-83, 2006.
- 14
- 15 [11] Fair S, Hanrahan JP, O'Meara CM, Duffi P, Rizos D, Wade M, et al. Differences
16 between Belclare and Suffolk ewes in fertilization rate, embryo quality, and accessory
17 sperm number after cervical or laparoscopic artificial insemination. *Theriogenology*,
18 v.63, p.1995-2005, 2005.
- 19
- 20 [12] Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen. 1. Processing, freezing,
21 thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci*, v.37, p.185-249,
22 1995.
- 23
- 24 [13] Lopez-Saez A., Ortiz N., Gallego L., Garde J.J. (2000). Liquid storage (5°C) of
25 ram semen in different diluents. *Arch. Androl.*, v.44, p.155-64.

1

2 [14] Milczewski V., Kozicki L.E., Neves J.P. (2000). Viability of ovine semen cooled in
3 different extenders. *Archives of Veterinary Science* v.5, p.29-33.

4

5 [15] Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a
6 damaging and capacitating phenomenon. *J Androl*, v.21, p.1-7, 2000.

7

8 [16] Salamon S, Maxwell WM. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.77-
9 111, 2000.

10

11 [17] Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility.
12 *Urology*, v.48, p.835-850, 1996.

13

14 [18] Farrel PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH. Quantification of bull sperm
15 characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the
16 relationship to fertility. *Theriogenology*, v.49, p.871-878, 1998.

17

18 [19] Shen HM, Chia SE, Ong CN. Evaluation of oxidative DNA damage in human
19 sperm and its association with male infertility. *J Androl*, v.20, p.718-723, 1999.

20

21 [20] Evenson DP, Larson KL, Jost LK (2002). Sperm chromatin structure assay: its
22 clinical use for defecting sperm DNA fragmentation in male fertility and comparisons
23 with other techniques. *J Androl*, v.23, p.25-43.

24

- 1 [21] Verstegen JP, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in
2 andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149-179, 2002.
3
- 4 [22] Walters AH, Eyestone WE, Saacke RG, Pearson RE, Gwazdauskas FC. Bovine
5 embryo development after IVF with spermatozoa having abnormal morphology.
6 *Theriogenology*, v.63, p.1925-1937, 2005.
7
- 8 [23] Kasimanickam R, Kasimanickam V, Pelzer KD, Dascanio JJ. Effect of breed and
9 sperm concentration on the changes in structural, functional and motility parameters of
10 ram-lamb spermatozoa during storage 4oC. *Anim Reprod Sci*, v.101, p.60-63, 2007.
11
- 12 [24] Carvalho FP, Silva JFS., Souza GV, Quirino CR, Carvalho CSP. Different
13 extenders on sperm motility and plasmatic membrane integrity after ovine semen
14 freezing and thawing. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, Salvador, v.9,
15 p.612-620, 2008.
16
- 17 [25] Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF, Rodrigues
18 PHM. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on
19 sperm membranes and chromatin. *Anim Reprod Sci*, v.104, p.119-131, 2008.
20
- 21 [26] Goularte et al., Avaliação *in vitro* da trealose como crioprotetor para sêmen ovino
22 congelado, 2008.
23
- 24 [27] Salamon S. Deep freezing of ram semen: recovery of spermatozoa after pelleting
25 and comparison with other methods. *Aust. J. Biol. Sci.* 21, 355–360, 1968.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

[28] Lightfoot RJ, Salamon S. Freezing of ram semen by the pellet method. II. The effect of method of dilution, dilution rate, glycerol concentration, and duration of storage at 58C prior to freezing on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* 22, 1547–1560, 1969.

[29] Watson PF, Martin ICA. Regions of the freezing curve causing changes in structure and viability of ram sperm. *Nature _Lond..* 251, 315–316, 1974.

[30] Bernstein, AD, Petropavlovsky VV. Effect of non-electrolytes on viability of spermatozoa. *Bjull.Eksp. Biol. Med.,* v.3 (1), 41-43, 1937.

[31] Maia M.S., Bicudo S.D., Azevedo H.C.A., Sousa D.B., Rodello L., Meira C. (2008). Efeito da adição de lauril sulfato de sódio (OEP) ao diluidor na viabilidade do sêmen congelado de ovinos Santa Inês. *Veterinária e Zootecnia, Botucatu,* v.15, p.521-530.

[32] Moore AI, et al. Effect of cooling rate in cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. *J. Equi. Vet. Sci.,* v.26, n.5, p.215-218, 2006.

[33] Pereira G.R., Becker E.G., Siqueira L.C., Ferreira R., Severo C.K., Truzzi V.S., Oliveira J.F.C., Goncalves B.D. (2010). Assessment of bovine spermatozoa viability using different cooling protocols prior to cryopreservation. *Italian Journal of Animal Science,* v.9:e88, p.465-470.

1 [34] O'Hara L, Hanrahan JP, Richardson L, Donovan A, Fair S, Evans ACO, Lonergan
2 P. Effect of storage duration, storage temperature, and diluents on the viability and
3 fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology*, v.73, p.541-549, 2010.

4

5 [35] Kasimanickam R, Kasimanickam V, Tibary A, Pelzer K. Effect of sêmen extenders
6 on sperm parameters of RAM sêmen during liquid storage at 4°C. *Small Ruminant*
7 *Research*, doi:10.1016, 2011.

4 CONCLUSÕES

Tanto os protocolos de refrigeração, quanto os protocolos de congelação do sêmen ovino, diminuíram os parâmetros espermáticos de motilidade, viabilidade e potencial de membrana mitocondrial espermáticos quando comparados com o sêmen fresco.

Os dois protocolos de congelação aumentaram os defeitos acrossomais após a descongelação, quando comparados com o sêmen fresco. Também, foi observada uma maior eficiência na preservação de todos os parâmetros espermáticos, quando as amostras foram diluídas com o diluente Bovimix[®] e congeladas com o congelador programável.

Os protocolos de refrigeração, se demonstraram eficientes para preservar o sêmen até as 72h pós coleta, no entanto, foi observada a redução dos parâmetros espermáticos durante o tempo de armazenamento do sêmen. O diluente Bovimix[®] apresentou melhores resultados para os parâmetros espermáticos analisados, tanto à 5 quanto à tratamentos à 5 e à 15°C.

Os tratamentos congelados obteram resultados de motilidade, viabilidade e potencial de membrana mitocondrial muito inferiores aos obtidos com os tratamentos realizados com a refrigeração.

Em conclusão, os resultados sugerem que o diluente Bovimix[®] causa menos danos aos espermatozoides e apresenta maior eficiência na preservação dos parâmetros do sêmen ovino, tanto nos protocolos de refrigeração, quanto nos protocolos de congelação.

5 PERSPECTIVAS

Ainda fazem-se necessários estudos de técnicas de congelamento do sêmen ovino que não diminuam drasticamente a viabilidade espermática, pois ao contrário, a inseminação laparoscópica permanecerá a ser empregada. Também é importante estudar composições de diluentes para preservar o sêmen refrigerado, por tempo maior, fornecendo os nutrientes necessários para que as células se mantenham viáveis e possam ser transportadas e utilizadas quando forem necessárias.

Apesar de ainda apresentar baixa eficiência, a criopreservação do semen ovino é fundamental devido às exigências de mercado. O material criopreservado apresenta capacidade de armazenamento por longos períodos e, ainda, viabiliza a criação de bancos de material genético de animais de destaque e de alto valor zootécnico.

Sendo assim, é importante que o diluente Bovimix[®] seja estudado com diferentes curvas de congelação, pois este diluente apresenta uma melhor proteção às células espermáticas ovinas, que o diluente Botubov[®] e TYB[®]. E, provavelmente, se aliado a outras curvas de congelação, pode alcançar resultados ainda mais favoráveis.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abou-Haila A., Tulsiani E.R. (2000). Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.397, p.173-182.
- Aitken R.J., Baker M.A. (2004). Oxidative stress and male reproductive biology. **Reproduction, Fertility and Development**, Clayton South, v.16, p.581-588.
- Al-Somai N., et al. (1994). Low molecular weight components in bovine semen diffusate and their effects on motility of bull sperm. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.41, p.165-171.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts T., Walter P. (2002). **Molecular Biology of the Cell**. 4th edn , NY Garland Publishing.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts T., Walter P. (2004). **Molecular Biology of the Cell**. 4th edn , NY Garland Publishing.
- Alvarez J.G., Storey B.T. (1985). Spontaneous lipid peroxidation in rabbit and mouse epididymal spermatozoa: dependence of rate on temperature and oxygen concentration. **Biology of Reproduction**, Madison, v.32, p.342-51.
- Amann R.P. (1981). A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal plasma. **Journal of Andrology**, v.2, p.37-58.
- Amann R.P., Pickett B.W. (1987). Principles of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. **J. Eq. Vet. Sci.**, Amsterdam, v.7, p.145-174.
- Amann R.P. (1989). Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? **J. Androl.**, Hoboken, v.10, p.89-98.
- Amann R.P., Graham J.K. (1992). Spermatozoal function. In: Mckcinnon A.O., Voss J.L. (Ed.). **Equine Reproduction**. 2 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p.715-745.
- Amann P. (1993). Composition and structure of cell wall polysaccharides in forages. In: Jung H.G.; Buxton D.R.; Hatfield R.D. **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison, p.183-199.
- Amann R.P., Graham J.K. (1993). Spermatozoa function. **Equine Reproduction**, Malvern, p.715-745.
- Andrade A.F., Arruda, R.P., Celeghini E.C., Nascimento J., Martins S.M., Raphael C.F., Moretti A.S. (2007). Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrossomal membranes in boar sperm. **Reprod. Domest. Anim.**, v.42, p.190-194.
- Anel L., Alvarez M., Martinez-Pastor F., Garcia-Macias V., Anel E., Paz P. (2006). Improvement strategies in ovine artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.41, p.30-42.

Arav A., Zeron Y., Shturman H., Gacitua H. (2002). Successful pregnancies in cows following double freezing of a large volume of semen. **Reprod. Nutr.**, v.42, p.583–586.

Aro D.T., Polizer K.A., Pena S.B. (2006). O agronegócio na ovinocultura de corte no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano V, n.09.

Arruda R.P. (2000). **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfologia (ASMA)**. Tese de livre docência, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, p.121.

Arruda R.P., Ball B.A., Gravance C.G., Garcia, A.R., Liu I.K.M. (2002). Effects of extenders and cryoprotectants on stallion head morphometry. **Theriogenology**, v.58, p.253-256.

Arruda R.P., Foreno-Gonzalez R.A., Geleghini E.C.C, et al. (2005). Effects of cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotectants on plasmatic, acrosomal and mitochondrial membranes of bovine spermatozoa. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p. 329.

Arruda R.P., Andrade A.F.C., Peres K.R., Raphael C.F., Nascimento J., Celeghini E.C.C. (2007). Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Rev Bras Reprod Anim**, v.31, p.8-16.

Arruda R.P., Silva P.F., Affonso F.J., Lemes K.M. (2011). Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.35, p.145-151.

Aurich J.E., Kuhne A., Hoppe H., Aurich C. (1996). Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, Amsterdam, v.46, p.791-7.

Austin C.R. (1951). Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. **Australian Journal of Science Research**, v.4, p.581-596.

Ax R.L., Dickson K., Lenz R.W. (1985). Induction of acrosome Reactions by Chondroitin Sulfates in Vitro Corresponds to Nonreturn Rates of Dairy Bulls. **J.Dairy Sci.** Stanford, 68: 387-390.

Azevedo H.C. (2006). **Cinética, morfologia, integridade das membranas plasmática e mitocondrial, capacitação espermática e integridade e reação do acrossomo de espermatozóides ovinos submetidos à criopreservação: efeito da adição de colesterol, desmosterol e ácido oléico-linoléico ao meio diluidor**. Tese de doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de Estadual Paulista. Botucatu, p. 194.

Barth A.D., Oko R.J. (1989). Normal bovine spermatogenesis and sperm maturation. In: Barth A.D., Oko R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames, Iowa State University.

Barrios B., Perez P.E.R., Gallego M., Tato A., Osada J., Muino T.B., Cebrian-Perez J.A. (2000). Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1551-1537.

Bazer F.W., Geiserte R.D., Zavy M.T. (1995). Fertilização, Clivagem e Implantação. In: Hafez E.S.E. **Reprodução Animal**. 6.ed. São Paulo :Editora Manole, p.191-200.

Bedford J.M.M. (1983). Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. **Biology of Reproduction**, v.28, p.108-120.

Bedford S.J., Miranda P.V., Visconti P.V. (2003). Media requirements for stallion sperm capacitation. In: **Proceedings of a work shop on transporting gametes and embryos**. Brewster, Massachusetts, v.12, p.50-52.

Bedford J.B. (2006). Why do penetrating sperm create an olique path in the zona pellucida? **Reproduction**, v.131, p.23-25.

Bicudo S.D., Souza D.B., Takada L. (2000). Possibilidades e limitacoes da inseminacao com semen ovino refrigerado e biotecnicas associadas como estrategia da intensificacao do manejo reprodutivo. **Archives of Veterinay Science**, v.5, p.35-39.

Blackmore P.F., Beebe S.J., Danforth D.R., Alexander N.J. (1990). Progesterone and 14 α hydroxyprogesterone: novel stimulators of the calcium influx in human sperm. **J. Biol. Chem.**, v.265, p.1376-1380.

Bleil J.D., Wassarman P.M. (1986). Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm. **J. Cell Biol.**, v.102, p.1363-1371.

Blom M. (1973) Ultrastrukturen af nogle spermiedefekter of for slag til et nyt klassificerings-system for tyrens spermogram. The ultrastructure of some characteristic sperm defect and a proposal for a new classification of bull spermogram. **Nord. Vet. Med.**, v.25, p.383-91.

Blottner S. (1998). Semen preservation for reproduction management in rare and endangered species, **Adv. Ethol.**, v.33, p.9-13.

Breitbart H., Spungin B. (1997). The biochemistry of the acrosome reaction. **Molecular Human Reproduction**, v.3, p.195-202.

Brisola L.B., Neves J.P., Gonçalves P.B.D., Oliveira J.F.C., Montagner M.M. (1999). Integridade das membranas plasmática, nuclear e mitocondrial de espermatozóides ovinos criopreservados com etileno glicol. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, p.527-531.

Brisola M.V., Espirito Santo E. (2003). Panorama da cadeia produtiva da ovinocultura no Brasil. In: **Simposio mineiro de ovinocultura**. Lavras, Anais: UFLA, cd1.

Bucak M.N., Tekin N. (2007). Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. **Small Ruminat Research**, Amsterdam, v.27, p.103-108.

Bustamante I.C.F. (2010). **Clonagem, expressao e purificacao das proteinas do plasma seminal bovino osteopontina e protein acida do fluido seminal relacionadas a alta congelabilidade do semen**. Tese de doutorado, UFRGS, p.6-16.

Câmara D.R., Guerra M.M.P. (2011). Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, p.33-40.

Cancel A.M., Chapman D.A., Killian G.J. (1997). Osteopontin is the 55-Kilodalton Fertility-Associated Protein in Holstein Bull Seminal Plasma. **Biology of Reproduction**. New York, v.57, p.1293-1301.

Carvalho F.P., Silva J.F.S., Souza G.V., Quirino C.R., Carvalho C.S.P. (2008). Diferentes diluentes sobre a motilidade e integridade de membrana plasmática após o congelamento e descongelamento de sêmen ovino. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.9, p.612-620.

Cassey P.J., Hillman R.B., Robertson K.R., Yudin A.I., Liu I.K.M., Drobins E.Z. (1993). Validation of na acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **Journal of Andrology**, v.14, p.289-297.

Celeghini E.C.C. (2005). **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. Tese de doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo.

Celeghini E.C., Arruda R.P., Andrade A.F., Nascimento J., Raphael C.F. (2007). Pratical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reprod. Domest. Anim.**, v.42, p.470-488.

Celeghini E.C.C., Andrade A.F.C., Fernandes C., Nascimento J., Ticianelli J.S., Arruda R.P. (2010). Damage assessment of the equine sperm membranes by fluorimetric technique. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v.53, p.1285-1292.

Celeghini E.C.C., Nascimento J., Raphael C.F., Andrade A.F.C., Arruda R.P. (2010). Simultaneous assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes of ram sperm by fluorescent probes. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.62, p.536-543.

Cheng F.P., Fazeli A., Voorhout W.F., Marks A., Bevers M.M., Colenbrander B., (1996). Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucidainduced acrosome reaction in stallion spermatozoa. **J. Androl.** , v.17, p.674-682.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998). **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**, 2ª Ed., Belo Horizonte.

Cooper G.M. (2000). **A célula uma abordagem molecular**. 2ª edição, Artmed, Porto Alegre, p.106.

Corandin E.M. (2011). Sêmen refrigerado e congelado para inseminação artificial em ovinos. **Ciência Animal da Escola de Veterinária da UFG**, Goiânia, p.3-24.

Cossarizza A., Baccarani-Contri M., Kalashnikova G., Franceschi C. (1993). A new method for the cytometric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.197, p.40-45.

Cosson J.A. (1996). A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. **Cell Biology International**, v.20, p.83-94.

Çoyan K., Baspınar N., Bucak M.N., Akalin P.P. (2011). Effects of cysteine and ergothioneine on post-thawed Merino ram sperm and biochemical parameters. **Cryobiology**, San Diego, v.63, p.1-6.

Crespilho A.M., Papa F.O., Alberti K., Siqueira E.R.F., Martins A.J., Novaes J.L.C., Della'acqua J.A. (2006). Eficiência comparativa entre dois diluidores para a congelacao de sêmen bovino sobre os padrões de motilidade e integridade de membrana plasmática. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v.22, p.229-235.

Cross N.L., Meizel S. (1989). Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. **Biology of Reproduction**, v.41, p.635-641.

Cruz Junior C.A. (2006). **Caracterização anatômica e histológica da cévix de ovelhas da raça Santa Inês**. Dissertação de mestrado. Faculdade de agronomia e medicina veterinária, UNB, Brasília, p.45.

Dacheux J.L., Dacheux F. (2002). Protein secretion in the epididymis. In: Robaire B., Hilton B.T., editors. **The epididymis: from molecules to clinical practice. A comprehensive survey of the efferent ducts, the epididymis and the vas deferens**. New York, Kluwer Academic/Plenun Publishers, p.151-68.

Dacheux J.L., Castella S., Gatti J.L., Dacheux F. (2005). Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. **Theriyogenology**, v.63, p.319-41.

De Laraminde E., Gagnon C. (1995). Impacto f reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Human Reproduction**, Oxford, 10: 15-21.

De Rooij D.G., Russel L.D. (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. **J. Androl.**, v.21, p.776-98.

Decuadro-Hansen G. (2004). La refrigeration et La congélation du sperme: experience chez l'animal chilled and frozen semen: the animal experience. **Gynécologie, Obstétrique e Fertilité**, Paris, v.32, p.887-893.

Delpéch S., Thibault C. (1993). Acquisition of sperm fertilizing ability: epididymal maturation, accessory glands and capacitation. In: Thibault C., Levasseur M.C., Hunter R.H. **Reproduction in mammals and man**. Paris: Ellipses, cap. 14, p. 268-278.

Dhami A.J., Kodagali S.B. (1986). Correlation between biochemical and enzymatic constituents of semen of Surti buffalo bulls. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.57m p.1283-6.

Donovan A., Hanrahan J.P., Lally T., Boland M.P., Byrne G.P., Duffy P., et al. (2001). AI for Sheep Using Frozen-Thawed Semen. End of Project Report: **Sheep Series No.11**. Teagasc, Agriculture and Food Development Authority.

Druart X., Cognié J., Baril G., Clément F., Dacheux J.L., Gatti J.L. (2009). In vivo imaging of in situ motility of fresh and liquid stored ram spermatozoa in the ewe genital tract. **Reproduction**, v.138, p.45-53.

Duchen M.R. Surin A., Jacobson J. (2003). Imaging mitochondrial function in intact cells. **Methods Enzymol.**, v.361, p.353-89.

Eddy E.M. (1988). The spermatozoon. In: Knobil E. **The physiology of reproduction**. New York, Raven Press, p.27-68.

Eddy E., O' Brien D. (1994). The spermatozoon. In: Knobil E, Neill JD (eds) **The physiology of reproduction**, v.1 1, 2nd edn. Raven Press, New York, p. 29-77.

Eddy E.M. (2006). The spermatozoon. In: Jimmy D.N., Tony M.P., Donald W.P., John G.C., David D.K., Joanne S.R., Paul M.W. (Ed.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, 3 ed. St Louis: Academic Press, p.3-54.

Einspanier R., Einspanier A., Wempe F., Scheit K.H. (1991). Characterization of a new bioactive protein from bovine seminal fluid. *Biochem. Bioph. Res. Comm.*, Amsterdam, v.179, p.1006-1010.

Einspanier R., Amselgruber W., Sinowatz F., Henle T., Ropke R., Schams D. (1993). Localization and concentration of a new bioactive acetic seminal fluid protein (aSFP) in bulls (*Bos Taurus*). **J. Reprod. Fertil.**, Stanford, v.98, p.241-244.

Evans G., Maxwell W.M.C. (1987). **Salamon's artificial insemination of sheep and goats**. Sydney, Butterworths.

Evans G. e Maxwell W.M.C. (1990). **Inseminación Artificial de Ovejas y Cabras**. Zaragoza: Editorial Acribia, p.1-6, 19-32.

Evans J.P., Florman H.M. (2002). The state of the union: the cell biology of fertilization. **Nat. Cell Biol.**, v.4, p.57-63.

- Fawcett D.W. (1975). The mammalian spermatozoa. **Dev. Biol.**, v.44, p.394-436.
- Ferreira A.L.A., Matsubara L.S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, p.1-16.
- Flesch F.M., Gadella B.M. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochemical Biophys.**, v.1469, p.197-235.
- Florman H.M., Tombes R.M., First N.L., Babcock D.F. (1989). AN adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevations in internal Ca_{2+} and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis. **Dev. Biol.**, v.135, p.133-146.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2001). **Statistics Division**. Disponível em < www.fao.org >. Acesso em 19 de outubro de 2011.
- Foote R.H. (2002). The history of artificial insemination: Selected noted and notables. **American Society of Animal Science**: 1-10.
- Foote R.H. (2003). Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. **Animal Reproduction Science**, v.75, p.119-139.
- Franca L.R., Avelar G.F., Almeida F.F. (2005). Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**, v.63, p.197-235.
- Fraser L.R. (1998). Interactions between a decapacitation factor and mouse spermatozoa appear to involve fructose residues and a 'GPI-anchored receptor. **Molecular Reproduction and Development**, v.51, p.193-202.
- Freneau G.E., Puoli J.R., Borja A.L.R.(2000). Índice de capacidade andrológica por pontos (ICAP) em touros Nelore: Estudo de estação de acasalamento em Mato Grosso do Sul. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 37, 2000, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: SBZ, p.177-181.
- Fritz M., Flesch F.M., Gadella B.M. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica**, v.1469, p.197-235.
- Gadella B.M., Colenbrander B. (2003). Bicarbonate dependent capacitation of mammalian sperm cells: a comparative overview. In: **Proceedings of a work shop on transporting gametes and embryos**, Brewster, Massachusetts, v.11, p.43-48.
- Garcia M.A., Graham E.F. (1987). Dialysis of bovine semen and its effect on fresh and freeze/thawed spermatozoa. **Cryobiology**, v.24, p.446-454.
- Garcia-Macias V., Paz P., Martinez-Pastor F., et al. (2006). DNA fragmentation assessment by flow cytometry and sperm-bos-halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. **International Journal of Andrology**, v. 30, p.1-11.

- Garner D.L., Pinkel D., Johnson L.A., Pace M.M. (1986). Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biol Reprod.**, v.34, p.127-138.
- Garner D.L., Johnson L.A., Yue S.T., Roth B.L. (1994). Haugland RP. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability. **J Androl.**, v.15, p.620-629.
- Garner D.L., Johnson L.A. (1995). Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and Propidium iodide. **Biology of Reproduction**, v.53, p.276-284.
- Garner D.L., Thomas C.A., Joerg H.W., DeJarnette J.M., Marshall C.E. (1997). Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1401-1406.
- Garner D.L., Thomas C.A., Gravance C.G. (1999). The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. **Reproduction of Domestic Animal**, v.34, p.399-404.
- Garner D.L., Thomas C.A., Gravance C.G., Marshall C.E., DeJarnette J.M., Allen C.H. (2001). Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. **Theriogenology**, v.56, p.31-40.
- Georgiev G.H. (1978). Isoelectric focusing of bull seminal plasma proteins. **Inter. J. Biochem.**, Amsterdam, v.9, p.327-330.
- Gilbert S.F. (2003). **Fertilization: Beginning a new organism in Developmental Biology**. Massachusetts: Sinauer Associates, 7th edition.
- Gonçalves P.B.D., Figueiredo J.R., Freitas V.J.F. (2001). **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. Livraria Varela, São Paulo, p.340.
- Graham J.K., Kunze E., Hammerstedt R.H. (1990). Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v.43, p.55-64.
- Graham J.K. (1996). Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America Equine Practitioners**, v. 12, p. 131-147.
- Graham J.K., Moce E. (2005). Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v.64, p.492-504.
- Gravance C.G., Garner D.L., Baumber J., Ball B.A. (2000). Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1, **Theriogenology**, v.53, p.1691-1703.
- Gravance C.G., Garner D.L., Miller M.G., Berger T. (2001). Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. **Reproductive Toxicology**, v.15, p.5-10.

Grondhal C., Hyttel P., Greve T. (1992). Acrosome status in fresh and frozen-thawed stallion spermatozoa evaluated by scanning electron microscopy. In: **International Congress of Animal Reproduction**, v.12, p.1870-1872.

Guerra M.O., Peters V.M. (2007). Como um mamífero se desenvolve desde a fertilização até a implantação. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v.18, p.15-32.

Gwathmey T.M., Igotz G.G., Suarez S.S. (2003). PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. **Biol. Reprod.**, v.69, p.809-815.

Hafez E.S.E. (1993). **Reproduction in Farm Animals**. Philadelphia: Lea & Febiger, p.424-439, 165-187.

Hafez E.S.E. (1995). **Reprodução Animal**. 6. ed. São Paulo: Manole, p.582.

Hafez E.S.E., Hafez B. (2000). **Reproduction in Farm Animals**. 7ed., Philadelphia, Lippincott Williams e Wilkins, p.509.

Hafez E.S.E., Hafez B. (2004). Transporte e sobrevivência de gametas. In: **Reprodução Animal**. 7ed., Barueri, Manole, 2004, p.83-96.

Hammerstedt R.H., Graham J.K., Nolan J.P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **J. Androl.**, v.11, p.73-88.

Harrison R.A.P., Vickers S.E. (1990). Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.343-352.

Harrison R.A.P. (1996). Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. **Reproduction, Fertility and Development**, v.8, p.581-94.

Haugland R.P. (2001). **Handbook of fluorescent probes and research chemicals**. Oregon, USA, Molecular Probes.

Hochgrebe T.T., Humphreys D., Wilson M.R., Easterbrook-Smith S.B. (1999). A reexamination of the role of clusterin as a complement regulator. **Exp. Cell Res.**, Philadelphia, v.249, p.13-21.

Holt W.V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.62, p.3-22.

Howes E.A., Hurst S., Laslop A., Jones R. (1998). Cellular distribution and molecular heterogeneity of MAC393 antigen (clusterin, beta-chain) on the surface membrane of bull spermatozoa. **Mol. Hum. Reprod.**, New York, v.4, p.673-81.

Howes L. e Jones R. (2002). Interactions between zona pellucida glycoproteins and sperm proacrisine/acrosine during fertilization. **Journal of Reproductive Immunology**, v.53, p.181-192.

Humphreys D.T., Carver J.A., Easterbook-Smith S.B., Wilson M.R. (1999). Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. **J. Biol. Chem.**, San Francisco, v.274, p.6872-81.

Ibge (2009). **Tabelas de resultados. Anuario 2009**. Disponível em:< www.ibge.gov.br> Acesso em 31 de outubro de 2011.

Ibrahim N.M., Gilbert G.R., Loserth K.J., Crabo B.G. (2000). Correlation between clusterin-positive spermatozoa determined by flow cytometry in bull semen and fertility. **J. Androl.**, Hoboken, v.21, p.887-94.

Ibrahim N.M., Romano J.E., Troedsson M.H., Crabo B.G. (2001). Effect of scrotal insulation on clusterin-positive cells in ram semen and their relationship to semen quality. **J. Androl.**, Hoboken, v.22, p.863-77.

Ijaz A., Hunter A.G. (1989). Induction of bovine sperm capacitation by TEST-Yolk semen extender. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.2683-2690.

Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A., Okabe, M. (2005). The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. **Nature**, v.434, p.234-238.

Jelinkova P., Manaskova P., Ticha M., et al. (2003). Proteinase inhibitors in aggregated forms of boar seminal plasma proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.32, p.99-107.

Jelley E. (1937). Molecular, nematic and crystal states of 1:1'-diethyl—cyanine chloride. **Nature** (Lond.), 139, 631–632.

Jobim M.I.M., Oberst E.R., Salbego C.G., Souza D.O., Wald V.B., Mattos R.C. (2003). Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do semen através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p.21-30.

Jobim M.I.M., Oberst E.R., Salbego C.G., Souza D.O., Wald V.B., Tramontina F., Mattos R.C. (2004). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, Amsterdam, v.61, p.255-266.

Jones K.H., Seneft J.A. (1985). An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate – propidium iodide. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.33, p.77-79.

Kasimanickam R., Kasimanickam V., Tibary A. (2011). Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4°C. **Small Ruminant Research**, doi10.1016, p.1-6.

Katila T. (2001). Sperm-uterine interactions: a review. **Anim Reprod Sci**, v.68, p.267-272.

Kemme M., Madiraju M.V., Kraus E., Zimmer M., Scheit K.H. (1986). The major protein of bull seminal plasma is a secretory product of seminal vesicle. **Biochim. Biophys. Acta**, Helsinke, v.884, p.282-90.

Killian G.J., Chapman D.A., Rogowski L.A. (1993). Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, New York, 49: 1202-1207.

King, G.J. (1993). **Reproduction in Domesticated Animals**. Amsterdam, London, New York, Tokyo, Elsevier Science publishers, p.23-24, 83-86, 109-111, 115, 195-204, 365-366.

Kirk (2001) Ivan Kirk et al. Kirk E.S., Graham J.K., Bruemmer J.E., Squires E.L. (2001). Evaluating frozen equine semen by flow cytometry. In: **Proceedings of the third international symposium on stallion reproduction**, p.67.

Kumar S., Millar J.D., Watson P.F. (2003). The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram and boar spermatozoa: a comparison of two controlled rate cooling machines. **Cryobiology**, v.46, p.246-253.

Lagerlof N. (1934). Morphologische Untersuchungen uber. Veranderim spermabild und in den Hoden bei Bulle mit Verminderter oder auf gehobe ver Fertilitat. **Acta Pathol Microbiol Scand**, v.1, p.254.

Lausmann C.V., Neves J.P., Goncalves P.B.D. (2004). Plasma seminal na capacitacao espermatica em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.28, p.150-157.

Leboeuf B., Restall B., Salamon S. (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.62, p.113-141.

Lessard C., Parent S., Leclerc P., Sullivan R. (1999). The protein P25b: A possible explanation of the lost of fertility of thawed bull sperm. **Theriogenology**, Amsterdam, v.50, p.347-347.

Lessard C., Parent S., Leclerc P., Bailey J.L., Sullivan R. (2000). Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b. **J. Androl.**, Hoboken, v.21, p.700-7.

Lima L.F. (2008). **Influência de sistemas de refrigeração sobre a qualidade do sêmen ovino criopreservado em palhetas**. Tese de mestrado. Universidade de Brasília. Brasília/DF, p.53.

Lima L.F., Moura P., Passos P.I.B., Leal D.R., Rumpf R., Neves J.P. (2010). Influência de sistemas de refrigeração sobre a qualidade do sêmen ovino criopreservado em plhetas. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.11, p.835-844.

Lopez-Saez A., Ortiz N., Gallego L., Garde J.J. (2000). Liquid storage (5°C) of ram semen in different diluents. **Arch. Androl.**, v.44, p.155-64.

Machado V.P., Nunes J.F., Araújo A.A., Fernandes D.R.P., Cordeiro M.A., Medeiros C.H.N., Medeiros A.L.N., Monteiro A.W.U. (2006). Fertilidade após a inseminação

artificial intra-uterina de ovelhas utilizando diluidores à base de água de coco. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.43, p.43-49.

Magistrini M. (2000). Semen evaluation. In: Samper J. C. **Equine breeding management and artificial insemination**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, cap.8.

Maia M.S., Bicudo S.D., Azevedo H.C.A., Sousa D.B., Rodello L., Meira C. (2008). Efeito da adição de lauril sulfato de sódio (OEP) ao diluidor na viabilidade do sêmen congelado de ovinos Santa Inês. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v.15, p.521-530.

Malmgren L. (1997). Assessing the quality of raw semen a review. **Theriogenology**, v.48, p.523-530.

Manandhar G., Feng D., Yi Y.J., Lai L., Letko J., Laurincik J., Sutovsky M., Salisbury J.L., Prather R.S., Schatten H., et al. (2006). Centrosomal protein centrin is not detectable during early pre-implantation development but re-appears during late blastocyst stage in porcine embryos. **Reproduction**, v.132, p.423-434.

Manjunath P., Sairam M.R., Uma J. (1987). Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. **Biosci. Rep.**, New York, v.7, p.231-238.

Manjunath P., Sairam M.R. (1987). Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. **Biochem. J.**, Boston, v.241, p.685-692.

Manjunath P. e Thérien I. (2002). Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **J. Reprod. Immunol.** Boston, v.53, p.109-119.

Manjunath P., Bergeron A., Lefebvre J., Fan J. (2007). Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. **Soc. Reprod. Fertil. Suppl.**, London, v.65, p.217-228.

Mann T. e Lutwak-Mann C. (1981). **Male Reproductive Function and Semen**. Berlin: Springer-Verlag.

Matos D.L., et al. (2008). Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.225-232.

Maxwell W.M.C., Johnson L.A. (1999). Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. **Theriogenology**, v.52, p.1353-1362.

Mazur P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. **The American Journal of Physiology**, v.247, p.C125-C142.

Medeiros C.M.O., Forell F., Oliveira A.T.D., Rodrigues J.L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? **Theriogenology**, Amsterdam, 57:327-344.

Meyers S.A., Overstreet J.A., Liu I.K.M., Drobnis E.Z. (1995). Capacitation in vitro of stallion spermatozoa: comparison of the progesterone-induced acrosome reaction in fertile and subfertile mares. **J. Androl.**, v.16, p.47-54.

Milczewski V., Kozicki L.E., Neves J.P. (2000). Viability of ovine semen cooled in different extenders. *Archives of Veterinary Science* v.5, p.29-33.

Miller D.J. e Ax R.L. (1988). Improved assay for measuring heparin binding to bull sperm. **J. Dairy Sci.**, Stanford, v.71, p.239-244.

Miller D.J., Winer M.A., Ax R.L. (1990). Heparin binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biology of Reproduction**, New York, v.42, p.899-915.

Miller D.J., Shi X., Burkin H. (2002). Molecular basis of mammalian gamete binding. **The Endocrine Society**, p.37-73.

Moore H.D.M., Hibbit K.G. (1976). The binding of labeled basic proteins by boar spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.46, p.71-76.

Moraes C.N., Neves J.P., Gonçalves P.B.D., Oliveira J.F.C., Schweitzer C.M.. (1998). Criopreservação do sêmen ovino em pellets com etileno glucol. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, p.287-292.

Moura A.A., Koc H., Chapman D.A., Killian G.J. (2006). Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **J. Androl.**, Hoboken, v.27, p.201-211.

Moura A.A., Chapman D.A., Koc H., Killian G.J. (2007). A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.98, p.169-188.

Moura P.P., Franco M.M., Silva T.A.S.N., Rocha T.L., Leal D.R., Passos P.I.B., Neves J.P. (2010). Caracterização de proteínas do plasma seminal e sua relação com parâmetros de qualidade do sêmen criopreservado em ovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, p.1154-1159.

Moustacas V.S., Cruz B.C., Varago F.C., Miranda D.A., Lage P.G., Henry M. (2011). Extenders containing dimethylformamine associated or not with glycerol are ineffective for ovine sperm cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.46, p.924-925.

Moustafa A.R., Mezaros I. (1981). Interrelationship between the total protein content of bovine seminal plasma and behaviour of the spermatozoa after freezing-and-thawing. **Acta Veterinariae, Academiae, Scientiarum, Hungaricae**, v.28, p.403-408.

Naaby-Hansen S., Flickinger C.J., Herr J.C. (1997). Two-dimensional gel electrophoretic analysis of vectorially labeled surface proteins of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.56, p.771-87.

Nass S.J., Miller D.J., Winer M.A., Ax R.L. (1990). Male accessory sex gland produce heparin-binding proteins that bind to cauda epididymal spermatozoa and are testosterone dependent dependent. **Mol. Reprod. Dev.**, Amsterdam, v.25, p.237-46.

Nauc V. e Manjunath P. (2000). Radioimmunoassays for Bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-Kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. **Biology of Reproduction**, New York, v.63, p.1058-66.

Neild D.N., Gadella B.M., Agüero A., Stout T.A.E., Colenbrander B. (2005). Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. **Anim Reprod Sci**, v.89, p.47-56.

Neild D.M. (2005). **Evaluation of equine sperm membrane function: effects of cryopreservation**. Tese de doutorado. Faculty of Veterinary Sciences, Utrecht University, Utrecht, p.210.

O'Hara L., Hanrahan J.P., Richardson L., Donovan A., Fair S., Evans A.C.O., Lonergan P. (2010). Effect of storage duration, storage temperature, and diluents on the viability and fertility of fresh ram sperm. **Theriogenology**, Amsterdam, v.73, p.541-549.

Orfao A., Buitrago J.M.G. (1995). Fundamentos de la citometria de flujo. In: Orfao A., Buitrago J.M.G. **La Citometria de flujo en el Laboratorio Clínico**. Salamanca: SEQC, p.11-30.

Ostermeier C.G., Sargeant G.A., Yandell B.S., Everson D.P., Parrish J.J. (2001). Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v.22, p.595-603.

Pangawkar G.R., Sharma R.D., Singh R. (1988). Proteins, silica acid and zinc concentration in the seminal plasma of bulls in relation to freezability of semen. **Indian Veterinary Journal**, v.65, p.58-60.

Papadopoulos S., Hanrahan J.P., Donovan A., Duffy P., Boland M.P., Lonergan P. (2005). In vitro fertilization as a predictor of fertility from cervical insemination in sheep. **Theriogenology**, v.63, p.150-159.

Parks J., Hammerstedt R.H. (1985). Developmental changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane; **Biol. Reprod**, v.32, p.653-668.

Parks J.E., Graham J.K. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p. 209-222.

Patrat C., Serres C., Jovannet P. (2000). The acrosome reaction in human spermatozoa. **Biology of the Cell**, v.92, p.255-266.

Paulenz H., Adnoy T., Fossen O.H., Soderquist L., Berg K.A. (2002). Effect of deposition site and sperm number on the fertility of sheep inseminated with liquid semen. **Veterinary Record**, v.150, p.299-304.

Pereira G.R., Becker E.G., Siqueira L.C., Ferreira R., Severo C.K., Truzzi V.S., Oliveira J.F.C., Goncalves B.D. (2010). Assessment of bovine spermatozoa viability using different cooling protocols prior to cryopreservation. **Italian Journal of Animal Science**, v.9:e88, p.465-470.

Perez L.J., Valcarcel A., Heras M.A., Moses D., Badalssarre H. (1996). Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. **Theriogenology**, v.46, p.131-140.

Pesch S., Bergmann M. (2006). Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**, v.37, p.597-612.

Petrunkina A.M., Waberski D., Bollwein H., Sieme H. (2010). Identifying non-sperm particles during flow cytometric physiological assessment: a simple approach. **Theriogenology**, v.73, p.995-1000.

Purdy P.H. e Graham J.K. (2004). Effect of adding cholesterol to Bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. **Biology of Reproduction**, v.71, p.522-527.

Rath D., Topfer-Petersen E., Michelmann H.W., Schwartz P., Ebeling S. (2005). Zona Pellucida characteristics and sperm-binding patterns of in vivo and in vitro produced porcine oocytes inseminated with differently prepared spermatozoa. **Theriogenology**, v.63, p.352-62.

Rathi R., Colenbrander B., Brevers M.M., Gadella B.M. (2001). Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v.65, p.462-70.

Rawe V.Y., Boudri H.U., Alvarez Sedó C., Carro M., Papier S., Nodar F. (2011). Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. **Reprod. Biomed. Online**, v.20(3), p.320-3.

Reers M., Smith T.W., Chen L.B. (1991). J aggregate formation of a carbo-cyanine as a quantitative fluorescent indicator of membranepotential. **Biochemistry**, v.30,p. 4480-4486.

Reyes-Moreno C. Boilard M., Sullivan R., Sirard M.A. (2002). Characterization and identification of epididymal factors that protect ejaculated bovine sperm during in vitro storage. **Biol. Reprod.**, New York, v.66, p.159-66.

Rodello L. (2006). **Validação de sistema automatizado de refrigeração e congelação de sêmen ovino**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, p.70.

Rodrigues-Martinez H., Saravia F., Walgren M., Tienthai P., Johannisson A., Vazquez J.M., et al. (2005). Boar spermatozoa in the oviduct. **Theriogenology**, v.63, p.514-35.

Rodrigues-Martinez H. (2006). Can we increase the estimative value of semen assessment? Swedish University of Agricultural Sciences. **Reproduction in Domestic Animals**, Uppsala Sweden, v.41, p.2-10.

Rojero R.D.M., Reyna-Santamaria L., Michel-Aceves A.C., Mastache-Lagunas A.A., Hernandez-Ignacio J., Jojas-Maya S. (2009). Cervical or intrauterine artificial insemination in pelibuey ewes, with chilled sêmen. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, Faisalabad, v.8, p.2621-2625.

Roldan E.R.S. (1994). Biology of sperm membranes: implications for capacitation and the acrosome reaction. In: **Proceedings de las 7a Jornadas Internacionales de Reproduccion Animal. Ponencias y Comunicaciones**, Espana, p.53-59.

Roncoletta M., Morani E.D.S.C., Esper C.R., Barnabe V.H., Franceschini P.H. (2006). Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.91, p.77-87.

Saacke R.G., Dalton J.C., Nadir S., Nebel R.L., Bame J.H. (2000). Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.663-677.

Salamon S., Maxwell W.M.C. (1995). Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v.38, p.1-36.

Salamon S. e Maxwell W.M.C. (2000). Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.77-111.

Saling P.M., Storey B.T. (1979). Mouse gamete interactions during fertilization in vitro Chlotetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction, **J. Cell Biol.**, v.83, p.544-55.

Salvioli S., Ardizzoni A., Franceschi C., Cossarizza A. (1997). JC-1, but not DiO₆ (3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v.411, p.77-82.

Sandoval R.M., Santiani A.A., Ruiz L.G., Leyva V.V., Coronado L.S., Delgado A.C. (2007). Criopreservación de sêmen ovino empleando três dilutores y cuatro combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes. **Revista de Investigaciones Veterinárias Del Peru**, Lima, v.18, p.107-114.

Scheit K.M., Kemme M., Aumuller G., Seitz J., Hagendorff G., Zimmer M. (1988). The major protein of bull seminal plasma biosynthesis and biological function. **Bioscience Reports**, v.6, p.589-608.

Seager S.W.J., Fletcher W.S. (1972). Progress on the use of frozen semen in the dog. **Vet Rec**, v.92, p.6-10.

Seidah N.G., Manjunath P., Rochemont J., Sairam M.R., Chretien M. (1987). Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma. Homology to PDC-109 and to the collagen-binding domain of fibronectin. **Biochem. J.**, San Francisco, v. 243, p.195-203.

Senger P.L. (2003). Spermatozoa in the female tract: transport, capacitation & fertilization. In: **Pathways to pregnancy and parturition**. 2 ed. Moscow: Current Conceptions, Inc, cap.12, p.266-283.

Shivaji S., Scheit K.H., Bhargava P.J. (1990). Proteins of seminal plasma. New York, **J.H.Wiley and Sons, Inc**.

Silva T.A.S.N., Neves J.P., Neto A.G.G., Guimaraes A.P., Rimpf R., Sartori R. (2005). Viabilidade e estado acrossomal do semen ovino descongelado e incubado com plasma seminal. **Anais do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, XVI CBRA, Goiania.

Silva P.F.N., Gadella B.M. (2005). Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriyogenology**, v.65, p.958-978.

Silva A.F., Costa E.P., Oliveira F.A., Torres C.A.A., Hass G.T.S., Nascimento V.A. (2006). Uso de dimetil-formamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.35, p.452-456.

Skutelsy E., Ranen E., Shalgi R. (1994). Variations in the distribution of sugar residues in the zona pellucida as possible species-specific determinants of mammalian oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.100, p.35-41.

Smith J.F., Murray G.R. (1997). Evaluation of different techniques for determination of membrane status in spermatozoa. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v.57, p.246-250.

Sousa B.P.A., Andrade J.C.O., Wischral A., Guerra M.M.P. (2010). Viabilidade in vitro de células espermáticas ovinas submetidas a diferentes diluentes e a refrigeração. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.62, p.528-535.

Squires E.L., Pickett B.W., Graham J.K., Vanderwall D.K., Mccue P.M., Bruemmer J.E. (1999). Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, p.89.

Storey B.T. (1995). Interactions between gametes leading to fertilization: the sperm's eye view. **Reproduction, Fertility and Development**, 7: 927-942.

Stryer L. (1988). Introduction to biological membranes. In: Stryer L., **Biochemistry**, 3ed., New York, Freeman and Company, p.83-310.

Sullivan R., Robitaille G. (1989). Heterogeneity of epididymal spermatozoa of the hamster. **Gam. Res.**, London, v.24, p.229-36.

Sutovsky P., Manandhar G. (2006). Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. In: Christopher D.J., Barrat J.E.C.L.R. **The Sperm Cell**. New York: Cambridge University Press, p.1-30.

- Therien I., Moreau R., Manjunath P. (1998). Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biol. Reprod.**, Cambridge, v.59, p.768-776.
- Thomas C.A., Garner D.L., DeJarnette J.M., Marshall C.E. (1998). Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v.58, p.786-793.
- Troiano L., Granata R.M., Cossarizza A., Kalashnikova G., Bianchi R., Pini G., Tropea F., Carani C., Franceschi C. (1998). Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility. **Experimental Cell Research**, v.241, p.384-93.
- Tulsiani D.R.P., Yoshida-Komiya H., Araki Y. (1997). Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. **Biology of Reproduction**, v.57, p.487-494.
- Turner R. (2003). Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? **J. Androl.**, v.24, p.790-803.
- Wassarman P.M. (1999). Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. **Cell**, v.96, p.175-183.
- Wassarman M.M. (2002). Sperm receptors and fertilization in Mammals. The Mount Sinai **Journal of Medicine**, v.69, p.148-155.
- Watson P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.481-492.
- Yanagimachi R. (1994). Mammalian fertilization. In: Knobil E., Neil, J.D. **The Physiology of Reproduction**, New York, Raven Press.
- Yániz J., Martí J.I., Silvestre M.A., Folch J., Santolaria P., Alabart J.L., López-Gatius F. (2005). Effects of solid storage of sheep spermatozoa at 15°C on their survival and penetrating capacity. **Theriogenology**, Stoneham, v.64, p.1844-1851.
- Zaffalon F.G. (2009). **Alterações semelhantes à capacitação no sêmen bovino após a criopreservação utilizando diluidores a base de gema de ovo ou lecitina de soja**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo.
- Zuccari C.E.S.N. (1998). **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina**. Tese, doutorado em Reprodução Animal, UEP, SP, p.118.
- Zügel R.M. (1999). **Avaliação de sêmen de búfalos congelados em diluidores Tes, Tris e Glicinogema através do teste de penetração em oócitos zona free de hamster**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, p.67.

