

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 29/10/2020.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA  
VETERINÁRIA

**UTILIZAÇÃO DO CASEINATO DE SÓDIO NA CONGELAÇÃO DE  
SÊMEN OVINO**

LETÍCIA CRISTINA SALGADO

BOTUCATU-SP

Abril 2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA  
VETERINÁRIA

**UTILIZAÇÃO DO CASEINATO DE SÓDIO NA CONGELAÇÃO DE  
SÊMEN OVINO**

LETÍCIA CRISTINA SALGADO

Dissertação apresentada á Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista-UNESP, Campus de Botucatu, para Exame Geral de Qualificação de mestrado no programa de pós-graduação em Biotecnologia Animal.

**Orientadora:** Prof. Dra. Eunice Oba

BOTUCATU-SP

Junho 2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Salgado, Letícia Cristina.

Utilização do caseinato de sódio na congelação de sêmen ovino / Letícia Cristina Salgado. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Eunice Oba

Capes: 50504002

1. Ovino. 2. Sêmen - Criopreservação. 3. Leite - Proteínas. 4. Gema de ovo.

Palavras-chave: Caseinato de sódio; Congelação; Diluente; Gema de ovo.

Nome do autor: Letícia Cristina Salgado

Título: **UTILIZAÇÃO DO CASEINATO DE SÓDIO NA CONGELAÇÃO DE SÊMEN OVINO**

**BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Dra. Eunice Oba**

Presidente e orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP  
Botucatu /SP

**Profa. Dra. Camila De Paula Freitas Dell’Aqua**

Membro titular

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP  
Botucatu /SP

**Prof. Dra. Ariane Dantas**

Membro titular

Etec Dona Sebastiana de Barros

São Manuel /SP

Data da defesa da dissertação, 29 de abril de 2020.

## DEDICATÓRIA

**Dedico esse trabalho e esse título a Deus,  
principalmente a minha Avó Therezinha Secco**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a **Deus**, por me conceder saúde pra que pudesse trabalhar e por estar sempre regendo meus passos.

A minha família, especialmente minha mãe **Luciana** que sempre me incentivou a continuar e sempre apoiou as minhas escolhas, também pelo apoio financeiro e sua paciência comigo.

Meu pai **Orlando** por me ajudar a conceder essa oportunidade que me foi dada.

Ao meu irmão **Leandro** e meu padrasto **Adilson** que sempre estão ao meu lado.

Ao meu namorado **Helder** que sempre esteve ao meu lado ajudando e contribuindo pessoalmente com meu projeto e um dos principais incentivadores do meu crescimento.

Aos meus avós **Jovelino** e **Therezinha** que foram e são um exemplo de responsabilidade, ética e esforço. Dedico todo este meu projeto especialmente a minha Vó, que sempre foi à pessoa que mais me incentivou a sempre estudar e mostrar que o conhecimento abre o mundo de oportunidades.

Acredito que nós temos **o poder de atrair a realidade que desejamos**, mas os sonhos só se realizam com oportunidades. E na maioria das vezes elas só aparecem por causa das **PESSOAS...** “Alguém de bom coração que financia seus estudos; alguém que acredita no seu potencial e te dá um voto de confiança”; e é assim muitas vezes.

Diante disso, queria agradecer imensamente e especialmente a minha orientadora professora **Dra. Eunice Oba**, pela oportunidade de aqui estar. Ela me deu a chance de crescer, pelos seus ensinamentos, apoio e principalmente exemplo de profissionalismo e ética. Seu conhecimento científico me faz ver o quão pouco sei e o quanto ainda tenho que aprender.

Pela ajuda, conselhos e também pelos produtos cedidos pra realização do projeto, agradeço o amigo **Prof. Dr. José Antônio Dell’Aqua Junior**.

Pelo auxílio constante de seus ensinamentos e conhecimento com as análises efetuadas de Citometria de fluxo e da análise estatística, agradeço a querida **Prof. Dra. Camila Freitas Dell’Aqua**.

Ao colega e **Prof. Dr. André Maciel Crespilho** por dispor de seu tempo pra estar ajudando com as análises estatística do projeto.

Pela generosidade em ceder o laboratório CERAN, agradeço o Prof. **Dr. Frederico Ozanan Papa**.

Por ceder espaço e equipamentos do laboratório viabilizando o projeto, e seus conselhos sempre produtivos, agradeço o Prof. **Dr. Sony Dimas Bicudo**.

Com carinho e com o coração eternamente grato pela ajuda, apoio e dedicação dada ao projeto, agradeço aos amigos queridos **Lucas e Renan**.

Em especial ao **Rodrigo Garcia** que além de sua leal amizade e sua ajuda colaborou por ceder seus animais e sua propriedade pra realização do trabalho. E também em especial para **Viviane Codognoto** pela paciência, colaboração e principalmente pela grande amizade que cultivamos esses anos.

A todos meus amigos de vida em especial **Raphael e Diogo**, que disponibilizaram o seu tempo pra me ajudar com o manejo dos animais e por me apoiarem nessa jornada.

Aos meus companheiros de laboratório que sempre demonstraram apoio e estiveram do meu lado.

A faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu- UNESP, incluindo todos os professores e servidores, por permitir a realização de grande parte experimental deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram ao longo dessa jornada para meu conhecimento e desenvolvimento pessoal e profissional. Muito obrigada!



**“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)**

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1-** Processo de obtenção de diferentes frações do leite por microfiltração.....15
- Figura 2-**Obtenção do caseinato de sódio a partir do leite cru desnatado.....15

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Ajuste do equipamento de análise computadorizada dos espermatozoides ovinos.....	4
<b>Tabela 2</b> - Resultados obtidos por análise computadorizada do sêmen descongelado dos oito animais para seleção dos dois machos utilizados no teste de fertilidade.....	7
<b>Tabela 3</b> - Valores médios e erro padrão, mínimo (Min) e máximo (Máx) dos parâmetros obtidos na pré-congelação dos oito animais. ....	9
<b>Tabela 4</b> - Valores médios e erro padrão dos parâmetros cinéticos obtidos através de análise do CASA dos oito animais pós-descongelamento no momento zero. ....	10
<b>Tabela 5</b> - Valores médios e erro padrão dos parâmetros cinéticos obtidos através de análise do CASA dos oito animais pós-congelação no momento 90 minutos (T90/TTR) .....	11
<b>Tabela 6</b> - Valores médios e erro padrão dos parâmetros obtidos por citometria de fluxo pós congelação dos oitos animais em ambos os tempos (Tempo 0 e 90/TTR).....	12
<b>Tabela 7</b> - Resultados obtidos no teste de fertilidade utilizando os machos selecionados e os diferentes diluentes utilizados.....	13

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ALH-amplitude lateral de cabeça  
ALH-movimento lateral de cabeça  
ANOVA-análise de variância  
ATP-adenosina trifosfato  
BCF-frequência de batimento de cauda  
BSPs-binder of sperm proteins  
CASA- análise computadorizada de espermatozoide  
CDFA-diacetato de carboxifluoreceína  
CG-caseinoglicopeptídeo  
cis-PnA -ácido-parinárico  
ConA-Concanavalia ensiformis  
CS-caseinato de sódio  
CSDM- células sem desestabilização de membrana  
DNA- ácido desoxirribonucleico  
eCG -gonadotrofina coriônica equina  
EROs-espécies reativas de oxigênio  
EthD-1- homodímero de etídio-1  
FITC-isotiocianato de fluoresceína  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-peróxido de hidrogênio  
HDL-lipoproteína de alta densidade  
HO<sub>2</sub>- hidropexil  
HOCl-ácido hipocloroso  
HPM- alto potencial mitocondrial  
IA-inseminação artificial  
IAL- inseminação artificial por laparoscopia  
IATF- inseminação artificial em tempo fixo  
LDL-lipoprotéica de baixa densidade  
LIN-linearidade  
MEDIUM- espermatozoides com movimentos médios  
MPAI-integridade das membranas plasmática e acrossomal

MP-motilidade espermática progressiva  
MT-Motilidade espermática total  
O<sub>2</sub>- anion superóxido  
O<sub>2</sub> cel integras- células íntegras com concentração de superóxido  
OEP-Orvus Es Paste  
OH -radicais hidroxil  
PI- iodeto de propídio  
PNA- arachis hypogea  
PN-fosfocaseinato  
PSA-pisum sativum  
RAP- espermatozoides com movimento rápido  
RO- alcóxil  
ROO-peróxil  
RSVP-ram Seminal Vesicles Protein  
SLOW-espermatozoides com movimentos lentos  
STATIC-espermatozoides parados  
STR-retilinearidade  
TALP-PVA-“Tyrodes Albumin, Lactate, Pyruvate” acrescido de polivinilpirrolidona  
TTR- teste de estresse térmico  
VAP-velocidade de trajeto  
VCL-velocidade curvilínea  
VSL-velocidade linear  
ZP-zona pelúcida  
YP-Yo-Pro

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	2
2.1 Célula espermática .....	2
2.2. Membrana Plasmática .....	4
2.3 Congelação.....	6
2.4 Meios Diluidores e Crioprotetores.....	9
2.4.1. Gema de ovo .....	11
2.4.2. Leite e Caseinato de Sódio.....	13
2.4.3 Atuação das caseínas frente às proteínas do plasma seminal .....	16
2.5 Avaliação do Espermatozóide Ovino .....	18
2.5.1. Análise Computadorizada do Sêmen (Computer-assisted semen analysis – CASA).....	20
2.5.2. Integridade de Membrana Plasmática e Acrossomal.....	21
2.5.4 Estresse Oxidativo .....	22
2.6 Teste de fertilidade .....	24
<b>3. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	25
<b>4. REFERÊNCIAS*</b> .....	26
<b>HIPÓTESE</b> .....	42
<b>OBJETIVOS</b> .....	42
<b>CAPÍTULO I</b> .....	1
<b>UTILIZAÇÃO DO CASEINATO DE SÓDIO NA CONGELAÇÃO DE SÊMEN OVINO</b> .....	1
1. Introdução .....	2
2. Material e métodos.....	3
2.1 Aspectos éticos.....	3
2.2. Local do experimento.....	4
2.3. Animais .....	4
3. Delineamento experimental.....	4
3.1. Colheita e Processamento do sêmen .....	4
3.2 Congelação do Sêmen .....	5
3.3 Avaliação do sêmen.....	6

3.4 Teste de fertilidade .....	7
3.5 Análise Estatística.....	9
4. Resultados .....	9
Experimento 2.....	
5. Discussão.....	13
Agradecimentos .....	18
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>18</b>

## RESUMO

SALGADO, L.C. **Utilização do caseinato de sódio na congelação de sêmen ovino**. Botucatu-SP. 2020, 84 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

A congelação de sêmen é uma ferramenta de grande importância na reprodução de animais domésticos, auxiliando na difusão do do material genético, preservando-o por tempo indeterminado, além do maior aproveitamento do uso de reprodutores com genética superior comprovada. Para que a congelação de sêmen seja eficiente e alcance resultados satisfatórios com a inseminação, utiliza-se no processo o emprego de diluentes, que tem como função proteger a célula contra o choque térmico e manter o espermatozoide viável até o momento da inseminação. O uso de frações de leite como meio diluidor tem se tornado muito conhecida e de grande importância no processo, usando, por exemplo, as micelas de caseína que conferem função de proteção da membrana plasmática e manutenção da viabilidade espermática. Levando em conta essas informações, este trabalho teve como objetivo avaliar a ação do caseinato de sódio nas características seminais pós descongelação do sêmen utilizando diluentes a base de gema de ovo (BB) e o mesmo diluente acrescido de caseinato de sódio 2% (BC). No experimento I, foram colhidos 3 ejaculados de 8 animais (n=24) por eletroejaculação, este sêmen foi dividido em duas alíquotas, uma era diluída em meio comercial a base de gema de ovo e a outra alíquota diluída no mesmo meio mas acrescido de 2% de caseinato de sódio, em seguida foram envasadas em palhetas francesas com volume de 0,25 ml e refrigerado 4 horas à 5 °C em seguida congelado em nitrogênio líquido. Após a congelação as amostras foram avaliadas por análise computadorizada do movimento espermático (CASA), integridade de membranas plasmática e acrossomal e geração de anion superóxido e potencial mitocondrial por citometria de fluxo. Então submetidas a estresse térmico por 90min e novamente avaliadas Para o experimento II foi realizado teste de fertilidade “in vivo” utilizando a técnica de inseminação artificial por laparoscopia em 100 fêmeas da raça Dorper e Suffolk, usando o sêmen congelado com os respectivos meios diluentes, de dois animais dentre os oito colhidos no experimento I, um com boa qualidade seminal pós-congelação e o outro com baixa qualidade seminal. Foi realizada estatística descritiva dos resultados e apresentado em média e erro padrão da média, para as avaliações da qualidade seminal utilizou-se o teste t seguido de Tukey quando apresentaram distribuição normal pelo Kolmogorov-Smirnoff, e quando não utilizou-se o teste de Friedman seguido de Dunn. Para a Fertilidade utilizou-se modelo de regressão logística multivariada. Os resultados de cinética espermática apresentaram diferença estatística para os parâmetros de velocidade média de trajeto e velocidade curvilínea no grupo congelado com BotuBov e velocidade em linha reta e linearidade, o grupo acrescido de caseinato. Após o estresse térmico (T90) o BB manteve-se superior para os



valores de VAP e VCL ( $P < 0.05$ ) e foi maior numericamente no VSL ( $P = 0.06$ ), enquanto o BC se manteve-se superior apenas no LIN ( $P < 0.05$ ). Nas avaliações por citometria de fluxo, foi observado logo após a descongelação que o BC foi superior nas células com membrana plasmática estabilizadas ( $P < 0.05$ ), apresentou maiores valores na porcentagem de células com alto potencial mitocondrial ( $P = 0.08$ ) e células com membrana plasmática e acrossomal integras ( $P = 0.09$ ), enquanto que na porcentagem de células com alta geração de anion superóxido, apresentou menores valores do que BB ( $P = 0.07$ ). Após o estresse térmico, o BC foi numericamente maior na porcentagem de células com alto potencial e mitocondrial e células com membrana plasmática e acrossomal integras ( $P = 0.06$ ). No teste de fertilidade não houve diferença estatística. Concluiu-se que apesar de apresentarem apenas algumas diferenças estatísticas, os parâmetros de cinética espermática mostraram-se favoráveis ao grupo contendo caseinato de sódio em sua composição, assim como no teste de fertilidade, demonstrando que o uso do caseinato de sódio no meio diluente pode ser uma alternativa favorável para a criopreservação do sêmen na espécie ovina.

**Palavra-chave:** diluente, gema de ovo, caseinato, congelação.

## ABSTRACT

SALGADO, L.C. **Utilização do caseinato de sódio na congelação de sêmen ovino.** Botucatu-SP. 2020, 84 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

The reproduction of domestic animals, helping in the diffusion of the genetic material, preserving it indefinitely, in addition to the greater use of reproducers with proven superior genetics. In order for semen freezing to be efficient and achieve satisfactory results with insemination, the use of diluents is used in the process, which has the function of protecting the cell against thermal shock and keeping the sperm viable until the time of insemination. The use of milk fractions as a diluting medium has become very well known and of great importance in the process, using, for example, the casein micelles that provide a protective function of the plasma membrane and maintenance of sperm viability. Taking this information into account, this study aimed to evaluate the action of sodium caseinate on semen characteristics after semen thawed using egg yolk (BB) diluents and the same diluent plus 2% sodium caseinate (BC) In experiment I, 3 ejaculates were collected from 8 animals ( $n = 24$ ) by electroejaculation, this semen was divided into two aliquots, one was diluted in commercial medium based on egg yolk and the other diluted in the same medium but added of 2% sodium caseinate, then they were packaged in French straws with a volume of 0.25 ml and refrigerated 4 hours at 5 ° C then frozen in liquid nitrogen. After freezing, the samples were evaluated by computerized analysis of sperm movement (CASA), integrity of plasma and acrosomal membranes and generation of superoxide anion and mitochondrial potential by flow cytometry. Then subjected to heat stress for 90 minutes and again evaluated. For experiment II, an in vivo fertility test was performed using the artificial insemination technique by laparoscopy on 100 Dorper and Suffolk females, using frozen semen with the respective diluents, of two animals among the eight harvested in experiment I, one with good seminal quality after freezing and the other with low seminal quality. Descriptive statistics of the results were performed and presented as mean and standard error of the mean. For the evaluations of seminal quality, the t test was used followed by Tukey when they presented normal distribution by the Kolmogorov-Smirnoff, and when the Friedman test was not used. followed by Dunn. For fertility, a multivariate logistic regression model was used. The results of sperm kinetics showed statistical difference for the parameters of mean path speed and curvilinear speed in the group frozen with BotuBov and speed in a straight line and linearity, the group plus caseinate. After thermal stress (T90), BB remained higher for VAP and VCL values ( $P < 0.05$ ) and

was higher numerically in VSL ( $P = 0.06$ ), while BC remained higher only in LIN ( $P < 0.05$ ). In evaluations by flow cytometry, it was observed right after thawing that BC was superior in cells with stabilized plasma membrane ( $P < 0.05$ ), presented higher values in the percentage of cells with high mitochondrial potential ( $P = 0.08$ ) and cells with integral plasma and acrosomal membrane ( $P = 0.09$ ), while in the percentage of cells with high generation of superoxide anion, it presented lower values than BB ( $P = 0.07$ ). After thermal stress, BC was numerically higher in the percentage of cells with high potential and mitochondrial and cells with integral plasma and acrosomal membrane ( $P = 0.06$ ). In the fertility test, there was no statistical difference. It was concluded that despite having only a few statistical differences, the parameters of sperm kinetics were favorable to the group containing sodium caseinate in their composition, as well as in the fertility test, demonstrating that the use of sodium caseinate in diluent medium may be a favorable alternative for cryopreservation of semen in sheep.

**Keyword:** diluent, egg yolk, caseinate, freezing

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A ovinocultura brasileira é composta por um rebanho de aproximadamente de 17,9 milhões de cabeças distribuídas por todo o território brasileiro, porém, mais concentradas principalmente nas regiões sul e nordeste (IBGE, 2017). São criados predominantemente em sistema semi-intensivo (SOUZA et al., 2008), sendo a produção de carne e seus subprodutos o principal setor da atividade (STAUDT; SILVA, 2008).

Considerando seu potencial econômico, é admissível pensar em alternativas que elevem a produtividade de ovinos (NEVES, 1990), justificando assim a utilização de biotecnologias reprodutivas, como a inseminação artificial, uma alternativa que tem como intuito a melhoria da produção em um intervalo curto de tempo, levando em consideração o melhoramento genético do rebanho e a capacidade reprodutiva de animais com genética de alta linhagem (BARUSELLI et al., 2004; ARRUDA et al., 2011).

Para o emprego da inseminação artificial, se faz necessário a congelação do sêmen, tornando-se fundamental o conhecimento de particularidades da espécie em questão para o sucesso nesse processo. Peculiaridades reprodutivas são observadas em ovinos, como a composição da membrana celular do espermatozoide, ocasionando dificuldades no processo de congelação fazendo com que os resultados desta técnica não sejam completamente satisfatórios (QUINN; WHITE, 1969 QUINN et al., 1980), visto que a congelação leva a uma capacitação precoce do espermatozoide (LOPEZ-BREA, 1995; HOLT, 2000).

O processo de congelação leva a alterações morfológicas e funcionais dos espermatozoides, como redução da função mitocondrial, diminuição dos parâmetros de cinética espermática e mudanças na integridade das membranas além de reduzir a fertilidade (GILLAN et al., 2004; CELEGHINI, 2005). O uso de um meio de conservação utilizado no processo de congelação fornece um ambiente que mantém a função e a integridade das membranas, o mesmo é obtido por combinações variadas de componentes (CELEGHINI, 2005).

Para que a congelação de sêmen seja eficiente vem se investido no uso de diluentes que possuem em sua composição substâncias que protegem a célula contra o choque térmico ocasionado pelo processo de congelação,

fornecendo substratos necessários ao metabolismo espermático, estabilizando o pH, inibindo o crescimento bacteriano e mantendo o espermatozoide viável até o momento da inseminação (BORTOLOZZO et al., 2005).

Na espécie ovina diferentes componentes são utilizadas em seus diluentes sendo o mais comum a gema de ovo, usada na congelação de sêmen da espécie bovina (DAVIS et al., 1963), que tem como função proteger os espermatozoides contra o choque térmico a partir de lipoproteínas de baixa densidade que se fixam fortemente ao espermatozoide, sendo a principal proteína a lipoproteína 3 (FOULKES, 1977; AMANN & GRAHAM, 1993).

Uma alternativa à gema do ovo são diluentes à base de caseínas, que são fosfoproteínas encontradas no leite bovino, exercendo como função a estabilização da membrana plasmática dos espermatozoides por diminuïrem a perda de lipídios integrais (MANJUNATH, 2012; PLANTE et al., 2015) mantendo a viabilidade e motilidade durante a congelação, fazendo com que ocorra diminuição da perda de lipídios e diminuindo também a ligação de proteínas aglutinantes que são prejudiciais aos espermatozoides (BERGERON et al., 2007).

Diante disso ainda há grande necessidade de melhorias nas técnicas de congelação de sêmen, sendo o objetivo deste estudo avaliar o diluente a base de gema de ovo com ou sem adição de caseinato de sódio na congelação de sêmen ovino, com a finalidade de melhorar a qualidade do sêmen congelado aumentando assim as taxas de fertilidade a campo gerando acréscimos à produção e reprodução da espécie.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Célula espermática**

A morfologia espermática é de extrema importância como indicador de fertilidade, funcionando como um parâmetro de danos espermáticos gerados por agentes físicos ou químicos, importante tanto em homens quanto nos animais. Em razão disso, rotineiramente o estudo e classificação da morfologia do espermatozoide tem se tornado essencial na análise de sêmen (VERSTEGEN et al., 2002; GARCIA-HERREROS et al., 2006).

A espermatogênese é um processo complexo e ordenado que ocorre no interior dos túbulos seminíferos, é a função exócrina do testículo, onde as células

espermatogonais se transformam em espermatozoides após passarem por diversas modificações (HESS e FRANÇA, 2008; HERMO et al. 2010). O processo espermatogênico se caracteriza por uma série de eventos moleculares, bioquímicos e celulares que ocorrem dentro dos túbulos seminíferos (LUO et al., 2011).

A duração do ciclo do epitélio seminífero é particular para cada espécie, e corresponde ao tempo em que uma espermatogônia inicia seu ciclo até a efetiva formação do espermatozoide (SENGER, 2003). Já que na espécie ovina este ciclo tem uma duração aproximada de 10,57 dias e o tempo abrangido entre a mitose de uma espermatogônia até a liberação do espermatozoide no lúmen do túbulo seminífero corresponde a 42,28 dias (CARDOSO e QUEIROZ, 1988).

O sêmen é composto por um líquido contendo presença de espermatozoide e secreções (plasma seminal) das glândulas acessórias (vesiculares, bulbo uretrais e próstata), do ducto deferente, do testículo e do epidídimo. Sendo que o plasma seminal é de grande importância na monta natural, já que ele serve com protetor e carreador dos espermatozoides (HAFEZ E HAFEZ, 2004), além disso é composto por diversas proteínas, açúcares, enzimas, hormônios entre outros compostos (VIEIRA-NETO, 2017).

No momento que a célula germinativa se transforma em espermatozoides, essa célula se alonga e são formadas a cabeça e cauda (flagelo), onde a cauda subdividida em 3 partes: peça intermediária, principal e terminal (HAFEZ E HAFEZ, 2004). Simplificadamente os espermatozoides são células haploides, alongadas e é constituído principalmente por cabeça e cauda, que são unidas por uma região chamada de colo (FLESCH E GADELLA, 2000).

A cabeça apresenta formato arredondado e achatado, onde sua porção superior encontra-se o acrossoma, sendo constituída basicamente por uma pequena porção de citoplasma e o núcleo (FLESCH E GADELLA, 2000). O tamanho e formato da cabeça dos espermatozoides pode ser diferente de acordo com a espécie, além disso quando analisadas populações de espermatozoides em avaliações morfológicas de rotina pode não se notar que essa população do mesmo ejaculado apresente características morfológicas heterogêneas (RUBIO-GUILLÉN et al., 2007; RAMON et al., 2014). O núcleo do espermatozoide que se encontra na cabeça possui uma cromatina altamente condensada devido a

um evento conhecido como protaminação, onde protaminas substituem as histonas do DNA, levando a uma condensação acentuada da cromatina e é envolto pelo envelope nuclear (FLESCH E GADELLA, 2000; BALHORN, 2007).

A parte da cauda do espermatozoide é composta por colo que conecta a cabeça com a cauda, a cauda é composta por peça intermediária, principal e terminal (KNOBIL E NEILL, 2006). Essa cauda é formada por uma estrutura chamada axonema que é composta por dois microtúbulos centrais e envoltos por nove pares de microtúbulos radialmente disposto e ao redor deles (MORTIMER, 2000), mas à medida que chegam ao final dessa cauda os túbulos duplos vão se dissociando e sumindo, do qual o último a sumir é o túbulo central (BARTH E OKO, 1989).

Existe um conjunto de mitocôndrias localizadas na peça intermediária circundando o axonema e dispostas em espiral, que tem função de gerar energia para o batimento da cauda através de produção de ATP. Cada região da membrana plasmática apresenta funções e domínios específicos, como a que cobre a cabeça, que tem função de realizar interação com o oócito, a que cobre a peça intermediária e onde se localiza também as mitocôndrias, tem ligação com o influxo de cálcio (SINGH E RAJENDER, 2015; VICENTE-CARRILLO et al., 2016) e a produção de ATP gerando energia, sendo um dos precursores do início da motilidade (FLESCH E GADELLA, 2000).

## **2.2. Membrana Plasmática**

As membranas espermáticas são estruturas especializadas que exercem funções de grande importância para a fecundação, composta por lipídeos que desempenham papel biológico, como moléculas alimentares, promovem integridade estrutural da membrana e depósito de energia altamente concentrado (ARRUDA et al., 2011). Para que mantenha a viabilidade do sêmen é necessário que se mantenha a integridade de membrana espermática, mantendo assim suas características como a sua homeostase preservando suas características de motilidade, requisitos indispensáveis para manutenção da capacidade de fecundação espermática.

O espermatozoide é coberto por membrana plasmática que é composta por fosfolipídios, a qual tem diferença de acordo com a região. Essa membrana estabelece canais através de suas extremidades hidrofóbicas externas e

hidrofílicas internas, deixando que haja passagem de íons e pequenas moléculas, havendo uma desestabilização e causando danos irreversíveis a essa membrana reduzindo a viabilidade celular (COSTA, 2015).

A estrutura da membrana plasmática sofre mudanças constantes de seus componentes e sua disposição por apresentarem movimentação livre. Este processo de movimentação esta diretamente relacionada com a fluidez da membrana, quando está em temperatura ambiente passa por uma fase chamada de liquido-cristalino. Além disso essa fluidez pode sofrer influência pela proporção de colesterol: lipídeo e os lipídeos presentes (AMANN e GRAHAM, 2010). Sendo assim quanto maior a quantidade de colesterol presente nessa membrana menos permeável, fluída e flexível ela se torna (AMANN e GRAHAM, 2010; ALBERTS, 1994; GIRAUD, 2000). A membrana plasmática apresenta maior resistência à célula espermática criopreservada devido a sua fluidez. (GIRAUD et al., 2000).

A maior quantidade entre os fosfolipídios encontrados nessa membrana são as fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina e esfingomielina. As duas primeiras se encontram no folheto interno, enquanto as duas últimas estão inseridas no folheto externo da bicamada. A fosfatidilserina se desloca dos folhetos internos para os externos quando ocorrem danos graves à membrana, como resfriamento e congelação (GRAHAM, 2010; SILVA; GUERRA, 2011). Outro constituinte da membrana plasmática é o ácido docosahexanóico, principal ácido graxo presente na maioria dos mamíferos. Outro ácido é o docosapentanóico, sendo o principal constituinte da membrana em espécies como os equinos, ovinos e aves (GARCIA et al., 2011). O esteroide predominador é o colesterol que tem função de estabilização da membrana, preenchendo os espaços entre as cadeias de ácidos graxos e de fosfolipídios. Além disso, tem maior concentração na face extracelular devido a sua distribuição não ser uniforme na membrana (CROSS, 1998).

Englobando todos componentes intracelulares e revestindo toda a célula espermática, a membrana plasmática contém organelas que têm como função manter um gradiente químico de íons e de outros elementos solúveis, por sua permeabilidade entre os meios intracelulares e extracelulares (BRANDÃO, 2008). A membrana também atua como uma barreira seletiva para componentes



presentes no meio intra e extracelular. Cada região da membrana possui sítios de ligação com afinidades altamente específicas a determinadas moléculas (GWATHEMEY et al., 2006).

Relatos realizados por Poulos et al. (1973), demonstraram que existe maior presença de lipídios de cadeia insaturada na membrana plasmática em espécies com menor resistência à congelação. Wales & White (1959) relataram a existência de uma relação direta entre a resistência ao choque frio com o teor de colesterol presente nas células, o que significa, que quanto menor o teor de colesterol nas células, menor é a resistência ao choque frio.

Assim, é necessário a busca de elementos que consigam aumentar a proteção das células espermáticas, sendo que o conhecimento de meios diluentes a base de gema de ovo em sua composição de fosfolipídios, podem proteger a célula espermática, minimizando as injúrias causadas pelo processo de congelação. (MEDEIROS et al., 2002).

### **2.3 Congelação**

Um dos ramos da biologia é a criobiologia, responsável por estudar os efeitos de baixas temperaturas sobre tecidos, células e organismo vivos. Com os resultados obtidos pelo estudo da criobiologia foi criada a congelação, uma técnica desenvolvida para preservação de células, tecidos e embriões abaixo do ponto de congelação da água, tendo como propósito manter a viabilidade das células por tempo indeterminado preservando sua composição (PEGG, 2002).

Entre muitas vantagens da técnica está a capacidade de transporte e armazenamento por extensos períodos de tempo, possibilitando a conservação de sêmen de um reprodutor para uma futura inseminação e uso de combinações genéticas de animais situados em propriedades de longas distancias, além de oferecer um controle de propagação de doenças e contaminantes (FERNANDES, 2012).

O processo de congelação mantém a vida útil de um espermatozoide por um período de tempo indeterminado sendo mantido a uma temperatura de -196°C em nitrogênio líquido, contudo uma enorme gama desses espermatozoides não consegue sobreviver ao processo de congelação e descongelação (NOAKES et al., 2001).

Assim como os eventos fisiológicos que ocorrem nas células de reação acrossomal e de capacitação espermática, o processo de congelação é conhecido por gerar danos as organelas, preferencialmente alterações nas membranas. (BAILEY et al., 2000). No processo de congelação, os espermatozoides estão sujeitos a diferentes fatores estressantes como: formação e dissolução de cristais de gelo, desidratação, aumento da concentração dos solutos, transição de fase dos fosfolípidios da membrana, estresse osmótico e tóxico pela adição e remoção de crioprotetores (BORTOLOZZO et al., 2008).

Diferentes processos fisiológicos são vistos durante a capacitação dos mecanismos envolvidos na troca dos lipídeos do meio interno pro meio externo da membrana, como efluxo de colesterol e fosforilação da tirosina, que são vistas nos espermatozoides criopreservados (SILVA e GADELLA, 2006). Semelhante a capacitação espermática, a congelação causa fluidez e exposição dos sítios de ligação á moléculas externas da membrana, exigindo rapidez na capacitação da célula (THOMAS et al., 2006).

A curva de congelação com mudança de temperatura de 5°C positivos indo até 50 °C negativos determina se as células espermáticas passarão por uma ultracongelação, podendo haver crescimento do gelo intracelular ou se permanecerão em equilíbrio com o seu meio extracelular (WATSON, 2000). Para evitar uma desidratação dos espermatozoides, utiliza-se muito a congelação rápida, que por sua vez, causa menos danos à célula (AZEVEDO et al.,2000). A técnica de resfriamento rápido do sêmen entre temperaturas de 30°C a 0°C pode levar a um estresse letal para algumas células, sendo este estresse ocasionado devido ao intervalo de temperatura, ao limite de temperatura e a taxa de resfriamento. Afetando variavelmente as espécies esse processo é conhecido e chamado como choque térmico (WATSON, 2000). Deve sempre levar em consideração que para encontrar a curva ideal para congelação, ela seja rápida evitando que a célula espermática se exponha muito tempo á altas concentrações de solutos mas também deve ser lenta o suficiente para deixar que os espermatozoides se desidratem (SNOECK, 2003).

O processo de congelação do sêmen associado à técnica de inseminação artificial (IA), trazem benefícios aos programas de seleção e melhoramento

genético, atuando como ferramenta para acelerar o resultado genético dos rebanhos. Mesmo com esses avanços já obtidos no campo da biotecnologia, as taxas de sobrevivência dos espermatozoides que passaram por congelação ainda são baixas, devido à crioinjúrias estruturais, funcionais e bioquímicas nos diversos componentes presentes na composição da célula (WATSON, 2000). O processo de criopreservação interfere na qualidade e viabilidade dos espermatozoides. As etapas do processo de congelação, as quais fazem parte a diluição, refrigeração congelação e descongelação, reduzem a capacidade fecundante dos espermatozoides utilizados para a inseminação artificial (LECEWICZ et al. 2018).

Na espécie ovina o sêmen apresenta maior sensibilidade ao choque térmico, calcula-se que 40-50% dos espermatozóides não sobrevivam ao processo de congelação/dcongelação, mas aqueles que sobrevivem mantém a sua capacidade fertilizadora (MAXWELL E WATSON, 1996; WATSON, 2000).

Como relatado por Jones e Mann (1977), o espermatozoide de ovinos sofre alterações estruturais devido sua alta susceptibilidade à peroxidação dos fosfolipídios presentes na membrana plasmática, sendo essas mudanças observadas principalmente na região acrossomal, levando a modificações no metabolismo e conteúdo celular, e irreversíveis alterações da motilidade espermática. A severidade das lesões ocasionadas pelo choque térmico no processo de refrigeração depende da quantidade de colesterol presente na membrana da célula espermática. O espermatozoide ovino é mais susceptível ao choque térmico por possuírem taxa mais alta de ácidos graxos, mas esse choque pode ser prevenido controlando o tempo e taxa de resfriamento deste sêmen (MADEIRA et al, 2013).

Nos protocolos de congelação mais conhecidos e utilizados, os espermatozoides são diluídos em um meio contendo crioprotetor e em seguida são envasados em palhetas e depois submetidos a uma curva de congelação com vapor de nitrogênio líquido (SALAMON & MAXWEL, 2000). De maneira geral, o sêmen passa por um processo de congelação lento e é armazenado em palhetas, usando vários diluentes que já são utilizados para refrigeração e diluição com associação de substância crioprotetoras.

## 2.4 Meios Diluidores e Crioprotetores

A interação entre meios diluidores e os espermatozoides é fator indispensável para a manutenção da capacidade fecundante da célula (MANJUNATH et al., 2002).

Basicamente meios diluidores utilizados para congelação são compostos por açúcares como exemplo: frutose e glicose que atuam como fonte energética para os espermatozoides e ajudam a manter a pressão osmótica. Já os crioprotetores podem ser penetrantes ou não penetrantes, os não penetrantes exemplo o glicerol, que age protegendo a célula, diminuindo o ponto de congelação da água, ou as substâncias tampão e sais (Tris e citrato de sódio), que mantêm o potencial Hidrogeniônico do meio - pH, e também os antibióticos (penicilina e estreptomicina) que atuam inibindo o crescimento microbiano, e os não penetrantes como leite ou gema de ovo agem fazendo proteção extracelular (GIBBONS, 2002; PURDY, 2006). Substâncias antioxidantes também podem ser adicionadas aos diluidores para reduzir os danos gerados através do estresse oxidativo na congelação do sêmen (GUERRA et al., 2004).

A constituição dos meios diluidores é feita de substâncias que permitem a conservação da membrana plasmática, diante da estabilização do pH do meio, proteção contra choque térmico e neutralização de agentes tóxicos produzidos pelos próprios espermatozoides. Devem também manter o equilíbrio eletrolítico e osmótico, inibir o crescimento bacteriano e fornecer energia (FURT, 2006). Então de maneira geral os meios diluidores devem conter carboidratos, para energia, tampões para manter o pH e pressão osmótica, em especial na espécie ovina, recomenda-se pH= 6,8 e osmolaridade 300 mOsm e antibióticos que inibam o crescimento bacteriano. Conforme os espermatozoides são resfriados até 5°C é importante à presença de crioprotetores não penetrantes que façam a proteção contra esse choque frio além de oferecer nutrição e/ou crioprotetores penetrantes que protejam a células dos danos deletérios da congelação (HAFEZ e HAFEZ, 2004; PURDY, 2006; OLIVEIRA et al., 2011).

Na nomenclatura crioprotetor significa qualquer substância que ofereça temporariamente, proteção aos danos ocasionados pela redução de temperatura, energia e manutenção de ambiente adequado à sobrevivência da célula armazenada (PURDY, 2006). Os crioprotetores são fundamentais para sobrevivência dos espermatozoides na congelação, tendo como função

minimizar e controlar os efeitos adversos na célula no decorrer do processo de congelação e descongelação (ROSSI et al., 2003).

No desenvolvimento de estudos utilizando substâncias com o propósito de diminuir a injúrias causadas nas células durante o processo de congelação, sendo que os crioprotetores tem se mostrado bastante eficientes para realizar tal função. Também utilizados no processo de congelação do sêmen de diferentes espécies, reduzem o estresse osmótico por intermédio da reposição de água necessária para manutenção do volume celular, impede a formação de cristais de gelo grandes intracelularmente, interage com íons e macromoléculas, reduz o ponto de congelação da água, servindo desta maneira como um tampão para ajustes de possíveis alterações do potencial de hidrogênio - pH (MEDEIROS et al., 2002)

Os compostos dos crioprotetores utilizados no processo de congelação do sêmen são divididos em duas classes: não penetrantes e penetrantes. A primeira classe de crioprotetores não penetrantes é representada por macromoléculas com peso molecular alto, como exemplo os açúcares complexos (rafinose, trealose), água de coco, lipoproteínas da gema de ovo (NUNES, 2002), proteínas do leite e alguns aminoácidos que atuam por meio de osmose, provocando a evasão de água do interior da célula e prevenindo que cristais de gelo se formem no meio intracelular (AMANN & PICKETT, 1987). Os crioprotetores mais utilizados são os feitos a base de glicina- gema, glicina-gema-leite, água de côco, citrato-açúcar, gema, leite ou leite desnatado, lactose, sacarose, rafinose e os formulados a base de Tris-gema de ovo (SALAMON E MAXWELL, 2000 citados por BITTENCOURT et al., 2013).

Já a classe de penetrantes são substâncias que têm a capacidade de penetrar no interior da célula espermática. Ela se subdivide em dois grupos: amidas e alcoólicos (ASHWOOD-SMITH, 1987 ALVARENGA et al., 2005). Como crioprotetores amidas encontramos a lactamida e acetamida (KASHIWAZAKI et al., 2006), a dimetilacetamida (CALDERAM et al., 2008) e a dimetilformamida (OLIVEIRA et al., 2009), já os alcoólicos utilizados para conservação espermática, são principalmente o glicerol, dimetilsulfoxido (DMSO) e etilenoglicol Os crioprotetores penetrantes agem através da substituição parcial

e também pela ligação aos próprios eletrólitos à água, precavendo a exposição do material à altas concentrações de eletrólitos (CASTRO et al., 2011).

O crioprotetor penetrante mais utilizado na congelação do espermatozoide ovino é o glicerol. Quando utilizado para sêmen congelado pelo método de congelação espermática rápida, ou o de pellets, as melhores taxas de sobrevivência espermática são obtidas com 3 a 4% de glicerol, já no diluidor através do método convencional lento e com o uso, principalmente, de diluidores hipertônicos, a maioria dos estudos demonstraram que as melhores concentrações de glicerol se encontram entre 6% a 8% (SALAMON & MAXWELL, 2000).

Diferentes diluentes para congelação do sêmen ovino têm sido estudados, entre eles os mais utilizados são aqueles com base de citrato-açúcar-gema, leite ou leite desnatado, lactose, sacarose, rafinose e os formulados com TRIS-gema de ovo (SALAMON & MAXWELL, 2000), de glicina-gema, glicina-gema-leite (GONZALEZ et al., 1999) e água de coco (NUNES, 1998).

#### **2.4.1. Gema de ovo**

A gema do ovo começou a ser estudada na congelação de sêmen da espécie bovina (PHILLIPS & LARDY, 1940), apresentando resultados satisfatórios, quando comparados aos meios suplementados apenas com glicose, com aumento considerável da viabilidade espermática. A partir de então o mesmo diluente a base de gema de ovo foi utilizado para a conservação do sêmen da espécie ovina (DAVIS et al., 1963).

A proporção de gema de ovo utilizada para a congelação de sêmen é de 10 a 20%, sendo que as lipoproteínas contidas nesse substrato são de baixa densidade interagindo com a estrutura lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides (BERGERON & MANJUNATH, 2006). A gema de ovo também atua aumentando a tolerância dos espermatozoides em soluções hiposmóticas e hiperosmóticas, como protetor osmótico. Assim, a sua adesão à membrana, exerce proteção durante a congelação, dada pela fração lipoprotéica de baixa densidade (LDL) (BOUSSEAU et al., 1998; BERGERON e MANJUNATH, 2006)

A gema esta presente no meio diluidor, com ação crioprotetora, protegendo contra o choque pelo frio durante a refrigeração dos espermatozoides. A causa desse efeito é atribuída à sua composição de

lipoproteína de baixa densidade (LDL), ela adere à membrana espermática, levando ao influxo de fosfolípidios e colesterol pela membrana plasmática. Além disso, o LDL forma complexos com proteínas plasmáticas que fazem contato com o espermatozoide durante a ejaculação, impedindo o efluxo de fosfolípidios e colesterol da membrana espermática (Corcini et al., 2016).

A principal função da gema de ovo é proteger e estabilizar as membranas biológicas, diminuindo o efeito prejudicial do choque térmico, porém, o mecanismo de ação que concede essa proteção durante o congelamento do sêmen, ainda não está completamente esclarecido, sendo levantadas diversas hipóteses sobre o real desempenho da gema de ovo na célula espermática (HOLT, 2000).

Os componentes da gema de ovo são variados, visto que é um composto de origem animal e pode conter composições variadas devido as diferentes práticas empregadas no manejo alimentar das aves (BRAGA et al., 2005; RIBEIRO et al., 2007). Apresenta uma composição de 49,0% de umidade e 51,0% de sólidos totais, sendo que, destes, 30,9% são lipídeos totais (BARRETO et al. 2006). A composição dos lipídios é mais de 62% triglicérides, 33% fosfolípidos e menos de 5% colesterol, sendo menos de 1% dos lipídios da gema os carotenoides (ANTON et al., 2009). Além disso, por ser um composto biológico com presença de vitaminas, fosfolípidios, proteínas, glicose, antioxidante e componentes bactericidas é difícil definir toda a sua composição (HOUPALATHI et al., 2007).

De acordo com estudo realizado por Monreal e colaboradores (2014) a gema de ovo com objetivo de encontrar melhores índices na congelamento e na descongelamento mostrou-se satisfatória na criopreservação, agindo de maneira protetora, preservando a integridade estrutural e fornecendo proteção osmótica a membrana espermática devido a presença de lecitina e os lipídeos encontrados na gema.

Segundo estudo de WATSON (1995) a gema de ovo previne o dobramento de cauda dos espermatozoides que é provocado pelo choque térmico frio e protege a motilidade espermática. O uso da gema de ovo no meio diluidor apresentou melhoras pós-descongelamento do sêmen com uma maior taxa de motilidade e uma menor porcentagem de lesão de acrossoma (47% e 25%,

respectivamente), comparadas com amostras pós-congelação sem conter gema de ovo (19% para motilidade e 33% para lesão acrossomal) (DASKIN & TEKIN, 1996).

Em estudo Valente et al. (2010), observaram melhor termorresistência, fertilidade “*in vitro*” e “*in vivo*” pós-descongelação ao usarem diluente contendo gema de ovo na congelação de sêmen ovino quando comparado a tentativa retirar parcialmente ou totalmente da gema de ovo no diluente, alterando a sua constituição com suplementação de trealose e glicina, associada à substituição da glicose pela frutose, mais facilmente metabolizada pelo espermatozoide, notou-se que não foi capaz de compensar a insuficiência da gema de ovo. Teoricamente vale destacar que no processo de congelação e descongelação o grau de lesão encontrado é exposto durante a incubação espermática pós-descongelação, uma vez que quanto menor a longevidade destes gametas no trato feminino, maior o dano latente (BAG et al., 2004).

#### **2.4.2. Leite e Caseinato de Sódio**

O leite é constituído por proteínas totais (3,3 a 3,5%) e por proteínas provenientes do soro (20%) (DE KRUIF; HOLT, 2003). Estas proteínas são divididas em quatro grupos, sendo classificadas de acordo com suas estruturas e propriedades físico-químicas, se destacando o grupo das caseínas representando 80% das proteínas presentes no leite bovino (LOURENÇO, 2000; DE KRUIF; HOLT, 2003).

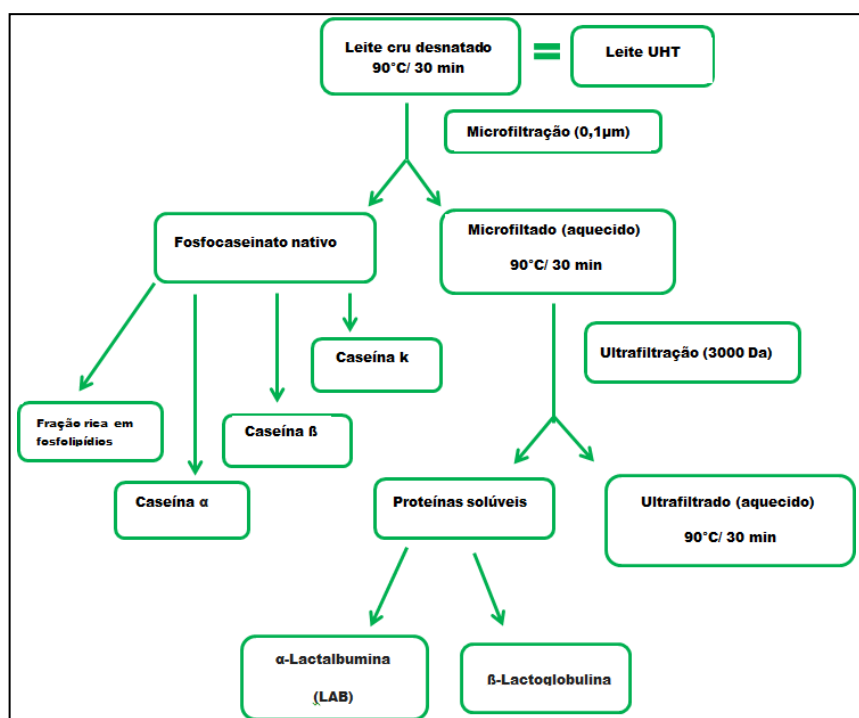
As caseínas são encontradas em quatro frações no leite:  $\alpha$ 1 - caseína,  $\alpha$ 2 - caseína,  $\beta$  - caseína e k - caseína, e as  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina as principais proteínas do soro (MANJUNATH, 2012; McMAHON, OOMMEN, 2012; MENEZES et al., 2016; SILVA et al., 2019).

No leite as caseínas são encontradas na forma de micelas de caseínas (SILVA et al., 2019). Estas micelas são constituídas por caseínas, água e minerais, principalmente fosfato de cálcio, que funcionam como substâncias modeladoras com o intuito de manter sua integridade micelar, o que resulta em uma supramolécula coloidal dinâmica que se altera em função das mudanças nas condições físico-químicas como pH, temperatura, presença de enzimas, entre outros (McMAHON, OOMMEN, 2012; SILVA et al., 2019).



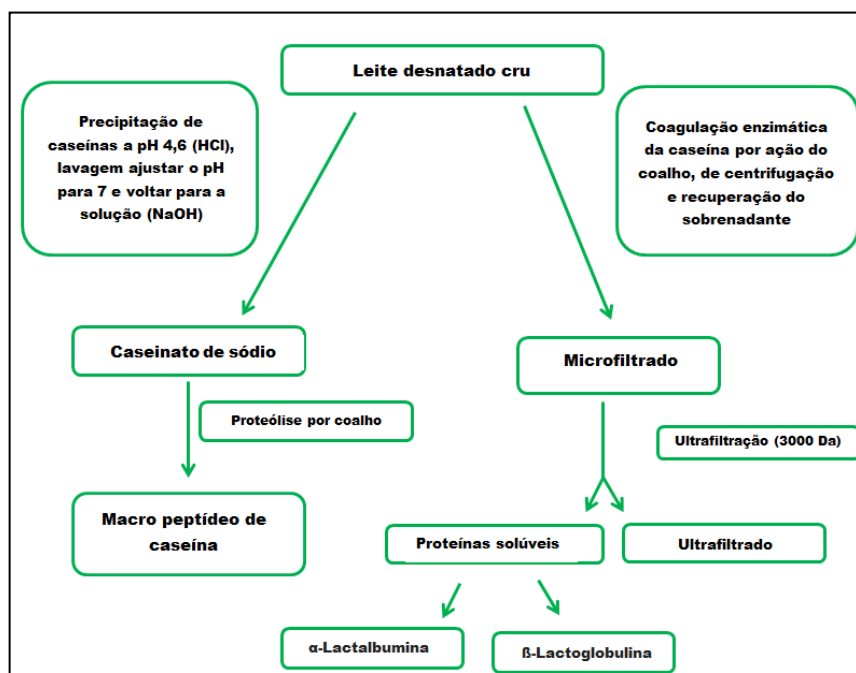
Constituintes do leite foram descritos por suas atividades auxiliando em propriedades de preservação do sêmen em baixas temperaturas (4°C) ou na congelação do mesmo (ALMIQUIST et al., 1954). Desse modo, estudos investigando as propriedades do leite demonstraram que sua ação protetora é significativa tanto para o leite desnatado quanto para o leite integral (ALMIQUIST et al., 1954; FOOTE et al., 2002), inferindo que os lipídeos, ausentes no leite desnatado, não oferecem proteção ao espermatozoide durante o armazenamento ou criopreservação (BERGERON & MANJUNATH, 2006).

A partir do fracionamento do leite cru utilizando-se técnicas de microfiltração, ultrafiltração, diafiltração e liofilização, desenvolveu-se o estudo de meios diluentes utilizando frações purificadas do leite agindo de acordo com a sua capacidade de preservação do sêmen (BATTELLIER, 1997) (Figura 1).



**Figura 1:** Processo de obtenção de diferentes frações do leite por microfiltração. Adaptado de Batellier (1997).

Posteriormente ao fracionamento foi encontrada uma fração com alto potencial protetor, chamado de fosfocaseinato nativo, que foi repartido em quatro subdivisões (caseína  $\alpha$ , caseína  $\beta$ , caseína k e fração rica em fosfolípidios)  $\alpha$  lactalbumina e  $\beta$  lactoglobulina (Figura 2) (BATELLIER, 1997).



**Figura 2:** Obtenção do caseinato de sódio a partir do leite cru desnatado. Adaptado de Batellier (1997).

Utilizando a caseína ácida seca como matéria prima e realizando modificações no processo já feito no leite cru se observou a sintetização do caseinato de sódio, forma não micelar da caseína (BATELLIER, 1997; BARRAQUIO; VAN DE VORT, 1991).

Ganhando um destaque entre diversos compostos do leite, o fosfocaseinato apresentou desempenho efetivo no processo de congelação do sêmen, devido sua forte ligação com íons de  $\text{Ca}^{++}$  mostrando capacidade de proteção à membrana plasmática (HOCHACHKA, 1986; PAGL et al., 2006). Em estudo realizado por Batellier (1997), com objetivo de testar um meio que conferisse melhor qualidade na proteção as células espermáticas, realizou-se a comparação entre um meio com proteínas solúveis (originada do leite cru), fosfocaseinatos nativos e meio base contendo solução de sais de Hank's, glicose, lactose e com a adição de caseína  $\beta$  e verificou-se melhor capacidade protetora do fosfocaseinato nativo, no entanto apresentou resultados similares ao fosfocaseinato ativo o caseinato de sódio em relação ao processo de refrigeração por 96 horas.

Dessa maneira, a hipótese é que as micelas de caseínas oferecem proteção ao sêmen durante a congelação de sêmen de cavalos, ovinos e bovinos (CHOONG & WALES, 1962; MARTIN, 1966; BATELLIER et al., 1997). Entretanto, ainda não foram elucidadas como as micelas de caseínas protegem

o espermatozoide durante o processo de congelação (BERGERON & MANJUNATH, 2006).

### **2.4.3 Atuação das caseínas frente às proteínas do plasma seminal**

Proveniente das glândulas sexuais acessórias, testículos e epidídimo, o plasma seminal compõe a porção fluida do sêmen durante a ejaculação. Tem como função o transporte e proteção das células espermáticas, sendo de extrema importância na monta natural, principalmente em ovinos e bovinos, onde o ejaculado é disposto direto na vagina (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

As proteínas do plasma seminal desempenham inúmeras funções referentes à fertilidade do macho participando do transporte espermático no momento da ejaculação e regulando a capacitação espermática (THÉRIEN et al., 1998). No trato reprodutor da fêmea, fornece nutrientes aos espermatozoides, além de proteção e participam da reação acrossomal (KILLIAN et al., 1993; YANAGIMACHI, 1994; BELLIN, 1998). Contudo, alguns efeitos do plasma seminal já foram descritos como prejudiciais, visto que diminuíram a atividade da célula espermática e a motilidade em bovinos no momento em que entraram em contato com o espermatozoide (DOTT; 1974; BASS et al., 1983).

Comparando o sêmen de ovinos com alta e baixa taxa de fertilidade, foi observada a presença inúmeras proteínas altamente expressas atuando no funcionamento dos espermatozoides. As principais proteínas são pertencentes à família *Binder of Sperm Proteins* (BSP's), como a *Ram Seminal Vesicles Protein* (RSVP) (FERNANDEZ-JUAN et al., 2006; SOUZA et al., 2012).

As BSP's atuam se ligando ao espermatozoide no momento da ejaculação promovendo a desestabilização da membrana espermática, devido ao efluxo de colesterol, sendo esse um dos requisitos para o início da capacitação espermática (MANJUNATH e THÉRIEN, 2002). No oviduto, as BSP's auxiliam na interação entre o espermatozoide ao epitélio uterino (GWATHMEY et al., 2006). A ação das BSP's é contraditória, uma vez que essa desestabilização causa a remoção de lipídeos da membrana deixando-a mais sensível ao choque térmico, tornando-se um fator prejudicial durante a congelação de sêmen (MANJUNATH et al., 2007). Todavia, o efeito das BSP's é dose dependente,

sendo a exposição contínua prejudicial à membrana (MANJUNATH; THÉRIEN, 2002).

Já foi demonstrado que variações individuais entre machos ovinos em relação às proteínas do plasma seminal tem sido a justificativa para alterações que comprometam a viabilidade e fertilidade destes (O'MEARA et al., 1997), sendo diferenças observadas entre as raças de ovinos em relação aos parâmetros seminais ocasionadas por alterações do diâmetro testicular (MAIA et al.; 2011).

Ainda não está muito bem esclarecido qual o mecanismo de atuação das caseínas sobre as células espermáticas. Contudo, foi constatada que as BSP's têm capacidade de ligação a moléculas presentes em diluentes a base de gema de ovo e leite (MANJUNATH et al., 2002; LUSIGNAN et al., 2011), sendo as micelas de caseínas provavelmente responsáveis pela proteção do espermatozoide quando utilizado diluentes a base de leite (BERGERON & MANJUNATH, 2006).

Vários estudos demonstram que as micelas de caseínas obtidas do leite podem proteger os espermatozoides de garanhões, cabritos e carneiros durante o armazenamento do sêmen a temperaturas de 4 a 5 °C. (CHOONG & WALES, 1962; MARTIN, 1966; O'SHEA & WALES, 1966; BATELLIER et al. , 1997; LEBOEUF et al., 2003).

Essa interação entre as micelas de caseína e as BSP's conhecida como sequestro, inibe a ação prejudicial ocasionada pela alta concentração de BSP's do plasma seminal, podendo então evitar o efluxo de colesterol da membrana espermática atuando de maneira positiva nos processos de criopreservação do sêmen (BERGERON & MANGUNATH, 2006; LUSIGNAN, et al., 2011), mantendo a viabilidade e motilidade espermática (BERGERON et al., 2007).

Além da função de reduzirem as perdas de lipídeos da membrana espermática, as micelas de caseínas também mantêm sua função preservada durante a estocagem, indicando assim que as proteínas do leite em interação com as proteínas do plasma seminal são a base da proteção do espermatozoide (MANJUNATH, 2012)

As micelas de caseína e as proteínas do soro do leite que conferem a real função de proteção, atuando seja por interação proteína com proteína ou

proteína com caseína, se deve a utilização do leite desnatado com participação de lipídeos ou lipoproteínas (LPL). Quando realizado o armazenamento do sêmen, as caseínas e outras proteínas do leite ( $\alpha$  lactoalbumina e  $\beta$  lactoglobulina) interagem com as BSPs, com diferentes afinidades, prevenindo efeitos danosos ocasionados pelo plasma seminal (LUSIGNAN, et al., 2011).

Quando comparado aos extensores à base de Tris e gema de ovo, os diluentes a base de leite desnatado apresentaram resultados satisfatórios em ovinos (ARI et al., 2011) supondo que a caseína contida no leite possa ser mais eficiente para a proteção dos espermatozoides durante a criopreservação (ALLAI et al., 2015). O leite desnatado também se mostrou eficiente e com resultados superiores ao Tris quando adicionado a espermatozoides colhidos de epidídimo de ovinos (ALI MEHR & ATAYI, 2016).

Redução de danos gerados pelo processo de congelação do sêmen suíno foi observado utilizando a caseína, notando uma diminuição da atividade das caspases e manutenção da integridade do DNA (COUTINHO DA SILVA, et al 2012) Tatemoto e colaboradores (2015), demonstraram em estudo com fertilização "*in vitro*" que a adição da caseína aumentou a taxa de clivagem em suínos.

Todavia, as ações da caseína quando adicionada a meios de congelação devem continuar sendo testados (DELL VALE et al., 2013).

## **2.5 Avaliação do Espermatozóide Ovino**

O espermatozoide é uma célula altamente especializada produzida por meio de um processo contínuo caracterizado por fases que ocorre nos túbulos seminíferos no testículo, sendo esse processo chamado de espermatogênese (EDDY et al., 2003). Este processo é dividido em três fases: a fase espermatocitogênica, onde acontecem divisões mitóticas das células primordiais conhecidas como espermatogônias (fase proliferativa), a fase meiótica, onde se tem a redução do número de cromossomos resultando em células haploides e a fase de diferenciação, ou espermiogênica, o que consiste em alterações morfológicas em que as espermátides se diferenciam em espermatozoides, sendo estes liberados no interior dos túbulos seminíferos em um processo conhecido como espermição (GARNER; HAFEZ, 2004).

Este é dividido em partes: cabeça, colo e cauda. A cabeça é composta por um núcleo haploide e pela presença de acrossoma. Este núcleo contém DNA enrolado sob a forma de nucleoproteínas, sendo a cabeça responsável pela proteção do material genético (SOLDI & BOLNADI, 2013). O colo, localizado entre a cabeça e a cauda, possui a finalidade de armazenamento dos centríolos (EDDY et al., 2003).

Quando comparado a outras espécies, o espermatozoide ovino possui particularidades como uma taxa maior de ácidos graxos poli-insaturados e saturados (DARIN-BENNETT & WHITE, 1977), sendo a relação entre colesterol e fosfolípidios menor nessa espécie (DARIN-BENNETT & WHITE, 1977; BICUDO et al., 2009). Além disso, os ácidos graxos poli-insaturados da membrana espermática tem influência na fluidez dos lipídios, sendo sugeridos como o principal responsável pela susceptibilidade ao choque térmico que causa injúria e desorganização da membrana, e uma maior atuação de radicais livres (WATSON, 1981; WHITE, 1993; OLLERO et al., 1998; BICUDO et al., 2009).

Essas particularidades do espermatozoide ovino levam a diminuição da atividade respiratória e a uma criocapacitação elevada (MONREAL, et al., 2014), de modo que este está sujeito a sofrer crioinjúrias durante o processo de congelação, como a peroxidação dos fosfolípidios de sua membrana plasmática, gerando alterações estruturais extensas principalmente na região acrossomal, o que leva a uma perda irreparável da motilidade espermática e ocasiona alterações estruturais, especialmente na região acrossomal, modificações no metabolismo da célula e do conteúdo intracelular (JONES & MANN, 1977).

Em estudo realizado por Parks & Hammerstedt (1985), com a finalidade de comparar a quantidade de lipídios encontrados na membrana plasmática de espermatozoides de carneiros da porção anterior da cabeça, já que esta região tem grande importância fisiológica devido a sua ligação com a reação acrossomal e capacitação e também a sua predisposição a sofrer danos durante o processo de congelação. Estes mesmo autores obtiveram como resultados mudanças distintas na composição lipídica da membrana plasmática que cobre o acrossoma dos espermatozóides de carneiro em maturação. Para avaliar tais danos ocasionados pelo processo de criopreservação é realizado análises do sêmen.

### **2.5.1. Análise Computadorizada do Sêmen (Computer-assisted semen analysis – CASA)**

Um método de baixo custo empregado para realizar avaliação da motilidade e da porcentagem de células móveis de sêmen é análise indireta usando a microscopia óptica, uma técnica simples, mas que pode ter variações (MALMGREN, 1997; VERSTEGEN et al., 2002).

Na busca de uma tecnificação e uma objetividade nessa avaliação, diferentes métodos têm sido empregados, sendo um deles o método de análise computadorizada do movimento espermático – “computer-assisted semen analysis” (CASA). Por ser um sistema automático e computadorizado, realiza captura de várias imagens como se fossem fotos em diferentes campos da lâmina observada, sendo que a junção destas imagens forma um filme com o trajeto de cada célula espermática.

Essas fotos são tiradas por um sistema de computador com um estroboscópio acoplado, onde um software faz a junção das imagens, a digitaliza e forma o vídeo (AMANN & KARTZ, 2004). Marcações são realizadas em cada foto durante o trajeto realizado por onde passa a cabeça do espermatozoide, mesmo com a presença do flagelo que impulsiona o espermatozoide, o sistema avalia somente o movimento da cabeça, por ser tecnicamente mais fácil de acompanhar o movimento. (AMANN & KARTZ, 2004).

O computador é programado para cada espécie animal com uma micrometragem máxima e mínima, sendo considerado o espermatozoide como objetos de tamanhos dentro dessa faixa pré-determinada. Se forem observadas partículas com tamanho abaixo do mínimo pré-determinado, são consideradas parte do fundo e não são contadas (MORTIMER & MAXWELL, 1999). Logo após a identificação do espermatozoide, há a união dessas fotos e assim traça-se a trajetória de cada célula espermática, que são classificadas de acordo com o movimento padrão definidos como imóvel, linear rápido, linear lento e móvel não progressivo (MORTIMER & MAXWELL, 1999).

Este método possibilita obter informações mais expressivas com relação à cinética da célula espermática e uma avaliação de forma mais objetiva e correta da motilidade espermática, apontando também as porcentagens de células móveis, a quantificação e as características específicas do movimento dos espermatozoides (GARNER, 1997; MORTIMER, 1997; COX et al., 2006).

Estudos apontaram uma relação de significância entre a motilidade do espermatozoide e a taxa de fertilidade a campo (KJAESTAD et al., 1993, CORREA et al., 1997), mas diferente das outras espécies de animais de criação, o sistema CASA demorou um pouco mais para ser utilizado na espécie ovina. Robayo et al. (2008) estudaram a relação entre os padrões de motilidade analisados pelo CASA e a migração dos espermatozoides de carneiros no muco cervical de ovelhas, os mesmos relatam que a VAP e a VCL indicaram ser os únicos parâmetros cinéticos que tiveram correlação positiva com a capacidade de migrar desses espermatozoides no com das ovelhas. Sugerindo que esses parâmetros específicos, são características importantes para que haja capacidade desses espermatozoides em migrar através deste muco e concluir seu processo de fertilização.

### **2.5.2. Integridade de Membrana Plasmática e Acrossomal**

Essencial na hora da fecundação, a membrana espermática é uma estrutura especializada e exerce funções biológicas, como depósito de energia altamente concentrado por serem moléculas alimentares e também favorecem a sua integridade estrutural (ARRUDA et al., 2011).

A integridade de membrana do espermatozoide ovino é rapidamente diminuída na descongelação do sêmen, já a motilidade não é tão afetada. Aproximadamente 30% dos espermatozoides ovinos apresentam lesão na membrana plasmática mesmo mantendo boa motilidade após processo de congelação e descongelação (VALCÁRCEL et al., 1994).

O uso de corantes fluorescentes, conhecidos como sondas, têm sido utilizadas para avaliação espermática, sendo estas capazes de identificar condições subcelulares, mostrar alterações metabólicas e estruturais das células e de seu interior (SOUSA et al., 2012). A leitura dessas alterações que foram marcadas pelas sondas fluorescentes pode ser avaliada em citômetro de fluxo ou em microscópio de fluorescência. A vantagem da citometria de fluxo é que é possível avaliar, contar e classificar células em uma solução aquosa e possível também realizar associações de diferentes sondas fluorescentes de forma imparcial, com incomparável sensibilidade, rapidez e precisão em um número de células relevante estatisticamente (CORDELLI et al., 2005).



Para que haja fertilização eficiente é necessário que o espermatozoide possua integridade de membrana plasmática e acrossoma. Um evento essencial é a reação acrossômica onde ocorre a liberação de enzimas acrossômicas fundamentais para que haja a fusão do espermatozoide com membrana plasmática do oócito e respectiva penetração na matriz extracelular da zona pelúcida (FLESH & GADELLA, 2000; JUHÁSZ et al., 2000; CELEGHINI et al., 2007). A reação acrossomal envolve uma série de eventos diversificados, polimerização da actina, influxo de cálcio, inativação ou a ativação das proteínas devido a fosforilação da tirosina, elevação do pH (SIDDIQUE E ATREJA, 2012), além de alterações no citoesqueleto dos espermatozoides (BREITBART et al., 2005).

A integridade do acrossoma é verificada pelo preenchimento fluorescente da matriz acrossomal de espermatozoides com acrossoma lesado por lecitinas marcadas. As lecitinas se ligam especificamente as cadeias de carboidratos e glicoproteínas presentes no acrossoma (GRAHAM et al., 1990), sendo as mais utilizadas a aglutinina do *Pisum sativum* (PSA), da *Arachis hypogea* (PNA) e da *Concanavalia ensiformis* (ConA). (JUHÁSZ et al., 2000; GRAHAM, 2001; SILVA & GADELLA, 2006; CELEGHINI et al., 2007; RAPHAEL, 2007).

Quando associada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) a aglutinina PSA, cora com eficácia o acrossoma lesado na coloração verde amarelado facilitando a identificação e utilizado em diferentes espécies para corar espermatozoides (GRAHAM et al., 1990; CELEGHINI, 2005; ARRUDA et al., 2007; RAPHAEL, 2007).

#### **2.5.4 Estresse Oxidativo**

Os espermatozoides de ovinos, quando comparado a outras espécies, é o que mais tem sensibilidade à lesão por estresse oxidativo devido a sua menor razão molar de colesterol para fosfolipídios em relação a sua taxa de ácidos graxos poli-insaturados (COYAN et al., 2012). A espécie ovina gera altos níveis de peróxido de hidrogênio, ocasionado principalmente pelas grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados / saturados e baixas proporções de colesterol / fosfolipídios na membrana plasmática, quando comparados com outras espécies. Assim essa relação leva a uma maior vulnerabilidade aos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio e

consequentemente perda da integridade da membrana e do acrossoma (ALVARES E STOREY, 1992). Quando a célula espermática utiliza o metabolismo oxidativo como fonte de energia principal gera uma enorme quantidade de metabólitos ativos de oxigênio, isto é, as espécies reativas de oxigênio (EROS) (SILVA, 2006). Este termo é utilizado para identificar os intermediários reativos causados pelo metabolismo do oxigênio, tendo como exemplos: o radical superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxila ( $OH^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (MAIA & BICUDO, 2009).

Além disso, devido ao pequeno tamanho dos espermatozoides, estes, não têm presença de citoplasma suficiente para segurar o equilíbrio entre os sequestradores de espécies reativas de oxigênio (EROs) e os geradores de EROs (SHAFIEI et al., 2015). Para a manutenção funcional das células espermáticas é fundamental a presença de ácidos graxos, mas o aumento das taxas de EROs levam a alterações nas funções das mitocôndrias e afetam a motilidade espermática (HENKEL, 2005; DU, 2009).

A capacidade antioxidante do sêmen e o excesso de produção de EROs, leva a alterações nas funções da própria célula espermática como a capacidade fecundante, a motilidade, peroxidação dos lipídios da membrana plasmática e inibição do metabolismo (GUERRA et al, 2004).

Para averiguação da peroxidação lipídica da membrana pode-se utilizar sondas fluorescente lipofílicas. Entre essas sondas a mais utilizada é um análogo de ácido graxo, o ácido-parinárico (cis-PnA), no entanto ele se torna mais susceptível a peroxidação lipídica, quando comparado aos ácidos graxos biológicos. Outras sondas fluorescentes podem ser utilizadas, sendo elas sondas que derivam de lipídios e fluoresceína (PAP et al, 1999; BALL; VO, 2002).

A sonda fluorescente BODIPY® 581/591 C<sub>11</sub> (C11-BODIPY<sup>581/591</sup>- Molecular Probes®) incorpora membrana celular e tem sido utilizada de uma maneira bem prática na identificação de peroxidação lipídica e oxidação das células vivas, inclusive dos espermatozoides. Essa sonda pode ser utilizada em qualquer aparelho com leitor a *laser*, assim como na citometria de fluxo (BALL; VO, 2002; BROUWERS; GADELLA, 2003; NEILD et al., 2005).

## 2.6 Teste de fertilidade

A cérvix da ovelha é longa, fibrosa e tubular. Caracteriza-se por possuir espessa parede e luz constricta, com o canal cervical formada por várias proeminências de forma transversa ou espiralada, com saliências fixas conhecidas como anéis anulares (de três a oito anéis), medindo cerca de 4 a 7 cm de comprimento (SILVA et al., 2005). Essa anatomia dificulta a passagem da pipeta de inseminação pela cérvix, é um dos principais fatores que limita a propagação da inseminação artificial na espécie ovina (OLIVEIRA, 2009).

Para que haja seleção e rápido melhoramento genético de diferentes espécies uma das biotécnicas utilizada nos dias de hoje é a inseminação artificial (IA). Essa técnica gera centenas de animais selecionados por estação reprodutiva, devido à congelação de sêmen de animais de alta qualidade genética para a utilização em protocolos de inseminação artificial (O'MEARA et al., 2008).

A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) surgiu com intuito de facilitar o manejo, devido ao fato de não necessitar a observações de cio, além de ser uma importante técnica para o melhoramento genético do rebanho (BICUDO, 2016). A IATF consiste em sincronização do estro e ovulação utilizando protocolos farmacológicos hormonais, com aplicações de gonadotrofina coriônica equina (eCG), de prostaglandina e utilização de implante de progesterona (P4) um dos protocolos muito usados para realização da técnica. (LEÃO, 2009). Apesar disso, diferentes tipos de protocolos e variações são comumente usados, com mudanças na duração, horário de aplicação, uso ou não de prostaglandinas, dose, via de administração de progestágenos e momento de aplicação de gonadotrofinas (FONSECA, 2016).

Uma técnica muito utilizada atualmente é a inseminação artificial por laparoscopia, ela foi descrita pela primeira vez em 1992 por Killen e Caffrey. O uso da técnica de inseminação artificial por laparoscopia (IAL) consiste na deposição de sêmen intrauterino tem sido estudado mais afundo e aperfeiçoada cada dia mais, com intuito de minimizar a limitação com relação à passagem da cérvix. É uma técnica menos invasiva do que uma cirurgia convencional (EVANS et al., 2004 ; ANEL et al., 2006), tem obtido resultados elevados e a utilização do sêmen se torna mais eficiente quando comparado a IA transcervical ou outras técnicas (STEFANI et al. 1990 ; FANTINATI et al., 2005 ; SHIPLEY et

al., 2007) . A laparoscopia é uma técnica que exige mão de obra especializada e equipamentos de trabalho caros, em consequência disso à implantação da mesma em um rebanho necessitará da relação de custo benefício proporcionado e do manejo adotado para o rebanho (ANEL et al., 2006).

O sêmen utilizado para a IAL pode ser fresco, refrigerado ou congelado, sendo os dois primeiros com melhores índices de fertilidade (BICUDO et al., 2005). A taxa de fecundação realizando o emprego desta técnica associada com a utilização do sêmen congelado é maior do que a taxa quando se utiliza a inseminação artificial transcervical (BICUDO et al., 2003) e as taxas de ovelhas prenhas usando a técnica inseminação por laparoscopia também são altas (LUTHER, 2008).

Grandes índices convincentes de fertilidade a campo no uso da IATF foram relatados por Medeiros et al. (2002) e Almeida et al (2008).Esses autores também mostram diferentes momentos onde houve a utilização da inseminação artificial (IA) comercial, mostrando que a IAL é muito melhor por ter resultados mais satisfatórios de fertilidade em programas comerciais. Mesmo que IAL seja um procedimento semi-cirúrgico e necessite de mão de obra especializada e materiais caros, a técnica de depositar o sêmen direto no corno uterino apresentou indicies mais elevados de fertilidade em pequenos ruminantes comparados as demais técnicas. (KILLEN; CAFFREY, 1982; MYLNE et al., 1997; MEDEIROS et al., 2002).

### **3. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Como ferramenta importante para a evolução na congelação do sêmen ovino, o uso de diluentes definidos é de grande responsabilidade e muito respeitável para a reprodução ovina. Meios à base de gema de ovo tem sido muito utilizada em diferentes espécies para o processo de congelação. A adição de caseinato de sódio a esses meios tem apresentado vantagens em estudos realizados em bovinos e equinos com sêmen congelado. Deste modo apresentando eficiência em melhorar a qualidade das células espermáticas, protegendo os espermatozoides dos danos causados pelo processo e consequentemente aumentando a taxa de fertilidade, podendo assim valorizar a utilização do sêmen congelado e suas praticidade no emprego da técnica de

Inseminação artificial por laparoscopia elevando o conhecimento e demonstrando suas vantagens entre os produtores e criadores.

#### 4. REFERÊNCIAS\*

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Membrane Structure. In: **Molecular Biology of the Cell**. 3 ed.: Garland Publishing, New York, Cap. 10, p. 478-506, 1994.

ALI MEHR, M. A.; ATAYI, M. Effect of different extenders on recovery and storage of epididymal ram spermatozoa. **Iranian Journal of Veterinary Science**, v. 8; n. 2, p.1-9, 2016.

ALLAIA, L.; DRUARTC, X.; CONTELLD, J.; LOUANJLIE, N.; MOULAA, A. B.; BADIA, A.; ESSAMADIB, A.; NASSERB, B.; EL AMIRIA, B. Effect of argan oil on liquid storage of ram semen in Tris orskim milk based extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 160, p. 57–67, 2015.

ALMEIDA, V.M.; PEÑA-ALFARO, C.E. **Iseminação artificial em tempo fixo em cabras togenburg**: avaliação de protocolo de sincronização de estro com onze dias de progesterona, In: Congresso Internacional de Caprinos e Ovinos. FEINCO, 5, 2008, São Paulo. Anais. 2008

ALMIQUIST, J.O; FLIPSE, R.J.; THACKER, D.L. Fertility of bovine spermatozoa in heated fomogenized milk and skim milk. **Journal of Dairy Science**, Champaing, v.37, p. 1302-1307, 1954.

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.105-113, 2005.

ALVAREZ, J.G.; STOREY, B. T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 13, n 3, p. 232–241, 1992.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal Function. In: **Equine reproduction**, p. 1053, 2010.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKinnon AO, Voss JL (Ed.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger,. p.715-745, 1993.

AMANN, R.P.; KARTZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **J Androl**,v.25, p.317-325, 2004.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal Equine Vet Science**, v.7, p.145-173, 1987.

ANEL, L.; ALVAREZ, M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ANEL, E.; DE PAZ, P. Improvement strategies in ovine artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, p.30–42, 2006.

ANTON, M.; BELHOMME, C.; SIRVENTE, H., et al. What are the keypoints to understand the physicochemical and biological activities of egg compounds? In: European Poultry Symposium on Quality of Poultry Meat 19, European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products 18, 2009, Turku, Finland.

ARI, U.C., KULAKSIZ, R., OZTURKLER, Y. Freezability of tushin ram semen extended with goat or cow milk based extenders. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p.975–979, 2011.

ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; PERES, K.R. et al. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 8-16, 2007.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; OLIVEIRA, L.Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K.M.; JAIMES, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.145-151, 2011.

ASHWOOD-SMITH, M.J. Mechanisms of cryoprotectant action. **Symp Soc Exp Biol**, v.41, p.395-406, 1987.

AZEVEDO H.C.; MACHADO R.; SIMPLÍCIO A.A.; SOARES A.T. Características do sêmen caprino congelado: influência do tipo de palheta e concentração espermática. **Rev. Cient. Rur.** 5(2): 148157, 2000.

BAG, S.; JOSHI, A.; NAQVI, S.M.K.; MITTAL, J.P. Effect of post-thaw incubation on sperm kinematics and acrossomal integrity of ram spermatozoa cryopreserved in medium-sized French straws. **Theriogenology**, v.62, p.415-424, 2004.

BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen, cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **J. Androl.**, v.21, p.1-6, 2000.

BALHORN, R. The protamine family of sperm nuclear proteins. **Genome biology**, v. 8, n. 9, p. 227, 2007.

BALL, B.A.; VO, A. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY581/591. **Journal of Andrology**, v.23, p.259-269, 2002.

BARRAQUIO, V.L.; VAN DE VOORT, F.R. Sodium caseinate from skim milk powder by extrusion processing: physicochemical and functional properties. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 6, p. 1552-1556, 1991.

BARRETO, S.C.S.; ZAPATA, J.F.F.; FREITAS, E.R.; FUENTES, M.F.F.; NASCIMENTO, R.F.; ARAÚJO, S.R.S.M.; AMORIM, A.G.N. Ácidos graxos da gema e composição do ovo de poedeiras alimentadas com rações com farelo de coco. **Pesq Agropec Bras**, v.41, p.1767-1773, 2006.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa: Iowa State University: Ed. Ames, p. 285, 1989.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BO, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 479-486, 2004.

BASS, J. W.; MOLAN, P. C.; SHANNON, P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 68, p. 275-280, 1983.

BATELLIER, F. **Identification, purification et mécanisme d'éléments contenus dans le lait, agissant sur les spermatozoïdes équin.**1997. Tese (doutorado). Sciences et Techniques, Université François Rabelais de Tours, Tours. Disponível em: Acesso em: 12 fevereiro. 2019.

BATELLIER, F.; MAGISTRINI, M.; FAUQUANT, J.; PALMER, E. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 48, p. 391- 410, 1997.

BELLIN, M. E.; OYARZO, J. N.; HAWKINS, H. E.; ZHANG, H.; SMITH, R. G.; FORREST, D. W.; SPROTT, L. R.; AX, R. L. Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 2032-2039, 1998.

BERGERON, A.; BRINDLE, Y.; BLONDIN, P.; MANJUNATH, P. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 1, p. 120-126, 2007.

BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New Insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.1338-1344, 2006.

BICUDO, S. D.; RODELLO, L.; BITTENCOURT, R.F.; MONTEIRO, C.D.; CROCOMO, L.F.; FALLEIROS, M.B.; BISCARDE, C.E.A.; OLIVEIRA, T.M. Gargalos tecnológicos na reprodução assistida em ovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. n.6, p.167-181, 2009.

BICUDO, S.D. **O diagnóstico ultrassonográfico de gestação em ovinos.** Disponível em<[www.fmvz.unesp.br/Informativos/ovinos/repman3.htm](http://www.fmvz.unesp.br/Informativos/ovinos/repman3.htm)>. Acesso em fevereiro/2019.

BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C.; SILVA MAIA, M.S. *et al.* Aspectos peculiares da inseminação artificial em ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, supl. 1, p.127-130, 2005.

BICUDO, S.D.; SOUSA, D.B.; TAKADA, L. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado e biotécnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p.120-126, 2003.

BITTENCOURT, R.F.; OBA, E.; RIBEIRO FILHO, A.D.L.; CHALHOUB, M.; AZEVEDO, H.C.; BICUDO, S.D. Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: diluidores e crioprotetores. **Ciência Animal Brasileira**, v.14, n.4, p.522-536, 2013.

BORTOLOZZO F.P.; BERNARDI M.L.; BENNEMANN P.E.; WENTZ I. **Inseminação artificial em suínos**. In: Gonçalves P.B. D. 2008.

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n.1, p.17-32, 2005.

BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J.P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GUÉRIN, B.; CAMUS, A.; LECHA, T. M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**. v.50, p.699-706, 1998.

BRAGA, C.V.P.; FUENTES, M.F.F.; FREITAS, E.R.; CARVALHO, L.E.; SOUSA, F.M.; BASTOS, S.C. Efeito da inclusão do farelo de coco em rações para poedeiras comerciais. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.34, p.76-80, 2005.

BRANDÃO, A. C. **Efeito do laser diodo sobre as características de motilidade, de integridade de membranas plasmática e acrossomal e de potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides criopreservados de equinos**. 2008. 87 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BREITBART, H.; COHEN, G.; RUBINSTEIN, S. Papel do citoskeleton de actina na capacitação espermática de mamíferos e reação acrossomal. **Reprodução**, v.129, p. 263 – 268, 2005.

BROUWERS, J.F.H.M.; GADELLA, B.M. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, p. 1382-1391, 2003.

CALDERAM, I.B.K.; MASCHIO, É.F.; MADEIRA, E.M.; ULGUIM, R.R.; RAMBO, G.; CORRÊA, É.K.; LUCIA, J.T.; DESCHAMPS, J.C.; CORRÊA, M.N. inseminação artificial intra-uterina em leitoas com sêmen criopreservado com dimetilacetamida e glicerol. **Ciência Rural**, v.38, p.1978-1983, 2008.

CARDOSO, F.M.; QUEIROZ, G.F. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and daily sperm production of Brazilian hairy rams. **Animal Reproduction Science**, v. 17, p. 77-88, 1988.



CASTRO, S. V.; CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G. et al. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, p. 1-17, 2011.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária e Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C. et al. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 5, p. 479-488, 2007.

CHOONG, C.H.; WALES, R.G. The effect of cold shock on spermatozoa. **Aust J Biol Sci**, v.15, p.543–551, 1962.

CHOONG, C.H.; WALES, R.G. The use of various diluents for deepfreezing CORCINI, C.D.; GOULARTE, K.L.; BONGALHARDO, D.C.; LUCIA JR. T.; JARDIM, R.D.; VARELA JUNIOR, A.S. Effect of egg yolk plasma on dog sperm cryopreservation. **Andrologia** v.48,n.1:114– 5, 2016.

CORDELLI, E.; ELEUTERI, P.; LETER, G.; RESCIA, M.; SPANO, M. Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. **Contraception**, v.72, p.273-279, 2005.

CORREA, J.R.; PACE, M.M.; ZAVOS, P.M. Relações entre características de espermatozóides congelados e descongelados avaliados através da análise de rotina do sêmen, testes funcionais de espermatozóides e fertilidade de touros em um programa de inseminação artificial. **Theriogenology** , v. 48 , p. 721 – 731, 1997.

COSTA, J. M. S. **Efeito da adição de antioxidantes no sêmen de carneiros sobre a qualidade espermática após descongelamento**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus de Ciências Agrárias, Petrolina-PE.

COUTINHO DA SILVA, M. A.; SEIDEL, G. E.; SQUIRES, E. L.; GRANHAM, J. K. Effects of components of semen extenders on the binding of stallion spermatozoa to bovine or equine zonae pellucidae. **Reproduction**, v. 143, n. 5, p. 577-585, 2012.

COX, J.F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v.66, p.860-867, 2006.

COYAN, K.; BUCAK, M.N.; BAVIERA, N.; TAŞPINAR, M. & AYDOS, S. A. Eergothioneine atenua o dano ao DNA do espermatozóide Merino pós-descongelado . **Small Ruminant Research** , v.106 , p.165–167, 2012.

CROSS, N. L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 7-11, 1998.

DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I. G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. **Cryobiology**, v. 14, p. 466–470, 1977.

DASKIN, A.; TEKIN, N. The effect of egg-yolk on the quality of frozen Angora buck semen. **Turk-Veterinerlik ve Hayvancilik Dergesi**, v.20, n.5, p.395-398, 1996.

DAVIS, I.S.; BRATTON, R.W.; FOOTE, R.H. Livability of bovine spermatozoa at 5, -25, and -85°C in TRIS-buffered and citrate-buffered yolk-glycerol extenders. **Journal of Dairy Science**, v.46, p.333–336, 1963.

DE KRUIF, C. G.; HOLT, C. Casein micelle structure, functions and interactions advanced dairy chemistry. In: FOX, P. F.; MC SWEENEY, P. L. H. **Advanced dairy chemistry, proteins**. 3. ed. New York: Kluwer Academic, Chap. 5, v. 1, 2003.

DEL VALLE, I., SOUTER, A., MAXWELL, W.M.C., MUINO-BLANCO, T., CEBRIÁN-PÉREZ, J. Function of ram spermatozoa frozen in diluents supplemented with casein and vegetable oils. *Animal Reproduction Science*, v. 138, 213– 219, 2013.

DEL VALLE, I.; SOUTER, A.; MAXWELL, W.M.C.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. Function of ram spermatozoa frozen in diluents supplemented with casein and vegetable oils. **Animal Reproduction Science**, v. 138, 213– 219, 2013.

DOTT, H. M. The effects of bovine seminal plasma on the impedance change frequency and glycolysis of bovine epididymal spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 38, p. 147-156, 1974.

DU, L.Y.; CAO S.X.; GUO W. & LIU T.Z. Antioxidation of melatonin on boar semen preservation, *Jian. J. Agric. Sci.* V.25, p.315-319, 2009.

EDDY, E. M., TOSHIMORI, K., O'BRIEN, D. D. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. **Microscopy Research and Techniqe**, v.61, p.103-155, 2003.

EVANS, G.; HOLLINSHEAD, F.K.; MAXWELL, W.M.C. Preservation and artificial insemination of sexed semen in sheep. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 16, p.455–64, 2004.

FANTINATI, P.; ZANNONI, A.; BERNARDINI, C.; WEBSTER, N.; LAVITRANO, M.; FORNI, M.; SEREN, E.; BACCI, M.L. Laparoscopic insemination technique with low numbers of spermatozoa in superovulated prepuberal gilts for biotechnological application. **Theriogenology**, v.63, p.806–17, 2005.  
fazenda. São Paulo: Andrei, p. 331, 2006.

FERNANDES, G. O. **Efeito de antibacterianos na qualidade espermática e na microbiota do sêmen ovino**. 2012. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília. 2012.

FERNÁNDEZ-JUAN, M. et al. Immunohistochemical localization of sperm preserving proteins in the ram reproductive tract. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v.132, p.721–732, 2006.

FERNÁNDEZ-JUAN, M.; GALLEGO, M.; BARRIOS, B.; OSADA, J.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Immunohistochemical localization of sperm preserving proteins in the ram reproductive tract. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v.132, p. 721-732, 2006.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1469, p. 197-235, 2000.

FLESCH, F.M.; GADALLENA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm membrane in the processo of fertilization. *Biochimica et Byophysica Acta*, v.1469, n. 3, p. 197-235, 2000.

FONSECA, J.F. **Otimização da eficiência reprodutiva em caprinos e ovinos**. Embrapa caprinos. Disponível em acessado em fevereiro-2019.

FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, M.T. Motility and fertility of bullsperm in whole milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v.71, p13–23, 2002.

FOULKES, J.A. The separation of lipoproteins from egg yolks and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. **J Reprod Fertil**, v.49, p.277-284, 1977.

FURST, R. **Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen equino**. 2006, 96f Tese (Doutorado) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG: 2006.

GARCIA, B. M.; FERNANDEZ, L. G.; FERRUSOLA, C. O.; SALAZAR-SANDOVAL, C.; RODRIGUEZ, A. M.; MARTINEZ, H. R.; TAPIA, J. A.; MORCUENDE, D.; PENA, F. J. Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 46, p. 141-148, 2011.

GARCIA-HERREROS, M.; APARICIO, I.M.; BARON, F.J.; GARCIA MARTIN L.J.; GIL, M.C. Standardization of samples preparation, staining and sampling methods for automated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa. **Int J Androl**, v.29, p.553-563, 2006.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozóides e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, Cap. 7, p. 97-110, 2004.

GARNER, D.L. Ancillary tests of bull semen quality. **Veterinary Clinics of North America**, v.13, p.313-327, 1997.

GIBBONS, A. Inseminación artificial con semen congelado en cabras da raza angora. **Revista Taurus**, v. 4, n. 16, p. 24-32, 2002.

GILLAN, L.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. **Reproduction Fertility and Development**, v. 16, p. 447-454, 2004.

GIRAUD, M.N.; MOTTA, C.; BOUCHER, D.; GRIZARD, G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. **Human Reproduction**, v.15, p.2160-2164, 2000.

GONZALEZ, C. I. M.; OBA, E.; BICUDO, S. D. Avaliação do sêmen ovino (*Ovis aries*) congelado em palhetas e pellets com diferentes meios diluidores In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 13., 1999, Belo Horizonte, MG, 1999. Anais... Belo Horizonte: **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 280-281, 1999.

GRAHAM, J. K. Principles of cooled semen. In: **international congress equine reproduction**. Oklahoma. Proceedings, p. 1308, 2010.

GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 3-4, p. 239-247, 2001.

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

GUERRA, M. M. P.; EVANS, G.; MAXWELL, W. H. C. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, p. 187-195, 2004.

GWATHEMEY, T.M.; IGNOTT, G.G.; MUELLER, J.L.; MANJUNATH, P.; SUAREZ, S.S. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. **Biology of Reproduction**, Madison, v.75, p. 501-507, 2006.

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

HENKEL R. The impact of oxidants on sperm function. **Andrologia**, v.37, p.205-206, 2005.

HERMO, L.; PELLETIER, R.M.; CYR, D.G.; SMITH, C.E. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 2: Changes in spermatid organelles, 2010.

HESS, R. A.; FRANÇA, L. R. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: CHENG, C. Y. Molecular Mechanisms in Spermatogenesis.

Series: **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.636, p.1-15, 2008.

HOCHACHKA, P. W. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. **Science**, v. 231, p. 234-241, 1986.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Anim Reprod Sci**, v.62, p.3-22, 2000.

HOUPALATHI, R.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; ANTON, M.; SCHADE, R. **Bioactive egg compounds**. New York: Springer Verlag, p. 296, 2007.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2017

JONES, I. L.; MANN, T. Toxicity of exogenous fatty acid peroxides towards spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, p. 255-260, 1977.

JUHÁSZ, J.; NAGY, P.; KULCSÁR, M. et al. Methods for semen and endocrinological evaluation of stallion: a review. **Acta Veterinaria BRNO**, v.69, n. 4, p. 247-259, 2000.

KASHIWAZAKI, N.; OKUDA, Y.; SEITA, Y.; HISAMATSU, S.; SONOKI, S.; SHINO, M.; MASAOKA, T.; INOMATA, T. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese White Rabbit spermatozoa. **J Reprod Dev**, v.52, p.511-516, 2006.

KILLEN, I.D.; CAFFERY, G.J. Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. **Australian Veterinary Journal**, v. 59, p.95, 1982.

KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 1202-1207, 1993.

KJAESTAD, H.; ROPSTAD, E.; BERG, K.A. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta Vet. Scand.*, v.34, n.3, p.299–303, 1993.

KJAESTAD, H.; ROPSTAD, E.; BERG, K.A. Avaliação de parâmetros espermatológicos utilizados para prever a fertilidade do sêmen de touros congelados. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 34, p. 299 – 303, 1993.

KNOBIL, E.; NEILL, J. D. E. U. O. A. E., 2006. 3191P. Knobil and Neill's physiology of reproduction. 3. United of America: Elsevier, 2006.

LEÃO, K.M. **Técnicas de Inseminação Artificial**. 2009. Trabalho apresentado durante a disciplina Seminário II (Monografia), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2009.

LEBOEUF, B.; GUILLOUET, P.; BATELLIER, F.; BERNELAS, D.; BONNE, J.L.; FORGERIT, Y.; RENAUD, G.; MAGISTRINI, M. Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen. **Theriogenology**, v.60, p.867–877, 2003.

Lecewicz, M., Strzezek, R., Kordan, W., Majewska, A. Effect of extender supplementation with low-molecular-weight antioxidants on selected quality parameters of cryopreserved canine spermatozoa. **Journal of Veterinary Research**, v.62, n. 2, p.221-227, 2018.

LOPEZ-BREA, J.G. Congelación de semen en la especie ovina: características biológicas de las dosis descongeladas. 1995. (Tese de Doutorado) Universidade de Castilla-La Mancha, Madri. Acesso em 4 de junho de 2019.

LOURENÇO, E. J. **Tópicos de proteínas de alimentos**. Jaboticabal, São Paulo: Edição Funep, Cap. 5, p.179-231, 2000.

LUSIGNAN, M. F.; MANJUNATH, P.; LAFLEUR, M. Thermodynamics of the interaction between bovine Binder of SPerm BSP1 and lowdensity lipoprotein from hen's egg yolk. **Thermochimica Acta**, v. 516, n. 1, p. 88-90, 2011b.

LUSIGNAN, M.F.; BERGERON, A.; LAFLEUR, M.;MANJUNATH, P. The major proteins of bovine seminal plasma Interact with caseins and whey proteins of milk extender. **Biology of reproduction**, v. 85, n. 3, p. 457-64, 2011a.

LUTHER, J.S. Application of laparoscopic artificial insemination techniques to the North Dakota sheep industry. *Sheep Res. Rep.*, p.24-26, 2008.

MADEIRA, E.M.; BIANCHI, I.; VIEIRA, M.B.; SCHNEIDER, A.; SEVERO, N.C.; FEIFER, L.F.M.; CORRÊA, M.N. Avaliação de diferentes crioprotetores intra e extracelulares na criopreservação de sêmen de touros. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65(2), p.415-420, 2013.

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.183-193, 2009.

MAIA, M. S.; MEDEIROS, I. M.; LIMA. C. A. C. Características reprodutivas de carneiros no Nordeste do Brasil: parâmetros seminais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 175-179, 2011.

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

MANJUNATH, P. New isights into the understanding of the mechaniiism of sperm pro by extender componentes. **Animal Reproduction**, v. o, n. 4, p. 809-815, 2012.

MANJUNATH, P.; BERGERON, A.; LEFEBVRE, J.; FAN, J. Seminal plasma proteins: function and interaction with protective agents during semen preservation. **Spermatology**, v. 65, p. 217-228, 2007.

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MÉNARD, M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 67, p. 1250-1258, 2002.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, p. 109-119, 2002.

MARTIN, I.C.A. Diluents for the preservation of ram spermatozoa. Diluents used at 378C and 58C containing casein. **Australian Journal biology science** , v.19, p.645–653, 1966.

MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F..Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.42, n.1, p. 55-65, 1996.

MCMAHON, D. J.; OOMMEN, B. S. Casein Micelle Structure, Functions, 6 and Interactions. Cap 6, pag. 185-209. IN: McSWEENEY, P.L.H., FOX, P.F. (eds.), **Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects**, 4th Edition. 2012.

MEDEIROS, A.L.N.; MEDEIROS, C.H.N.; VIERIA, D.G.I.; MEDEIROS, M.N.; MONTEIRO, A.W.U.; FACÓ, O.; GUSMÃO, A.L. Inseminação artificial por laparoscopia em ovelhas mestiças em condições de campo no Sertão Central do Ceará (dados preliminares ). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Suplemento, v.5, p. 84 -86, 2002.

MENEZES, E. B.; TILBURG, M. V.; PLANTE, G.; OLIVEIRA, R. V.; MOURA, A. A.; MANJUNATH, P. Milk proteins interact with goat Binder of SPerm (BSP) proteins and decrease their binding to sperm. **Cell Tissue Res**. p. 1-16, 2016.

MONREAL, A. C. D.; LIMA, N. N.; SOUZA, A. S.; SOUZA, M. I. L.; CARAMALAC, S. M.; CARAMALAC, S. M.; URT, M. A. G. Glicina Gema Leite para criopreservação de sêmen de carneiros sem raça definida. **Revista Agrarian**. , v.7, n.23, p.124-131, 2014.

MORTIMER, S. T. CASA—Practical **Aspects Journal of andrology**, v. 21, n.4, p. 515-524, 2000.

MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction update**, v.3, n.5, p.403-439, 1997.

MORTIMER, S.T.; MAXWEL, W.M.C. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. **Reprod Fertil Dev**,v.11, p.25-30, 1999.

MYLNE, M.J.A.; HUNTON, J.R.; BUCKRELL, B.C. Artificial Insemination of Sheep. In: Current Therapy in Lange Animal. **Theriogenology**, p. 585-597, 1997.

NEILD,D.M.; BROUWERS, J.F.H.M.; COLENBRANDER, B.; AGUERO, A.; GADELLA,B. M. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 72, p. 230-238, 2005.

NEVES, J. P. Novas técnicas de inseminação artificial em ovinos. In: Caprinocultura e Ovinocultura. **Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Piracicaba, p. 57-67, 1990.

NOAKES, D.E., PARKISON, T.J., ENGLAND, G.C.W. **Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics**. London: Saunders, ed.8, p.886, 2001.

NUNES, J.F. Inseminação artificial em caprinos. In: Gonsalvez, P.B.D., Figueiredo, J.R., Freitas, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, p.111-125, 2002.

NUNES, J.F. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos e do homem. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.22, n.2, p.109-112, 1998.

O'MERA, C.M; HANRAHAN, J.P.; PRATHALIGAM, N.S.; OWEN, J.S.; DONOVAN, A.; FAIR, S.; WARDA, F.; WADE, M.; EVANS, A.C.O. LONERGAN, P. Relation ship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with forzen-thawed semen. **Theriogenology**, v. 69, n.4, p. 513-522, 2008.

O'SHEA, T.; WALES, R. Effect of casein, lecithin, glycerol, and storage at Condiluted ram and bull semen. **Aust .J.Biol.Sci.**, v.19, p. 871– 882, 1966.

OLIVEIRA, M.E.F. **Técnicas de inseminação artificial em ovinos e caprinos**. Acessado em fevereiro. 2019. Online. Disponível em: [http://www.farmpoint.com.br/tecnicas-de-inseminacao-artificial-em-ovinos-ecaprinos\\_noticia\\_52391\\_3\\_30\\_.aspx](http://www.farmpoint.com.br/tecnicas-de-inseminacao-artificial-em-ovinos-ecaprinos_noticia_52391_3_30_.aspx).

OLIVEIRA, R.V; NUNES J.F; SALGUEIRO, C.C.M; CAVALCANTES, F.M.M; BRASIL, O.O; MOURA, A.A.A.N. Avaliação do espermatozoides caprinos congelados em meio á bas de água de cocô em pó (ACP-101 ®) ou TRIS. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária em Zootecnia**, v.6, p.1295-1302, 2011.

OLLERO, M.; BESCÓS, O.; CEBRIAN PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Loss of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process. **Theriogenology**, v.49, p. 547-555, 1998.

PAGL, R.; AURICH, J. E.; MULLER-SCHLOSSER, F.; KANKOFER, M.; AURICH, C. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milkbase extender for storage equine semen at 5°C. **Theriogenology**, v. 66, p. 1115-1122, 2006.

PAP, E.H.; DRUMMEN, G.P.; WINTER, V.J.; KOOIJ, T.W.A.; RIJKEN, P.; WIRTZ, K.W.A.; OP DEN KAMP, J.A.F.; HAGE, W.J., POST, J.A. Ratio-fluorescence microscopy of lipid oxidadion in living cells using C11-BODIPY<sup>581/591</sup>. **FEBS Letters**, v.453, p. 278-282, 1999.

PARKS, E. J.; HAMMERSTEDT, H. R. Developmental changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. **Biology of Reproduction**, v. 32, p.653- 668,1985.



- PEGG, D.E. The History and Principles of Cryopreservation. **Seminars in Reproductive Medicine**, v.20, n.1, p.05- 14, 2002.
- PHILLIPS, P.H.; LARDY, H.A. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. **Journal Dairy Science**, v.23, p.399- 404, 1940.
- PLANTE, G.; LUSIGNIAN, M. F.; LAFLEUR, M.; MANJUNATH, P. Interaction of milk Proteins and Binder of Sperm (BSP) proteins from boar, stallion and ram semen. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 13, p. 92, 2015.
- POULOS, A.; DARIN-BENNETT; A.; WHITE, I. G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 46, p. 541-549, 1973.
- PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 215-225, 2006.
- QUINN, P.J.; WHITE, I.G. Chemical and ultrastructural changes in ram sperm after cold washing, shock and freezing. **Journal Reproduction Fertility**, v. 18, p.209-220, 1969.
- QUINN, P.J.; CHOW, P.; WHITE, I.G. Evidência de que o fosfolípido protege os espermatozoides do carneiro do choque frio em um local da membrana plasmática. **Journal Reproduction Fertility**, v. 60, p. 403 – 407, 1980.
- RAMON, M.; JIMENEZ-RABADAN, P.; GARCIA-ALVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; SOLER, A. J.; FERNANDEZ-SANTOS, M. R.; PEREZ-GUZMAN, M. D.; GARDE, J. J. Understanding sperm heterogeneity: biological and practical implications. **Reproduction in domestic animals**, v. 49 Suppl 4, p. 30-6, 2014.
- RAPHAEL, C.F. **Efeito da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozóide eqüino refrigerado**. 2007. 111f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo.
- RIBEIRO, B.R.C.; LARA, L.J.C.; BAIÃO, N.C.; LOPEZ, C.A.A.; FIUZA, M.A.; CANÇADO, S.V.; SILVA, G.M.M. Efeito do nível de ácido linoleico na ração de matrizes pesadas sobre o peso, composição e eclosão dos ovos. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.789-796, 2007.
- ROBAYO, I.; MONTENEGRO, V.; VALDÉS, C.; COX, J.F. Avaliação CASA dos parâmetros cinemáticos dos espermatozoides ram e sua relação com a eficiência da migração no muco cervical de ruminantes. **Reproduction Domestic Animal**, v.43, p. 393 – 399, 2008.
- ROSSI T.C.; PAPA F.O.; SANTOS T.B.; MACEDO L.P.; ALVARENGA M.A.; MELO C.M.; DELL'AQUA JUNIOR J.A. Efeito da utilização de diferentes crioprotetores e suas associações no processo de congelação de sêmen eqüino com meio MP50. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.350-352, 2003.

RUBIO-GUILLÉN, J.; GONZÁLEZ, D.; GARDE, J. J.; ESTESO, M. C.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; RODRÍGUEZ-GÍL, J. E.; MADRID-BURY, N.; QUINTERO-MORENO, A. Effects of Cryopreservation on Bull Spermatozoa Distribution in Morphometrically Distinct Subpopulations. **Reproduction in domestic animals**, v. 42, 2007.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal. Reproduction. Science**, v.62, p.77-111, 2000.

SENGER, P. L. Endocrinology of the male and spermatogenesis. In:\_. Pathways to pregnancy and parturition. 2ed. Moscow: Current conceptions, Inc, cap.10, p. 214- 239, 2003.

SHAFIEI, M.; FOROUZANFAR, M., HOSSEINI, S.M., ESFAHANI, M.H.N. Efeito da superóxido dismutase mimética e catalase na qualidade do sêmen de caprinos pós-caudo. **Theriogenology**, v. 83, p.1321-1327. 2015.

SHIPLEY, C.F.B.; BUCKRELL, B.C.; MYLNE, M.J.A.; POLLARD, J.; HUNTON, J.R. Artificial insemination and embryo transfer in sheep. In: Youngquist RS, Threlfall WR (eds). Current Therapy in Large Animal **Theriogenology**, v. 2.p 629–41. Saunders Elsevier, St. Louis, MO, USA, 2007.

SIDDIQUE , R.A.; ATREJA, S.K. Efeito do Spermine-NONOate na reação acrossoma e fosforilação da tirosina proteica associada em espermatozoides de búfalos de Murrah (*Bubalus bubalis*). **Animal Reproduction Science**, v.131, p. 81 – 87, 2012.

SILVA, J.C.; QUINTELA, A.; ANDRADE MOURA, J.C.; RESENDE, J.; MARTINS, L.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A.L.; BITTENCOURT, T.; GUSMÃO, A.L. **Colheita transcervical de embriões ovinos da raça Dorper no semi-árido nordestino**. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia. Anais. Belo Horizonte: CBRA, 2005.

SILVA, N. N., CASANOVA, F., PINTO, M. S., CARVALHO, A. F., & GAUCHERON, F. Casein micelles: from the monomers to the supramolecular structure. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.22, p.1-15, 2019.

SILVA, P. F. N. Physiology of peroxidation process im mammalian sperm. Doctoral Thesis, Utrecht University, Faculty of Veterinary Science, Ultrech, 177f, 2006.

SILVA, P.F.N. & GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958–978, 2006.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 370-384, 2011.

SINGH, A. P.; RAJENDER, S. CatSper channel, sperm function and male fertility. **Reproductive biomedicine online**, v. 30, n. 1, p. 28-38, 2015.

SINGH, B. K. Compêndio de andrologia e inseminação artificial em animais de

SNOECK, P.P.N. **Aspectos da criopreservação de sêmen equino: composição do meio diluidor, curvas de congelação e fertilidade.** 2003. 116f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2003.

SOLDI, M.; BONALDI, T. The proteomic investigation of chromatin functional domains reveals novel synergisms among distinct heterochromatin components. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 12, n. 3, p. 764-780, 2013.

SOUSA, D.B.; BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C.; MAIA, M.S. Ranqueamento/agrupamento do sêmen congelado de carneiros da raça Santa Inês analisados pelo sistema CASA e sondas fluorescentes pela análise estatística multivariada. **Vet Zootec**, v.20, p.649-657, 2012.

SOUZA, C. E., REGO, J.P., LOBO, C.H., OLIVEIRA, J.T., NOGUEIRA, F. C., DOMONT, G. B., FIORAMONTE, M., GOZZO, F. C., MORENO, F. B., MONTEIRO-MOREIRA, A.C., FIGUEIREDO, J.R., MOURA, A. A. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. **Jornal of proteomics**, v.75, p.4436-4456, 2012.

SOUZA, F. A. A.; LOPES, M. A.; DEMEU, F. A. Panorama da ovinocultura no estado de São Paulo. **Revista Ceres**, v. 55, n. 5, p. 384-388, 2008.

STAUDT, N. P.; SILVA, R. O. P. Perspectivas da produção de ovinos no estado de São Paulo. **Revista Análises e Indicadores do agronegócio**, v. 3, n. 5, p. 1-4, 2008.

STEFANI, J.S.; PAHLA, M.D.C.; CHRISTMAN, L.; ROSA, J.M.; SILVEIRA, M.C .; RODRIGUES, J.L. Laparoscopic versus surgical transfer of ovine embryos. **Theriogenology** 33, 330, 1990.

TATEMOTO, H.; OSHIRO, R.; SHIMADA, H.; KONNO, T.; YAMANAKA, K.; ASHIZAWA, K. Addition of casein to the diluents during sêmen transportation improves the post-thaw qualities of okinawan native agu pig spermatozoa. **Nishihara**: Editora, p75-86, 2015.

HÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 768–776, 1998.

THOMAS, A.D.; MEYERS, S.A.; BALL, B.A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p.1531-1550, 2006.

VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M. A.; PERÉZ, L.; MOSES, D.F.; BALDASSARRE, H. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 41, p. 483-489, 1994.

VALENTE, S.S.; PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C.; MARQUES, C.C.; VASQUES, M.I.; SILVA PEREIRA, M.V.C.; HORTA, A.E.M.; BARBAS, J.P. In

vitro and in vivo fertility of ram semen cryopreserved in different extenders. **Anim Reprod Sci**, v.117, p.74-77, 2010.

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

VICENTE-CARRILLO, A.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. The CatSper channel modulates boar sperm motility during capacitation. **Reproductive biology**, p. 2-10, 2016.

VIEIRA-NETO, M. F. **Efeito da flunixin meglumina na atividade espermática de machos ovinos e caprinos**. 2017. Dissertação (Mestrado - Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza-CE.

WALES, R. G.; WHITE, I. G. The susceptibility of spermatozoa to temperature shock. **J. Endocrinol.** v. 19, p. 211-220, 1959.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 61, p. 481-492. 2000.

WATSON, P. F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: MORRIS, G. J.; CLARKE, A. (Eds.). **Effects of low temperatures on biological membranes**. London: Academic Press, p. 189-218, 1981.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the criopreservation of spermatozoa and assessment of their pos-thawing fuction. **Reproduction Fertility Development**, v.7, n.4, p.871-91, 1995.

WATSON, P.F. The causes of reduce fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci**, v.60-1, p.481-492, 2000.

WHITE, I. G. Lipids and calcium uptakes of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction Fertility and Development**, v. 5, n. 6, p. 639–658, 1993.

YANAGIMACHI, R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. **Zygote**, v. 3, p. 371-372, 1994.