

## AVANÇOS NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN OVINO VISANDO SUA APLICAÇÃO EM PROGRAMAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E EM BIOTECNOLOGIAS COM EMBRIÕES

Bicudo, S.D.<sup>1</sup>; Azevedo, H.C.<sup>2</sup>; Maia, S.M.<sup>3</sup>; Green, R.E.<sup>4</sup>; Rodello, L.<sup>4</sup>; Meira, C.<sup>1</sup>

BN

<sup>1</sup>DRARV, FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu – SP, <sup>2</sup>EMBRAPA- Tabuleiros Costeiros – SE, <sup>3</sup>EMBRAPA- Semi-árido – PB, <sup>4</sup>P.G. Med. Vet., FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu – SP, sony@fmvz.unesp.br

### RESUMO

Os princípios e técnicas a serem utilizadas na criopreservação do sêmen ovino se equivalem aos demais ruminantes domésticos. Há, entretanto peculiaridades na espécie ovina decorrentes principalmente da composição das membranas que conferem aos espermatozoides congelados/descongelados queda na atividade respiratória, criocapacitação em larga escala, modificação da interação com as células do oviduto e possivelmente pequeno incremento nas taxas de mortalidade embrionária. Objetivou-se discutir os avanços no processo de criopreservação de sêmen ovino e sua aplicação em programas de inseminação artificial e biotecnologia de embriões; enfatizando-se a avaliação da qualidade espermática e as possibilidades de incorporação ao sêmen ou adição aos meios diluidores de substâncias como lipídios, ácidos graxos, proteínas e antioxidantes. Discute-se, ainda que de maneira sucinta, as implicações da qualidade do sêmen na eficiência de programas de transferência de embriões. **Palavras chave:** Ovinos, inseminação artificial, transferência de embriões, sêmen congelado, meios diluidores, aditivos ao sêmen.

### INTRODUÇÃO

A criopreservação do sêmen nas várias espécies leva a uma série de alterações celulares que contribuem para a redução da fertilidade, quando comparado ao sêmen a fresco. As membranas dos espermatozoides são uma das estruturas mais afetadas durante a criopreservação, especialmente a do carneiro que apresentam peculiaridades em sua composição.

A menor longevidade do sêmen ovino descongelado leva a necessidade da utilização da I.A intra-uterina, depositando-se o sêmen próximo ao sítio de fecundação por meio da laparoscopia para que se alcance taxas de fertilidade comparáveis ao sêmen a fresco na I.A. cervical ou vaginal. Esta revisão tem por objetivo discutir os avanços no processo de criopreservação de sêmen ovino a ser aplicado em programas de I.A e TE.

### PRINCÍPIOS DA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN OVINO

A redução de temperatura durante o processo de refrigeração e congelação do sêmen pode afetar a motilidade e capacidade respiratória do espermatozóide. Durante o procedimento, as bombas adenosina trifosfato dependentes, dentre elas, a de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  são afetadas, provocando despolarizações parciais das membranas, tornando-as permeáveis ao cálcio. Com isto induz-se a vesiculação prematura da membrana acrossomal e danifica-se a membrana mitocondrial (AMANN & PICKETT, 1987). Injúrias na arquitetura da bainha mitocondrial durante a congelação/descongelação resultam na redução da capacidade respiratória e baixa disponibilidade de energia, diminuindo assim a motilidade espermática (GILLAN et al., 2004).

De acordo com Spungin et al. (1995) a despolimerização dos filamentos de actina do citoesqueleto é uma etapa importante da capacitação e da reação acrossomal, permitindo a aproximação das membranas plasmáticas e acrossomal promovendo a exocitose acrossomal. Sendo o citoesqueleto celular termo-sensível, a congelação/descongelação das células resultam em uma despolimerização dos filamentos de actina e contribuem para a desorganização das membranas antecipando o processo de capacitação e reação acrossomal (BRENER et al., 2003). Além disso, o estresse osmótico (CURRY & WATSON, 1994) e oxidativo (CURRY, 2000) causam injúrias nas membranas plasmática e acrossomal e também contribuem na antecipação da capacitação e reação acrossomal tanto no processo de refrigeração quanto na congelação/descongelação causando a redução da longevidade do espermatozóide.

Altos níveis de colesterol na membrana inibem a cristalização das cadeias de hidrocarbono a baixas temperaturas, eliminando desta maneira a transição de fase dos lipídios (ROTTEM et al., 1973). Espermatozoides de espécies que possuem altas taxas de colesterol, a exemplo dos coelhos e humanos, são resistentes ao choque térmico (MESEGUEU et al., 2004). O espermatozóide de carneiro por outro lado, possui menor taxa molar de colesterol/fosfolípido quando comparado a essas espécies (DARIN-BENNETT & WHITE, 1977).

### Metabólitos reativos do oxigênio (ROS)

O estresse oxidativo, causado pela geração de altas concentrações de ROS, que o espermatozóide pode sofrer durante o processamento do sêmen, tem recebido atenção nas diversas espécies (BIODEAU et al., 2002).

Os principais ROS geradas pelo espermatozóide são: o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o radical hidroxila ( $\text{OH}$ ). O peróxido de hidrogênio é considerado o mais tóxico dos ROS, por que é mais estável e rapidamente atravessa a membrana plasmática (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Baixas concentrações de ROS ( $\text{O}_2^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) são necessárias para que o espermatozóide adquira a capacidade fecundante (BAUMBER et al. 2003). No entanto, a geração de altas concentrações de ROS no sêmen pode afetar o metabolismo de energia do espermatozóide, a motilidade, a viabilidade e a integridade do DNA em várias

espécies (BLOODEAU et al., 2002).

### Lipoperoxidação (LPO) e geração de ROS no sêmen de carneiros

A membrana plasmática do espermatozóide do carneiro é rica em ácidos graxos poli insaturados o que a torna muito susceptível a peroxidação lipídica e ao ataque dos ROS. A peroxidação dos lípidos (LPO) é uma causa importante de disfunção espermática e está correlacionada a prejuízo da motilidade e morfologia espermática. (AITKEN, 1995).

### AVALIAÇÃO DO SÊMEN CRIOPRESERVADO

Testes *in vitro* são freqüentemente realizados na determinação da qualidade do sêmen para a sua utilização em inseminações artificiais ou em procedimentos de biotecnologia de embriões em ovinos, devido à relação existente entre qualidade do material seminal e fertilidade.

#### Preparação úmida em microscopia de contraste de fase

As técnicas que usam corantes em esfregaços de sêmen podem induzir danos às estruturas espermáticas durante a sua confecção, o que geralmente não acontece em preparações úmidas. As preparações úmidas são as mais simples e fidedignas para o estudo do acrosomo bem como de outras estruturas espermáticas, sendo aquela com tampão fosfato associada a baixa concentração de glutaraldeído a mais recomendada (BARTH & OKO, 1989).

#### Sondas em microscopia epifluorescente

Várias sondas fluorescentes podem ser empregadas para distinguir células espermáticas ovinas viáveis e não viáveis como o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), iodeto de propídio (PI) e o Hoechst 33258.

Como indicadores de danos ao acrosomo, lecitinas marcadas particularmente a aglutinina derivada do *Pisum sativum* conjugada com a fluoresceína isotiocianato (FITC-PSA), podem ser empregadas na avaliação do sêmen ovino com o objetivo de distinguir células espermáticas com acrosomo reagido daquelas com acrosomo intacto (AZEVEDO, 2006).

Harrison & Vickers (1990) relacionaram a coloração da peça intermediária por CFDA à integridade das mitocôndrias em ovinos. Já a função mitocondrial pode ser avaliada usando-se o Iodeto de 5,5',6,6' tetracloro - 1,1,3,3' - tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) que permite classificar os espermatozóides que apresentem alto e baixo potencial de membrana mitocondrial (AZEVEDO, 2006).

Para avaliação do *status* de capacitação espermática em ovinos a técnica de fluorescência empregando-se clortetraciclina (CTC) apresenta a vantagem de permitir não apenas a distinção entre células com acrosomo intacto e reagido, mas também diferenciar células com acrosomo intacto em duas categorias funcionalmente diferentes, capacitadas e não capacitadas (AZEVEDO, 2006).

#### Cinética espermática em microscopia ótica computadorizada

A cinética dos espermatozóides pode ser avaliada no sêmen ovino diluído ou congelado/descongelado convencionalmente pela motilidade e o vigor espermático (RODELLA, 2006).

A avaliação da cinética de um grande número de espermatozóides pode ser determinada em análise do movimento espermático monitorada por computador (CASA) no qual cada trajetória da cabeça do espermatozóide é registrada, reconstituída e mensurada (MORTIMER & MAXWELL, 2004). A CASA proporciona a oportunidade de acessar múltiplas características em uma única amostra com alta repetibilidade.

Sousa et al. (2007) propuseram a avaliação das sub-populações espermáticas pela análise individual da cinética de cada célula no sistema CASA integrada a sondas fluorescentes combinadas (SFC - iodeto de propídeo; FITC-PSA; Mitotracker Green FM) considerando os fatores: F1, relacionado à progressividade do movimento; F2, representando o deslocamento espermático sem considerar a direção do movimento; F3, relacionado à energia disponível/disponibilizada para a movimentação espermática. Com o uso da análise estatística multivariada do sêmen ovino congelado/descongelado foi possível determinar no sistema CASA e teste SFC diferenças fisiológicas e na cinética das sub-populações bem como estabelecer a analogia entre parâmetros do sistema CASA e teste SFC.

### ADITIVOS AOS MEIOS DILUIDORES

Baseando-se na composição e na dinâmica das membranas espermáticas, existem propostas da incorporação ao sêmen ou adição aos meios diluidores de diversas substâncias, na tentativa de minimizar os danos impostos pela criopreservação aos espermatozóides.

#### Ácidos graxos

O grau de insaturação ou a taxa de ácidos graxos insaturados em relação aos saturados influencia nas propriedades físicas das membranas e em sua fluidez e resistência ao choque térmico em especial ao frio (WHITE, 1993).

A adição de ácidos graxos insaturados visa aumentar a fluidez das membranas espermáticas conferindo maior resistência à criopreservação. Entretanto, nenhum efeito da incorporação de ácido oléico-linoaleno<sup>11,12</sup> foi verificado por Azevedo (2006) em relação à cinética, viabilidade, integridade acrossomal e status de capacitação e reação acrossomal de espermatozoides ovinos criopreservados.

### Colesterol

Durante a capacitação, a remoção do colesterol desempenha importante papel na habilidade fecundante da célula espermática devido sua ação na estabilização dos lipídios (SION et al., 2001), e na regulação da fluidez das membranas (ROTTM et al., 1973).

Adicionalmente, a incorporação de colesterol à membrana plasmática tem sido proposta com a finalidade de aumentar a longevidade do sêmen após a congelação por reduzir a capacitação espermática precoce induzida pela criopreservação (PURDY & GRAHAM, 2004).

Azevedo (2006) não obteve efeito benéfico significativo com a incorporação do colesterol ao sêmen ovino previamente ao processo de criopreservação.

### Proteínas

A adição das proteínas ao meio diluidor antes da ocorrência de choque térmico pode ter um efeito benéfico imediato sobre a sobrevivência espermática no sêmen ovino. A á-lactoalbumina bovina tem sido utilizada no sêmen ovino com incremento na cinética, viabilidade e manutenção da heterogeneidade da população espermática (OLLERO et al., 1998). Entretanto, a adição de á-lactoalbumina não incrementou a cinética, viabilidade, integridade do acrossomo e status de capacitação e de reação acrossomal dos espermatozoides ovinos criopreservados (AZEVEDO, 2006).

A capacidade da albumina sérica bovina (BSA) em se aderir a diferentes lipídeos é bem conhecida e este efeito pode ser responsável pela preservação da superfície celular ao rompimento lipídico o que, consequentemente, evitaria a perda dos componentes de membrana (OLLERO et al., 1996). A adição de BSA aos espermatozoides ovinos tem como benefício a elevação da motilidade, manutenção da cinética espermática no sêmen refrigerado e a preservação da viabilidade espermática após a congelação (UPRETI et al., 1995; OLLERO et al., 1996).

### Antioxidantes

Para combater o estresse oxidativo e a lipoperoxidação o espermatozoide conta com um sistema antioxidante constituído da glutationa reduzida (GSH), glutationa peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), ácido ascórbico e α-tocoferol (AITKEN, 1995). Extracelularmente ele é protegido pelo plasma seminal que contém vários redutores de ROS, enzimáticos e não enzimáticos que incluem: ácido ascórbico, ácido úrico, albumina e outras proteínas, catalase, SOD, glutationa e outros tióis, taurina, hipotaurina e vitamina E (ZINI et al. 2000).

No sêmen de carneiro, mantido na forma líquida, Sarlos et al., (2002) avaliaram o efeito dos antioxidantes: acetato de α-tocoferol, glutationa peroxidase, aromex, resveratrol e da associação de resveratrol + vitamina E ou resveratrol + aromex, na motilidade e integridade das membranas espermáticas e observaram que a adição de antioxidantes prolongou o período de conservação do sêmen, melhorou a motilidade do espermatozoide e reduziu o grau de danos celulares. Maxwell & Stojanov (1996) avaliaram o efeito da adição de catalase, superóxido dismutase, citocromo c e glutationa peroxidase ao diluidor, sobre a viabilidade espermática e observaram que todos os antioxidantes foram hábeis em melhorar tanto a sobrevivência quanto à integridade acrossomal do espermatozoide durante a estocagem do sêmen na forma líquida. Já Uperti et al., (1997) não observaram efeito benéfico da adição de antioxidantes (vitamina E, BHA, n-propil galato, Desferal e catalase) ao diluidor na manutenção da motilidade do espermatozoide de carneiros incubados a 38 °C.

No sêmen ovino congelado/descongelado com diluente Tris-gema, Sánchez-Partida et al., (1997) avaliaram o efeito dos compostos epididimários taurina, hipotaurina e inositol e dos antioxidantes carnosina e ácido ascórbico sobre a motilidade e a fertilidade do espermatozoide e observaram que apenas a taurina exerceu efeito positivo na motilidade espermática, sem, no entanto, apresentar qualquer efeito sobre a fertilidade do sêmen. Maia (2006) observou que a adição de catalase não melhorou a motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), VAP e VCL em relação ao controle (sem antioxidantes).

Maia (2006) constatou que a suplementação do diluidor com os antioxidantes Trolox-C ou catalase individualmente, teve efeito benéfico na manutenção da integridade de membrana plasmática e acrossomal, avaliado pelas sondas IP e FITC-PSA, em relação ao controle (TRIS). O percentual de espermatozoides viáveis com acrossomo intacto foi maior no diluidor aditivado de catalase, sendo que o Trolox-C também exerceu efeito semelhante ao da catalase, embora em proporção inferior.

A peroxidação dos lipídios da membrana espermática pode ser controlada ou mesmo revertida pela adição de antioxidantes ao meio diluidor. Maia (2006) mediu a lipoperoxidação espontânea e induzida por ferro, em amostras de sêmen de carneiros Santa Inês congelado no diluidor Tris-gema aditivado ou não do antioxidante Trolox-C. A concentração de TBARS gerados na lipoperoxidação espontânea não diferiu entre as amostras congeladas com ou sem antioxidante. No entanto, quando a LPO foi induzida pelo ferro, a concentração de TBARS foi maior ( $P<0,05$ ) no diluidor sem Trolox-C que na presença do antioxidante. Deduz-se que em situação de estresse oxidativo o Trolox-C é hábil em inibir a propagação da lipoperoxidação no sêmen ovino durante um ciclo de congelação/descongelação. Sarlos et al. (2002) observaram um aumento da concentração de MDA em

amostras de sêmen de carneiros incubado a 37°C por 120 minutos sem antioxidante, enquanto que nas amostras incubadas com antioxidante, os níveis de MDA mantiveram-se mais baixos ou semelhantes, aos 30, 60 e 120 minutos de incubação.

Maia (2006) quantificou a geração de ROS no sêmen ovino criopreservado no diluidor Tris-gema aditivado de Trolox-C e catalase e observou que a geração de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e OH (LPO) foi detectada no sêmen congelado/descongelado em todos os diluidores e que em situação de estresse oxidativo, induzido pela adição de ferro, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou sistema gerador de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ao meio de incubação, os antioxidantes foram eficazes em remover o excesso de ROS e manter o equilíbrio do sistema.

## IMPLICAÇÕES DA QUALIDADE ESPERMÁTICA NA EFICIÊNCIA DE PROGRAMAS DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

A taxa de fertilização de ovócitos em programas de transferência de embriões é um dos fatores importantes para o sucesso em programas de múltipla ovulação e transferência de embriões. A qualidade espermática deve ser controlada sistematicamente de acordo com critérios mínimos estabelecidos para a inseminação artificial e/ou monta natural (BARIL et al., 1995), sendo que a qualidade espermática está diretamente relacionada a fatores individuais dos reprodutores e tipo de processamento do sêmen.

Fukui et al (1988) utilizando sêmen fresco e Morris et al (1998) sêmen congelado demonstraram que os carneiros individualmente afetam a taxa de fertilização e a habilidade de clivagem após a fertilização.

As características seminais como viabilidade e morfologia espermática estão associadas com falhas na fertilização e embriogênese (CHENOWETH, 2007). Tornou-se evidente que o sêmen criopreservado afeta de forma significativa diversos atributos espermáticos, como a motilidade, atividade respiratória, status de membrana e qualidade de DNA. Consequentemente, a viabilidade espermática diminui alterando o tempo e a taxa de fertilização, comparados com espermatozoides a fresco (GILLAN et al., 2004). Dessa forma, baixas porcentagens de embriões recuperados em ovelhas superovuladas e inseminadas com sêmen congelado são obtidas em relação às ovelhas inseminadas com sêmen fresco. A curta duração da sobrevivência espermática após a descongelação, associado à imprecisão do momento da ovulação constitui fatores limitantes para o êxito da produção de embriões utilizando sêmen congelado (BARIL et al., 1995).

Falhas na fertilização também podem ser observadas quanto ao local de deposição do sêmen. Utilizando-se inseminação intra-uterina com sêmen fresco em ovelhas superovuladas, encontram-se taxas de fertilização de ovócitos variando de 70 a 90% (LYMBEROPOULOS et al. 2001). Porém taxas inferiores são obtidas quando ovelhas superovuladas são inseminadas por via cervical ou cobertas por monta natural (ROBINSON et al. 1989). Dessa forma, a inseminação intra-uterina é um método válido para aumentar a fertilização dos ovócitos, pois em ovelhas superovuladas parece haver uma falha no transporte espermático ao útero e oviduto através da cérvix e consequente prejuízo na fertilização (EVANS & ARMSTRONG, 1984).

Conclui-se que um dos fatores que limita o sucesso da transferência de embriões em ovinos é a falha da fertilização após a superovulação, ocorrendo principalmente em ovelhas com alta taxa ovulatória (D'ALESSANDRO et al., 2005). Sendo necessário ponderar o tipo e a qualidade do sêmen a ser utilizado, além do local de deposição dos espermatozoides para se obter maior sucesso em programas de transferência de embriões.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS:

A conservação do sêmen sob congelação é uma importante ferramenta do melhoramento genético e da preservação de material biológico de alto interesse. Os programas comerciais mais bem sucedidos e de maior abrangência comercial são desenvolvidos em bovinos. Há, entretanto grande interesse comercial e científico no aprimoramento da eficiência da criopreservação do sêmen ovino. Nas últimas décadas muitos progressos têm sido feitos no sentido de melhor entender as peculiaridades que envolvem a preservação do sêmen desta espécie e estes conceitos se adequadamente aplicados representaram avanços técnicos importantes. Persistem ainda algumas barreiras a serem superadas, porém o *status da arte* atual já permite a utilização comercial com sucesso do sêmen ovino congelado.

## REFERÊNCIAS

- AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod. Fertil. Devel.*, v. 7, p. 659-68, 1995.  
AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Reprod.*, v.7, n.3, p.145-73, 1987.
- AZEVEDO, H.C. *Integridade e funcionalidade dos espermatozoides ovinos submetidos à criopreservação após a incorporação de colesterol, desmosterol, ácido oléico-linoléico e á-lactoalbumina*. Botucatu, 2006. 195p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- BARIL, G.; BREBION, P.; CHESNÉ, P. *Manual de Formación Práctica para el Transplante de Embiones en Ovejas y Cabras*. Roma. FAO, 1995. 175p.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Iowa: Iowa State University Press/AMES, 1989. 285p.
- BAUMBER, J.; SABEUR, K.; VO, A.; BALL, B.A. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 60, p.1239-47, 2003.
- BIODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; CORMIER, N.; SIRAD, M-A. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or

- oviductal fluid catalase. *Theriogenology*, v.57, p.1105-22, 2002.
- BRENER, E.; RUBINSTEIN, S.; COHEN, G.; SHTERNALL, K.; RIVLIN, J.; BREITBART, H. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Bio. Reprod.*, v.68, p.837-45, 2003.
- CHENOWETH, P.J. Influence of the male on embryo quality. *Theriogenology*, in Press, 2007.
- CURRY, M.R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction*, v.5, p.46-52, 2000.
- CURRY, M.R.; WATSON, P.F. Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology*, v.31, p.39-46, 1994.
- D'ALESSANDRO, A.G.; MARTEMUCCI, G.; TAIBI, L. How the FSH/LH ratio and dose numbers in the p-FSH administration treatment regimen, and insemination schedule affect superovulatory response in ewes. *Theriogenology*, v. 63, p. 1764-74, 2005.
- DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I. G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, v. 14, p. 466-70, 1977.
- DOULGAS-HAMILTON, D.H.; OSOL, R.; OSOL, G. A field study of the fertility transported equine semen. *Theriogenology*, v.22, n.3, p.291-304, 1984.
- EVANS, G.; ARMSTRONG, D.T. Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. *J. Reprod. Fertil.*, v. 70, p. 47-53, 1984.
- FUKUI, Y.; GLEW, A.M.; GANDOLFI, F.; MOOR, R.M. Ram-specific effects on in vitro fertilization and cleavage of sheep oocytes matured in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, v. 82, p. 337-40, 1988.
- GILLAN, L.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 16, p. 447-54, 2004.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3ed., Oxford University Press: New York, 1999, 936p.
- HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.88, n.1, p.343-52, 1990.
- HOLT, W.V. Basic aspect of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.62, p.3-22, 2000.
- LYMBEROPoulos, A.G.; AMIRIDIS, G.S.; KÜHHOLZER, B.; BESENFELDER, U.; CHRISTODOULOU, V.; VAINAS, E.; BREM, G. Fertilization and embryo recovery rates in superovulated chios ewes after laparoscopic intrauterine insemination. *Theriogenology*, v.55, p. 1855-62, 2001.
- MAIA, M.S. **viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), trolox-c e catalase**. 2006. 147p. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu.
- MAXWELL, W.M.C.; STOJANOV, T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reproduction, Fertility and Development*, v.8, p.1013-20, 1996.
- MESEGUE, M.; GARRIDO, N.; MARTINEZ-CONEJERO, J. A.; SIMON, C.; PELLICER, A.; REMOHI, J. Role of cholesterol, calcium, and mitochondrial activity in the susceptibility for cryodamage after a cycle of freezing and thawing. *Fertility and Sterility*, v. 81, n. 3, p. 588-94, 2004.
- MORRIS, L.H.A.; POLLARD, J.W.; KOCHHAR, H.P.S.; KING, W.A.; BUCKRELL, B.C. Differences in in vitro embryo developmental rates amongst four rams. *Biol. Reprod. Abstr. Series 58* (suppl. 1), p. 100, 1998.
- MORTIMER, S. T.; MAXWELL, W. M. C. Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction*, v. 127, p. 285-91, 2004.
- OLLERO, M.; MUIÑO-BLANCO, T.; LÓPEZ-PÉREZ, M. J.; CEBRIAN PÉREZ, J. A. Surface changes associated with ram sperm cryopreservation revealed by counter-current distribution in an aqueous two-phase system. Effect of different cryoprotectants. *Journal of Chromatography*, v.680, p.157-64, 1996.
- OLLERO, M.; PERÉZ-PÉ, R.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIAN PÉREZ, J. A. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. *Cryobiology*, v.37, p.1-12, 1998.
- PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Effect of Cholesterol – loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*, v. 48, p. 36-45, 2004.
- ROBINSON, J.J.; WALLACE, J.M.;AITKEN, R.P. Fertilization and ovum recovery rates in superovulated ewes following cervical insemination or laparoscopic intrauterine insemination at different times after progestagen withdrawal and in one or both uterine horns. *J. Reprod. Fert.*, v. 87, p. 771-82, 1989.
- RODELLO, L. **Validação de sistema automatizado de refrigeração e congelação de sêmen ovino**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu. Botucatu: L. Rodello, 2006. 70p.
- ROTTEM, S.; YASHOUV, J.; NE'EMAN, A.; RAZIN, A. Composition, ultra-structure and biological properties of membrane from *Mycoplasma mycoides* var. *capri* cells adapted to grow with low cholesterol concentrations. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 323, p. 495-508, 1973.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.62, p.77-111, 2000.
- SÁNCHEZ-PARTIDA, L.G.; SETCHELL, B.P.; MAXWELL, W.M.C. Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, v.9, p. 689-96, 1997.
- SARLOS, P.; MOLNAR, A.; KOKAI, M. GABOR, G.Y.; RÁTKY, J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Veterinaria Hungarica*, v.50, n.2, p.235-45, 2002.
- SION, B.; GRIZARD, G.; BOUCHER, D. Quantitative analysis of desmosterol, cholesterol and cholesterol sulfate in semen by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v.935, p.259-65, 2001.
- SOUSA, D.B.; BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C.; MAIA, M.S.; RODELLO, L.; SICHERLE, C.C. Ranqueamento

qualitativo do sêmen congelado de carneiros através da análise estatística multivariada avaliado pelo sistema Casa e sondas fluorescentes. IN: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, Curitiba, PR, 2007. Anais... Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2007 (meio eletrônico- resumo 144) <http://www.cbra.org.br>

SPUNGIN, B., MARGALIT, I., BREITBART, H. Sperm exocytosis reconstructed in a cell free system. Evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *J. Cell Sci.*, v.108, p.2525-35, 1995.

UPRETI, G. C.; OLIVER, J. E.; DUGANZICH, D. M.; MUNDAY, R.; SMITH, J. F. Development of a chemically defined ram semen diluted (RSD-1). *Animal Reproduction Science*, v. 37, p. 143-157, 1995.

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. 639-58, 1993.

ZINI, A.; GARRELS, K.; PHANG, D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. *Urology*, v.55, n.6, p. 922-6, 2000.



Ainalp 14749

