



Aspectos fundamentais da morfofisiologia e criopreservação espermática em pequenos ruminantes

Fundamental aspects of sperm morphophysiology and cryopreservation in small ruminants

E.C.B. Silva¹, M.M.P. Guerra

Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

¹Correspondência: silva.ecb@gmail.com

Resumo

A criopreservação espermática, apesar de oferecer inúmeras vantagens à produção animal, é responsável pelo comprometimento da integridade estrutural e funcional dos espermatozoides, o que é intensificado pelas variações individuais e espécie-específicas, as quais interferem na capacidade dos gametas em suportarem este procedimento. Deste modo, o objetivo desta revisão é descrever a morfofisiologia espermática e os aspectos fundamentais do processo de criopreservação, assim como o comportamento dos espermatozoides criopreservados de caprinos e ovinos.

Palavras-chave: crioinjúria, crioprotetor, diluidor, espermatozoide.

Abstract

The sperm cryopreservation, despite offering several advantages to livestock, is responsible for the impairment of structural and functional integrity of sperm, which is intensified by individual and species-specific variations, which interfere on the ability of gametes to support this procedure. Thus, the aim of this review is to describe the sperm morphophysiology and the fundamental aspects of the cryopreservation process, as well as the behavior of goat and ram cryopreserved sperm.

Keywords: cryoinjury, cryoprotectants, diluent, sperm.

Introdução

A criopreservação do sêmen, associada à inseminação artificial (IA), é uma biotécnica reprodutiva que oferece muitas vantagens à indústria da produção animal (Salamon e Maxwell, 1995), especialmente relacionada a programas de melhoramento animal. Entretanto, para alguns reprodutores, a conservação de seus espermatozoides pelo frio torna-se um problema, particularmente quando armazenados congelados, o que pode resultar em alterações biológicas e funcionais (Ortega et al., 2003). Tais alterações são responsáveis por causar danos às membranas espermáticas, redução da motilidade e da viabilidade espermática, e posteriores prejuízos durante o transporte dos gametas no sistema reprodutivo da fêmea e durante a fertilização (Salamon e Maxwell, 1995; Ortega et al., 2003). Diante do exposto, foi objetivado nesta revisão descrever a morfofisiologia espermática e os aspectos fundamentais do processo de criopreservação, assim como o comportamento dos espermatozoides criopreservados, de caprinos e ovinos.

Célula espermática

Os espermatozoides ou gametas masculinos foram identificados em 1677 por Van Leeuwenhoek (Sikka, 1996; Pesch e Bergmann, 2006; Silva e Gadella, 2006) e classificados como células terminais, desprovidas de capacidade reparadora (Purdy, 2006b) e morfológicamente divididas em cabeça, colo e cauda (Singh, 2006). Esses gametas são produzidos nos testículos, por um processo conhecido como espermatogênese, e maturados no epidídimo (Setchell, 1993), constituindo o sêmen quando em associação às secreções das glândulas sexuais acessórias (Nalbandov, 1976; Hafez e Hafez, 2004).

A cabeça do espermatozoide, em geral, é constituída por acrossoma e núcleo, sendo o acrossoma uma organela originada a partir do complexo de Golgi e com enzimas hidrolíticas em seu interior, tais como pró-acrosina, hialuronidase, esterases e hidrolases ácidas (Pesch e Bergmann, 2006). Essas enzimas são liberadas durante o processo de reação acrossomal para que haja a penetração do espermatozoide no oócito (Pesch e Bergmann, 2006), ou seja, a fertilização (Esteves et al., 2000), devendo o acrossoma se manter íntegro até que a zona de ligação entre o gameta masculino e o feminino esteja completa (Silva e Gadella, 2006).

O núcleo do espermatozoide retém a cromatina condensada com as informações genéticas que irão constituir o genoma de um novo indivíduo, após fertilização, sendo a integridade desta estrutura indispensável para que haja o perfeito desenvolvimento embrionário e para que a gestação seja levada a termo (Moraes et al.,



1998). Neste contexto, existem evidências de que os defeitos na estrutura nuclear apresentam correlação positiva com a redução da capacidade fertilizante dos espermatozoides e desenvolvimento de defeitos embrionários precoces (Pesch e Bergmann, 2006), tornando o potencial de fertilidade das células espermáticas um reflexo do estado de sua cromatina (Evenson et al., 1999).

O colo do espermatozoide representa a pequena área de ligação entre a cabeça e a peça intermediária (Mies Filho, 1987), enquanto a cauda corresponde à parte mais longa do espermatozoide, formada pelas peças intermediária, principal e terminal (Singh, 2006). A peça intermediária é de estrutura complexa e caracterizada pela presença da bainha mitocondrial (Mies Filho, 1987; Carvalho et al., 2002), responsável pela geração da energia utilizada pelo axonema para execução dos movimentos flagelares (Carvalho et al., 2002; Hafez e Hafez, 2004; Singh, 2006), essenciais para que os espermatozoides de mamíferos alcancem o local da fertilização e possam dar início a este processo (Pesch e Bergmann, 2006).

Adicionalmente, é sabido que toda a extensão da célula espermática é recoberta pela membrana plasmática, a qual possui caráter lipoproteico e tem por função manter o gradiente químico de íons e outros componentes solúveis, por meio de sua característica de semipermeabilidade (Silva e Gadella, 2006). Deste modo, para que os espermatozoides tenham sucesso na fertilização, é necessário que apresentem membranas e organelas funcionais e genoma haploide intacto, visto que apenas nestas condições os gametas masculinos podem sofrer capacitação, reação acrossomal e hiperativação (Silva e Gadella, 2006), essenciais ao processo de fertilização (Ladha, 1998).

Criopreservação do sêmen

A congelação do sêmen oferece notáveis benefícios práticos à reprodução (Holt, 2000; Fickel et al., 2007), particularmente pela formação dos bancos de germoplasma, uma vez que o frio é o promotor mais eficiente do estado de anabiose (Mies Filho, 1987). Entretanto, a congelabilidade do sêmen sofre influência de variações específicas (Bailey e Buhr, 1995; Hafez e Hafez, 2004; Stornelli et al., 2005) e individuais, as quais são descritas como provenientes de diferenças biofísicas e bioquímicas das membranas dos espermatozoides (Hafez e Hafez, 2004).

Além das variações entre espécies e indivíduos à congelação, atenção especial deve ser dada ao tipo de processamento utilizado para a congelação. Para a espécie caprina, por exemplo, a necessidade de centrifugação do sêmen para a remoção das fosfolipases do plasma, antes de sua diluição e criopreservação, é uma etapa que submete os espermatozoides a danos celulares e, conseqüentemente, ao comprometimento de sua integridade (Castelo et al., 2008). Em virtude disto, é essencial a otimização da técnica de congelação de acordo com o tipo de sêmen utilizado (Ortega et al., 2003), para que não somente haja a conservação de um elevado número de espermatozoides sobreviventes, como também estes tenham habilidade fertilizante (Stornelli et al., 2005).

Diluentes

Em termos gerais, nos meios diluidores devem estar presentes carboidratos, como fonte de energia; tampões para manutenção do pH e da pressão osmótica em faixas apropriadas; antibióticos para inibir o crescimento microbiano no sêmen; crioprotetores não penetrantes que, além de terem função nutritiva, protegem as células contra o choque frio, à medida que os espermatozoides são refrigerados até 5°C; e crioprotetores penetrantes para protegerem os espermatozoides dos efeitos deletérios da congelação (Hafez e Hafez, 2004; Purdy, 2006a).

Os ambientes químicos e osmóticos dos espermatozoides exercem importante papel sobre sua sobrevivência (Holt, 2000), tornando indispensável que os diluentes utilizados para a preservação do sêmen apresentem pH e osmolaridade adequados e capacidade protetora contra as crioinjúrias (Salamon e Maxwell, 2000). Para as espécies caprina e ovina é recomendado que o pH e a osmolaridade dos meios de congelação de sêmen estejam na faixa de 6,8 e 300 mOsm (Oliveira et al., 2011), respectivamente, para que haja manutenção da integridade estrutural e funcional dos espermatozoides (Soylu et al., 2007).

Com relação aos crioprotetores, os quais são classificados como penetrantes e não penetrantes nas células, estes são acrescidos ao meio de criopreservação com a finalidade de minimizar os estresses físicos e químicos resultantes da refrigeração, congelação e descongelação dos espermatozoides (Purdy, 2006a). O efeito protetor destes agentes decorre de suas propriedades coligativas, o que determina a redução da formação de gelo como conseqüência da redução do ponto eutético, além da desidratação da célula e de sua exposição a um menor estresse osmótico (Ávila-Portillo et al., 2006).

Os crioprotetores não penetrantes são macromoléculas que, durante a congelação, dispõem-se entre a membrana plasmática e os fluidos hiperosmóticos que a rodeiam (Holt et al., 1992), sendo sua ação crioprotetora efetiva, mesmo quando são utilizadas elevadas velocidades de congelação, o que se deve à promoção de uma rápida desidratação celular (Ávila-Portillo et al., 2006). Entre os crioprotetores não penetrantes de maior destaque para a criopreservação de espermatozoides caprinos e ovinos estão a gema de ovo e o leite desnatado, embora outros agentes também possam ser utilizados com a mesma finalidade, como é o caso de alguns



aminoácidos e açúcares (Purdy, 2006a).

A gema de ovo e o leite desnatado são comumente utilizados nos diluidores seminais pelo fato de protegerem as células durante as etapas de congelamento e descongelamento, com ação característica sobre a membrana plasmática dos espermatozoides (Salamon e Maxwell, 2000). Os fosfolípidos e as lipoproteínas de baixa densidade, presentes na gema de ovo, possuem efeito protetor contra o choque frio (Stornelli et al., 2005) e possibilitam a restauração dos fosfolípidos da membrana perdidos durante a refrigeração do sêmen (Hammerstedt et al., 1990), o que também se aplica ao leite desnatado (Mies Filho, 1987).

Apesar de a gema de ovo e de o leite desnatado serem a base dos diluidores seminais para pequenos ruminantes (Colas, 1975; Tasseron et al., 1977; Salamon e Maxwell, 2000), estudos têm sido realizados visando obter diluidores quimicamente definidos a fim de eliminar todos os constituintes de origem animal (Fukui et al., 2008). Em virtude disto, diluidores à base de água de coco (ACP-102; Figueirêdo et al., 2007; Oliveira et al., 2011) e lecitina de soja (Fukui et al., 2008; Sharafi et al., 2009) têm sido utilizados para a criopreservação do sêmen, com obtenção de resultados satisfatórios para espermatozoides ovinos e caprinos.

Dentre os açúcares que exercem função crioprotetora não penetrante, utilizados nos meios diluidores para criopreservação seminal, estão a lactose, a rafinose e a trealose (Purdy, 2006a; Valente et al., 2010). O princípio de atuação dos açúcares não penetrantes se baseia na elevação da pressão osmótica e subsequente desidratação celular, com redução da formação de gelo intracelular, fato que justifica seu frequente uso nos meios de congelamento de espermatozoides e oócitos, uma vez que minimizam o estresse osmótico causado durante a etapa de refrigeração (Squires et al., 2004). Além disso, os açúcares podem interagir com os fosfolípidos da membrana plasmática, reorganizando-a e, a partir disto, aumentando a capacidade de sobrevivência dos espermatozoides submetidos ao processo de criopreservação (Purdy, 2006a).

Por outro lado, os crioprotetores penetrantes podem ser classificados como alcoólicos ou amidas (Ashwood-Smith, 1987), os quais são permeáveis às membranas e atuam intra e extracelularmente, visando promover a desidratação celular (Purdy, 2006a). Por meio deste processo de desidratação, o ponto de congelamento da célula é reduzido, resultando em menor formação de gelo intracelular e consequente manutenção da sobrevivência e fertilidade dos espermatozoides (Purdy, 2006a). Entre os crioprotetores alcoólicos comumente utilizados para a preservação de espermatozoides caprinos e ovinos, destacam-se o glicerol e o etileno glicol (Moraes et al., 1998; Bittencourt et al., 2004), enquanto entre as amidas podem-se citar a acetamida (Silva et al., 2012b) e a dimetilformamida (Silva et al., 2006).

O glicerol é utilizado quase que universalmente nos processos de congelamento do sêmen (Hafez e Hafez, 2004), embora seu completo mecanismo de ação para a criopreservação espermática ainda não esteja totalmente estabelecido (Moraes et al., 1998). Entretanto, sabe-se que este é um crioprotetor penetrante que atua sobre a membrana plasmática estabilizando-a e evitando a formação de danos em sua estrutura gerados pela exposição da célula a elevadas concentrações de sais durante a congelamento (Holt et al., 1992). Além disso, o glicerol modifica a formação de cristais de gelo, reduzindo a lesão mecânica dos espermatozoides durante a cristalização, uma vez que penetra na célula e substitui parcialmente seu conteúdo de água e de eletrólitos (Singh, 2006).

A concentração de glicerol nos diluentes de congelamento sofre limitações em decorrência de sua toxicidade, o que está diretamente relacionado à espécie animal, às taxas de refrigeração e de congelamento utilizadas, à composição e pressão osmótica do diluente e ao método de adição do crioprotetor (Salamon e Maxwell, 2000). Deste modo, quando utilizado em um diluidor com elevadas concentrações de gema de ovo, a concentração de glicerol requerida é menor (Salamon e Maxwell, 2000) e, em diluentes à base de Tris, este pode ser adicionado em uma única etapa ao diluente inicial usado para a refrigeração do sêmen (Hafez e Hafez, 2004).

Como consequência dos efeitos tóxicos do glicerol sobre os espermatozoides, têm-se desenvolvido inúmeras investigações com o objetivo de identificar crioprotetores alternativos (Silva et al., 2012a, b). Neste contexto, o etileno glicol se destaca na espécie ovina em virtude de sua superior capacidade crioprotetora em relação ao glicerol, determinando maior proteção do acrossoma (Moraes et al., 1998) e das membranas espermáticas (Brisola et al., 1999). Entretanto, quando utilizado em elevadas concentrações, o etileno glicol apresenta desempenho negativo sobre os espermatozoides ovinos e caprinos (Moraes et al., 1998; Souza et al., 2002; Bittencourt et al., 2004), embora a ação deste agente em relação à concentração utilizada seja muito variável (Silva, 2012b).

As amidas também têm sido testadas como crioprotetor alternativo e, em decorrência de muitas destas apresentarem um menor peso molecular do que o glicerol, supõe-se que possam induzir menos danos osmóticos (Alvarenga et al., 2005; Melo et al., 2007) e que apresentem melhores resultados na criopreservação do sêmen com taxas de refrigeração e congelamento mais rápidas (Alvarenga et al., 2005). Em contrapartida, embora amidas como a acetamida tenham sido utilizadas com sucesso para a criopreservação de espermatozoides de coelhos (Kashiwazaki et al., 2006; Okuda et al., 2007), em espermatozoides de equinos a acetamida e a formamida apresentem baixo efeito protetor, tendo sido a acetamida deletéria aos espermatozoides de ovinos (Silva et al., 2012a, b).

A eficácia dos crioprotetores para a congelamento de sêmen sofre a influência de variações espécie-específicas (Kashiwazaki et al., 2006; Okuda et al., 2007) e individuais (Garner et al., 1999), o que está relacionado não apenas às diferenças na permeabilidade da membrana, mas a todos os aspectos estruturais e



funcionais dela (Holt, 2000). Tais variações à ação dos crioprotetores são descritas como provenientes de diferenças na ativação energética necessária para o influxo de água e crioprotetores na célula, o que tem sido relacionado à presença ou não de canais proteicos de água na membrana celular, chamados aquaporinas (AQP7) (Kashiwazaki et al., 2006; Okuda et al., 2007), os quais tornam as células mais permeáveis (Ávila-Portillo et al., 2006).

Crioinjúrias espermáticas

Apesar de a criopreservação do sêmen oferecer muitas vantagens à indústria da produção animal (Salamon e Maxwell, 1995), ela representa um problema para alguns reprodutores (Ortega et al., 2003). Isso porque o armazenamento do sêmen, particularmente no estado congelado, determina, ao longo de todas as etapas da criopreservação (Tasseron et al., 1977), mudanças nas características espermáticas (Esteves et al., 2000) pela geração de danos letais ou subletais (Stornelli et al., 2005) em níveis ultraestrutural, bioquímico e funcional (Salamon e Maxwell, 1995; Leboeuf et al., 2000). Tais alterações culminam na redução da motilidade, viabilidade, capacidade de transporte ao longo do sistema genital feminino e fertilidade (Salamon e Maxwell, 1995; Leboeuf et al., 2000).

Durante a etapa de diluição do sêmen, as manifestações de mudanças drásticas de pH estão relacionadas com a geração de danos espermáticos, infertilidade e perda de motilidade (Purdy, 2006a). Da mesma forma, osmolaridades elevadas podem ser associadas à redução da integridade celular (Curry et al., 1994; Molinia et al., 1994), fatores que tornam indispensável o controle das variações de pH e osmolaridade para que a viabilidade e a habilidade fertilizante dos espermatozoides sejam preservadas durante o processo de criopreservação (Molinia et al., 1994).

No sêmen criopreservado, o número de células lesadas e apoptóticas aumenta consideravelmente em relação ao sêmen *in natura*, independentemente das técnicas de congelamento e descongelamento utilizadas (Ortega et al., 2003) e da espécie trabalhada. As crioinjúrias decorrem da interação entre as mudanças biofísicas, bioquímicas e ambientais ocorridas durante o processo de criopreservação (Fickel et al., 2007), submetendo as células criopreservadas a estresses resultantes das mudanças de volume e consequentes alterações nas concentrações de íons e eletrólitos nas soluções intra e extracelulares (Stornelli et al., 2005).

As crioinjúrias podem ser classificadas, de acordo com sua origem, em primárias, oriundas da ação direta dos cristais de gelo formados durante o choque frio, e secundárias, determinadas pelo efeito solução (interação água-soluto) por meio do incremento da concentração de solutos, na medida em que o gelo é progressivamente produzido (Holt, 2000; Pesch e Bergmann, 2006). Concomitantemente, uma taxa de refrigeração ótima deve ser lenta o bastante para prevenir a formação letal de cristais de gelo intracelular e rápida o suficiente para minimizar os efeitos nocivos da prolongada exposição a altas concentrações de sais (Holt, 2000), uma vez que tais eventos comprometem a sobrevivência (Curry et al., 1994) e a fertilidade espermática (Arruda et al., 2007).

Por sua vez, a descongelamento consiste na inversão das mudanças ocasionadas pelos processos de refrigeração e congelamento, sendo observados, durante esta etapa, o decréscimo na concentração intracelular de soluto e a restauração da concentração de água e do volume celular (Holt et al., 1992). Apesar de a descongelamento estar ligada ao restabelecimento das características celulares, esta pode ocasionar peroxidação lipídica e danos à membrana, decorrentes do rápido aumento da utilização de oxigênio pelo espermatozoide (Guerra et al., 2004), assim como a ruptura da membrana em razão do excessivo fluxo de água para o interior da célula (Holt, 2000). Deste modo, é indispensável que a técnica de descongelamento seja determinada de acordo com o método de congelamento utilizado (Purdy, 2006a) e que seja rápida o bastante para evitar a recristalização (Ávila-Portillo et al., 2006). Para caprinos e ovinos é, normalmente, usada a temperatura de 37°C por 30 segundos (Soares et al., 2011; Silva, 2012b).

É característico ao sêmen criopreservado a manutenção de um menor número de espermatozoides morfologicamente normais (O'Connell et al., 2002), assim como a perda da motilidade celular (Watson, 2000). Com relação à motilidade, sua perda tem sido descrita como oriunda tanto de danos causados à membrana quanto da disfunção mitocondrial (Aurich, 2005). Contudo, esta também pode ser determinada pelo desenvolvimento de anormalidades na cauda, geradas durante o processo de criopreservação (O'Connell et al., 2002), com destaque para aquelas relacionadas ao axonema (Holt et al., 1992).

A integridade da membrana plasmática parece ser o parâmetro espermático mais afetado pela criopreservação (Ávila-Portillo et al., 2006; Arruda et al., 2007). Isso porque as mudanças de temperatura submetem as membranas a estresses oriundos da fase de transição de sua estrutura do estado líquido cristalino para o de gel (Canisso et al., 2008), alterando sua função (Watson, 2000). Como consequência disto, ocorrem danos às membranas acrossomais e mitocondriais (Quinn et al., 1980), assim como reação acrossomal prematura (Leboeuf et al., 2000). Tal fato leva os espermatozoides com membranas plasmáticas danificadas a serem considerados incapazes de realizar o processo de fertilização (Silva e Gadella, 2006), uma vez que apenas espermatozoides com membranas intactas podem sofrer capacitação e reação acrossomal (Pesch e Bergmann, 2006).



A variação na composição lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides tem sido considerada fator determinante para a viabilidade do ejaculado submetido aos processos de congelamento (Valença e Guerra, 2007). Isso porque os lipídios constituem um dos principais substratos das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Sikka, 1996), as quais têm sua produção intensificada durante a criopreservação (Watson, 2000). Como consequência da peroxidação lipídica, ocorre perda de fluidez da membrana e das funções celulares (Sanocka e Kurpysz, 2004), o que resulta no comprometimento da capacidade fertilizante do espermatozoide (Sarlós et al., 2002) e dos resultados após IA (Brisola et al., 1999).

O número de espermatozoides com acrossomas reagidos também aumenta consideravelmente após a criopreservação (Peris et al., 2004), fato que sofre interferência direta do incremento da concentração de Ca^{2+} intracelular, gerado durante o processo de armazenamento do sêmen (Sanocka e Kurpysz, 2004). A reação acrossomal é marcada pela fusão entre a membrana plasmática e a acrossomal externa, resultando na formação de vesículas e permitindo a liberação das enzimas do conteúdo acrossomal (Carvalho et al., 2002). Assim, quando a reação acrossomal ocorre precocemente, este gameta apresenta infertilidade (Silva e Gadella, 2006) e aumento da susceptibilidade à desnaturação do DNA nuclear (Peris et al., 2004).

Com base nas informações anteriores, é notório que, embora a capacitação seja um processo fisiológico, marcado inicialmente por alterações na membrana plasmática (permeabilidade em relação ao transporte de íons cálcio) e consequentes modificações morfológicas (reação acrossomal) e fisiológicas (hiperativação do flagelo) (Carvalho et al., 2002), ela pode ocorrer durante a criopreservação (Watson, 1995; Mortimer e Maxwell, 2004), como resultado das variações de temperatura (Stornelli et al., 2005). Neste caso, a capacitação espermática passa a ser denominada de criocapacitação, sendo frequentemente observada em espermatozoides submetidos à congelamento e descongelamento (Watson, 1995; Mortimer e Maxwell, 2004), o que pode comprometer a fertilidade e a capacidade fertilizante destas células (Salamon e Maxwell, 2000).

Considerações finais

Com base no exposto, pode-se constatar que, embora a criopreservação do sêmen das espécies caprina e ovina possibilite o desenvolvimento destas atividades pecuárias, quando em associação à IA, sua utilização ainda é limitada pelos danos celulares gerados durante o processamento do sêmen e que comprometem as taxas de fertilidade obtidas após IA. Em virtude disto, é notória a crescente necessidade em se realizarem pesquisas, a fim de se aperfeiçoar a técnica de criopreservação do sêmen destas espécies para que seja alcançado com sucesso o máximo aproveitamento genético de animais de alto valor.

Referências

- Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros ASL.** Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Anim Reprod Sci*, v.89, p.105-113, 2005.
- Arruda RP, Andrade AFC, Peres KR, Raphael CF, Nascimento J, Celeghini ECC.** Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.8-16, 2007.
- Ashwood-Smith MJ.** Mechanisms of cryoprotectant action. In: Bowler K, Fuller BJ. *Temperature and animal cells*. Cambridge: Biologists Ltda, 1987. p.395-406.
- Aurich C.** Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stores stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.89, p.65-75, 2005.
- Ávila-Portillo LM, Madero JI, López C, León MF, Acosta L, Gómez C, Delgado LG, Gómez C, Lozano JM, Reguero MT.** Fundamentos de criopreservación. *Rev Colomb Obst Ginecol*, v.57, p.291-300, 2006.
- Bailey JL, Buhr MM.** Regulation of internal Ca^{2+} by chilled bull and boar spermatozoa. *Cryobiology*, v.32, p.259-269, 1995.
- Bittencourt RF, Ribeiro AL, Santos ADF, Furst R, Teixeira RBS, Chalhoub M, Portela AP, Alves SGG, Almeida AK, Guimarães JD.** Utilização de glicerol e etileno glicol como crioprotetores na congelamento do sêmen caprino. *Ciênc Anim Bras*, v.5, p.27-32, 2004.
- Brisola LBS, Neves JP, Gonçalves PBD, Oliveira JFC, Montagner MM.** Integridade das membranas plasmática, nuclear e mitocondrial de espermatozoides ovinos criopreservados com etileno glicol. *Ciênc Rural*, v.29, p.527-531, 1999.
- Canisso IF, Souza FA, Escobar JMO, Carvalho GR, Morel MCD, Silva EC, Guimarães JD, Lima AL.** Congelamiento de semen de burro (*Equus asinus*). *Rev Investig Vet Perú*, v.19, p.113-125, 2008.
- Carvalho OF, Ferreira JDJ, Silveira NA, Freneau GE.** Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. *J Bras Patol Med Lab*, v.38, p.33-38, 2002.
- Castelo TS, Frota TR, Silva AR.** Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Vet Bras*, v.2, p.67-75, 2008.
- Colas G.** Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *J Reprod Fertil*, v.42, p.277-285, 1975.
- Curry MR, Millar JD, Watson PF.** Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm



- cryopreservation fail to conform with empirical observations. *Biol Reprod*, v.51, p.1014-1021, 1994.
- Esteves SC, Sharma RK, Thomas Jr AJ, Agarwal A.** Improvement in motion characteristics and acrosome status in cryopreserved human spermatozoa by swim-up processing before freezing. *Hum Reprod*, v.15, p.2173-2179, 2000.
- Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, De Angelis P, Claussen OP.** Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod*, v.14, p.1039-1049, 1999.
- Fickel J, Wagener A, Ludwig A.** Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *Eur J Wildl Res*, v.53, p.81-89, 2007.
- Figueirêdo EL, Nunes JF, Cordeiro MA, Souza PT, Diógenes Filho RN, Vieira VE, Silva Filho AHS, Mesquita FLT, Salgueiro CCM, Feitosa JV.** Inseminação artificial de ovelhas da raça Santa Inês com sêmen diluído em água de coco *in natura* e em pó. *Rev Bras Ciênc Vet*, v.14, p.95-97, 2007.
- Fukui Y, Kohno H, Togari T, Hiwasa M, Okabe K.** Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep. *J Reprod Dev*, v.54, p.286-289, 2008.
- Garner DL, Thomas CA, Gravance CG.** The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. *Reprod Dom Anim*, v.34, p.399-404, 1999.
- Guerra MMP, Evans G, Maxwell WMC.** Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia. *Rev Bras Reprod Anim*, v.28, p.187-195, 2004.
- Hafez ESE, Hafez B.** Reprodução animal. 7.ed. Barueri: Manole, 2004. 513p.
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP.** Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl*, v.11, p.73-88, 1990.
- Holt WV.** Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, v.53, p.47-58, 2000.
- Holt WV, Head MF, North RD.** Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. *Biol Reprod*, v.46, p.1086-1094, 1992.
- 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.
- Ladha S.** Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. *J Memb Biol*, v.165, p.1-10, 1998.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S.** Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.113-141, 2000.
- Melo CM, Zahn FS, Martin I, Orland C, Dell'Aqua Jr JA, Alvarenga MA, Papa FO.** Influence of semen storage and cryoprotectant on post-thaw viability and fertility of stallion spermatozoa. *J Equine Vet Sci*, v.27, p.171-175, 2007.
- Mies Filho A.** Reprodução dos animais e inseminação artificial. 5.ed. Porto Alegre: Sulina, 1987. 783p.
- Molinia FC, Evans G, Maxwell WMC.** In vitro evaluation of zwitterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. *Reprod Nutr Dev*, v.34, p.491-500, 1994.
- Moraes CN, Neves JP, Gonçalves PBD, Oliveira JFC, Schweitzer CM.** Criopreservação do sêmen ovino em *pellets* com etileno glicol. *Ciênc Rural*, v.28, p.287-292, 1998.
- Mortimer ST, Maxwell WMC.** Effects of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction*, v.127, p.285-291, 2004.
- Nalbandov AV.** Reproductive physiology of mammals and birds. 3.ed. San Francisco: W. H. Freeman, 1976. 334p.
- O'Connell M, McClure N, Lewis SEM.** The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod*, v.17, p.704-709, 2002.
- Okuda Y, Seita Y, Hisamatsu S, Sonoki S, Shino M, Masaoka T, Inomata T, Kamijo S, Kashiwazaki N.** Fertility of spermatozoa cryopreserved with 2% acetamide or glycerol through artificial insemination in the Japanese white rabbit. *Exp Anim*, v.56, p.29-34, 2007.
- Oliveira RV, Nunes JF, Salgueiro CCM, Cavalcante FMM, Brasil OO, Moura AAAN.** Avaliação de espermatozoides caprinos congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101®) ou TRIS. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.6, p.1295-1302, 2011.
- Ortega AM, Izquierdo AC, Gómez JJH, Olivares-Corichi IM, Torres VMM, Méndez JJV.** Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. *Interciencia*, v.28, p.699-704, 2003.
- Peris SI, Morrier A, Dufour M, Bailey, JL.** Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *J Androl*, v.25, p.224-233, 2004.
- Pesch S, Bergmann M.** Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability and cryopreservation. *Micron*, v.37, p.597-612, 2006.
- Purdy PH.** A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rumin Res*, v.63, p.215-225, 2006a.
- Purdy PH.** The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48 h at 5°C prior to cryopreservation. *Anim Reprod*



Sci, v.93, p.114-123, 2006b.

Quinn PJ, Chow PYW, White IG. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J Reprod Fertil*, v.60, p.403-407, 1980.

Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim Reprod Sci*, v.38, p.1-36, 1995.

Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.77-111, 2000.

Sanočka D, Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol*, v.2, p.12-18, 2004.

Sarlós P, Molnár A, Kókai M, Gábor G, Rátky J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Vet Hung*, v.50, p.235-245, 2002.

Setchell BP. Spermatogenesis and spermatozoa. In: Austin CR, Short RV. *Reproduction in mammals: Germ cells and fertilization*. 2.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1993. v.1, p.63-101.

Sharafi M, Forouzanfar M, Hosseini SM, Hajian M, Ostadhosseini S, Hosseini L, Abedi P, Nili N, Rahmani HR, Javaheri AR, Esfahani MHN. In vitro comparison of soybean lecithin based-extender with commercially available extender for ram semen cryopreservation. *Int J Fertil Steril*, v.3, p.149-152, 2009.

Sikka SC. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Front Biosci*, v.1, p.78-86, 1996.

Singh BK. *Compêndio de andrologia e inseminação artificial em animais de fazenda*. São Paulo: Andrei Editora, 2006. 331p.

Silva AF, Costa EP, Oliveira FA, Torres CAA, Hass GTS, Nascimento VA. Uso de dimetilformamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de sêmen caprino. *Rev Bras Zootec*, v.35, p.452-456, 2006.

Silva ECB, Cajueiro JFP, Silva SV, Guerra MMP. Crioprotetores etileno glicol ou acetamida na viabilidade *in vitro* de espermatozoides congelados de ovinos. *Cienc Rural*, v.42, n.6, 2012a. (no prelo).

Silva ECB, Cajueiro JFP, Silva SV, Vidal AH, Soares PC, Guerra MMP. In vitro evaluation of ram sperm frozen with glycerol, ethylene glycol or acetamide. *Anim Reprod Sci*, v.132, p.155-158, 2012b.

Silva PFN, Gadella BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, v.65, p.958-978, 2006.

Soares AT, Silva SV, Almeida FC, Lemos PFBA, Nunes JF, Peixoto CA, Guerra MMP. Espermatozoides caprinos criopreservados em meio à base de leite desnatado acrescido de glutatona reduzida. *Cienc Rural*, v.41, p.1991-1997, 2011.

Souza AF, Guerra MMP, Batista AM, Mergulhão FCC, Neves AC, Wischral A. Congelamento de sêmen caprino utilizando os crioprotetores glicerol e etilenoglicol. *Rev Bras Reprod Anim Supl*, n.5, p.103-105, 2002.

Soylu MK, Nur Z, Ustuner B, Dogan I, Sagirkaya H, Gunay U, Ak K. Effects of various cryoprotective agents and extender osmolality on post-thawed ram semen. *Bull Vet Inst Pulawy*, v.51, p.241-246, 2007.

Squires EL, Keith SL, Graham JK. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.62, p.1056-1065, 2004.

Stornelli MC, Tittarelli CM, Savignone CA, Stornelli MA. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Veterinaria*, v. 25, n. 2, p. 28-35, 2005.

Tasseron F, Amir D, Schindler H. Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *J Reprod Fertil*, v.51, p.461-462, 1977.

Valença RMB, Guerra MM. Espécies reativas ao oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.47-53, 2007.

Valente SS, Pereira RM, Baptista MC, Marques CC, Vasques MI, Silva Pereira MVC, Horta AEM, Barbas JP. In vitro and in vivo fertility of ram semen cryopreserved in different extenders. *Anim Reprod Sci*, v.117, p.74-77, 2010.

Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*, v.7, p.871-891, 1995.

Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, v.60/61, p.481-492, 2000.