

MADRIANO CHRISTILIS DA ROCHA SANTOS

MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA ANÁLISES DA
CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES
CAPRINOS

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

MADRIANO CHRISTILIS DA ROCHA SANTOS

MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA ANÁLISES DA
CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES
CAPRINOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2010.

Prof^o. Marcelo Teixeira Rodrigues

Prof^o Antonio Bento Mancio

Prof^a. Simone Eliza Facioni Guimarães
(Co-orientadora)

Prof^a. José Domingos Guimarães
(Co-orientador)

Prof^a. Ciro Alexandre Alves Torres
(Orientador)

Se “avexe” não, toda caminhada começa no primeiro passo... Observe quem vai subindo a ladeira... seja princesa, ou seja, lavadeira, para ir mais alto vai ter que suar.

Santana.

A educação não se faz das belas palavras de virtude, e sim do atrito com as circunstâncias.

Raul Pompéia.

O nordestino é acima de tudo um forte!

Euclides da Cunha.

Dedico

À “Mainha” que foi, é e sempre será
minha fonte de inspiração.

Aos animais, razão pela qual me aplico
tanto aos estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por todos os momentos que passei sendo bons ou adversos, pois foram estes momentos que me fizeram quem sou agora, uma pessoa determinada e objetiva, mais uma vez obrigado Senhor.

A todos os animais que direta ou indiretamente contribuíram para meu aprendizado e formação, muito obrigado, e tenham certeza que buscarei utilizar todos os conhecimentos adquiridos em prol dos seus semelhantes.

As três mulheres da minha vida, Creuza (mãe), Mariana e Mayane (irmãs). Especialmente a minha mãe uma mulher guerreira e amorosa, que sempre foi firme na educação dos filhos, buscando sempre o melhor para eles, por todo o apoio e ensinamentos da vida, proporcionados pelos momentos difíceis enfrentados sempre unidos como deve ser em toda família. Foi me espelhando nesta mulher vibrante e com uma vontade de viver contagiante que eu sempre consegui alcançar meus objetivos. “Mainha” se um dia a senhora sentir por mim, um décimo do orgulho que eu tenho da senhora todos os meus esforços durante estes anos terão valido a pena, TE AMO e agradeço por tudo minha heroína.

As minhas irmãs, eu agradeço pela torcida e incentivo e as palavras de carinho e conforto, respeito e admiração que elas sempre tiveram por mim. A Mayane e Adriano (Cunhado), em particular pelo maravilhoso presente que está por vir (meu segundo sobrinho). E ainda a Mariana e Antonio Carlos (cunhado e grande amigo) por terem me dado o meu querido e muito amado sobrinho e afilhado Arthur, que hoje mais que ninguém enche a minha vida de alegria, com a força e magia do seu amor incondicional por este tio tão coruja. “Tio ninho vamo(s) brinca(r)!!!”.

A Anastácio (*in memorian*), um grande amigo da família que sempre torceu por mim, mas infelizmente não está mais entre nós para compartilhar estes momentos felizes que estamos vivendo, mas tenho certeza, onde ele estiver está feliz por mim. Um grande abraço meu caro amigo.

Um agradecimento especial ao Sr. Leobino (*in memorian*) grande pai e avô amoroso. E a minha avó Maria Patrícia mulher de fibra que apesar de todas as dificuldades conseguiu criar e transformar seus filhos em verdadeiros cidadãos.

Ao meu tio Mariano (Tio Mano), por ter sido e ser até hoje a figura paterna na minha vida, a Rejane sua companheira de todas as horas.

À minha tia e madrinha Cristiane mulher admirável, forte, vibrante que não tem medo do desconhecido, que tem por mim o amor de mãe e sempre acreditou em minha capacidade, aos meus primos Livston (meu primo-irmão), Jaílams, Leon Jhonatan, Anderson e mais recentemente Pedro Henrique, João Pietro e João Vitor, e demais primos que são muitos, para não esquecer ninguém todos se sintam homenageados da mesma forma que os citados, além dos meus tios: Carlos (Cal), Fernando (Nando) e Marcelo e suas respectivas companheiras.

Um agradecimento mais do que especial eu faço a Flávia Reis Gomes, uma mulher maravilhosa, que tem sido minha namorada e companheira de todas as horas, e por me fazer muito feliz. A quem eu tenho grande admiração, carinho, respeito e paixão. Muito obrigado minha “neguinha” linda, e que sejamos ainda muito mais felizes juntos. E também aos seus pais e familiares (principalmente Nadine) os quais me acolhem com muito carinho, um grande abraço a todos.

Aos amigos Bruno Filgueiras, Clébio e sua esposa Luisa, Vitor, Carol Maciel, Márcio (Bahiano), Léo, Sanely e seu esposo Cid, Erick Castilho e sua esposa Ariane e a sua pequena Mariana, Rogério Pinho, Raisal, Karina seu esposo Cristiano e seus familiares, e os demais amigos (para não ser injusto e esquecer ninguém), eu dedico minhas saudações e um grande abraço a todos pelos momentos de descontração, cumplicidade e alegria que vocês me proporcionaram.

Ao Professor Ciro Torres, pela orientação, confiança, pelas conversas descontraídas em sua sala e no futebol aos sábados no campo da rua nova, e também aos colegas que jogam conosco.

Ao Professor José Domingos Guimarães (JD ou J), pela orientação, co-orientação, confiança, pela força em todos os momentos que precisei e pela amizade. “Muito obrigado J”.

Aos professores, Simone E. F. Guimarães, Giovani Ribeiro, Antonio Bento Mancio por junto com os professores Ciro e JD fazerem parte da minha banca examinadora.

Ao professor Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo por meio de seu funcionário Márcio por me ajudarem liberando para o uso e instruindo no manuseio do microscópio de epifluorescência em seu laboratório.

Ao Erick e Rogério por me ajudarem nas atividades da dissertação no campo e à Elenice que me ajudou no laboratório. E também a todos os estagiários que me ajudaram em algum momento deste período.

Gostaria de agradecer também ao professor Marcelo Teixeira Rodrigues pela confiança e oportunidade que me proporcionou de poder estar à frente dos planejamentos reprodutivos do capril do DZO-UFV, onde graças a Deus e muito trabalho obtivemos resultados de fertilidade acima do esperado. E também agradeço aos funcionários do capril, principalmente o Geraldinho, sem o qual, não teríamos conseguido alcançar estes resultados.

À Capes pela concessão da bolsa.

Encerro estes agradecimentos dizendo, a todos que me admiram e torcem por mim, a minha célebre frase: “SABE QUEM SOU EU!!!”.

BIOGRAFIA

Madriano Christilis da Rocha Santos, filho de José da Rocha Santos e Creuza Inácio Rocha Santos, nascido em 11/09/1982, na cidade de Propriá – SE.

Em 1998, ingressou na Escola Agrotécnica Dom Avelar Brandão Vilela, atual Instituto Federal de Educação Tecnológica do Sertão, na cidade de Petrolina – PE, concluindo em 2001 o curso de técnico agrícola com habilitação em Zootecnia.

Em 2003, ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural de Pernambuco, graduando-se em 2008.

Em 2008, ingressou no curso de pós-graduação de Mestrado em Zootecnia, na área de reprodução animal, na Universidade Federal de Viçosa (UFV). Tendo defendido em fevereiro de 2010.

Em março de 2010, ingressou no curso de pós-graduação de Doutorado em Zootecnia, na área de reprodução animal, na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

ÍNDICE

	PÁGINA
LISTA DE TABELAS.....	X
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1. SÊMEN.....	03
2.2. MEMBRANA PLASMÁTICA DOS ESPERMATOZÓIDES.....	04
2.3. ZONA PELÚCIDA.....	05
2.4. COLETA E AVALIAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO.....	06
2.5. CRIOPRESERVAÇÃO.....	07
2.6. DESCONGELAMENTO.....	08
2.7. AVALIAÇÃO DE MOTILIDADE E VIGOR ESPERMÁTICA.....	09
2.8. AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA.....	10
2.9. TESTES DE INTERAÇÃO OÓCITO-ESPERMATOZÓIDE.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. LOCAL.....	14
3.2. ANIMAIS.....	14
3.3. MÉTODO DE COLETA DO SÊMEN.....	14
3.4. EXAMES DO SÊMEN.....	14
3.4.1. VOLUME.....	15
3.4.2. COR.....	15
3.4.3. TURBILHONAMENTO.....	15
3.4.4. MOTILIDADE ESPERMÁTICA.....	15
3.4.5. VIGOR ESPERMÁTICO.....	15
3.4.6. CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA.....	15
3.5. DELINEAMENTO.....	16
3.6. CONGELAMENTO DO SÊMEN.....	16
3.7. TESTE DE LIGAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES AOS OÓCITOS CAPRINO E BOVINO.....	18
3.8. TESTE DE LIGAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES À MEMBRANA	

PERIVITELÍNICA DA GEMA DO OVO.....	18
3.9. ESTATÍSTICA.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
6. CONCLUSÃO.....	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
01	Composição química do diluidor..... 17
02	Médias, desvio padrão da média e coeficiente de variação do volume, concentração, turbilhonamento, vigor e motilidade espermática do sêmen fresco e o vigor e motilidade espermática do sêmen descongelado..... 21
03	Médias, desvio padrão da média e coeficiente de variação dos testes de ligação dos espermatozóides caprinos aos oócitos caprino, bovino e a membrana perivitelina da gema do ovo..... 22
04	Médias percentuais, desvio padrão da média e coeficiente de variação dos testes de ligação da gema do ovo, utilizando sêmen caprino fresco e descongelado..... 23
05	Correlações simples de Pearson entre aspectos físicos do sêmen in natura com os testes de ligação dos espermatozóides caprinos aos oócitos caprino, bovino, e também a membrana perivitelina da gema do ovo..... 24
06	Percentual de homologia entre as sequências gênicas das proteínas Integrina, CD9, ZP3 e ZP2, entre caprinos e bovinos (CAP-BOV) e entre caprinos e aves domesticas (CAP-MPVGO)..... 27

RESUMO

SANTOS, Madriano Christilis da Rocha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Métodos alternativos para análises da capacidade de ligação dos espermatozóides caprinos**. Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres. Co-orientadores: José Domingos Guimarães e Simone Eliza Facioni Guimarães.

Com este estudo objetivou-se realizar a análise da utilização do teste de ligação dos espermatozóides caprinos ao oócito bovino e a membrana perivitelina da gema do ovo de galinha comparando ao teste utilizando oócito caprino, buscando uma nova alternativa que predissesse a qualidade seminal sem perder a exatidão e acurácia deste último. Utilizou-se 16 partidas de sêmen caprino coletadas de 04 bodes reprodutores, das raças Saanen (02) e Parda Alpina (02), por meio de vagina artificial, utilizando como manequim fêmea em estro natural. Foram avaliados os aspectos físicos do sêmen (volume, aspecto, turbilhonamento, vigor e motilidade espermática) e a concentração espermática. Para cada partida congelada se utilizou uma alíquota de 20 μL de sêmen fresco para inseminar uma membrana perivitelina de gema do ovo, onde se denominou este grupo de ligação em membrana perivitelina da gema do ovo com sêmen fresco (MPVGOF). Após o congelamento outros três grupos foram formados. No primeiro grupo, para cada partida de sêmen descongelado foi inseminada uma membrana perivitelina da gema do ovo, sendo este grupo denominado ligação em membrana perivitelina com sêmen descongelado (MPVGOD). No segundo grupo para cada partida foi utilizado um oócito bovino, denominando-se este de ligação em oócito bovino (LIGBOV), já no terceiro grupo, em cada partida se utilizou um oócito caprino, onde este foi denominado ligação em oócito caprino (LIGCAP). Não houve variação ($P > 0,05$) entre os animais utilizados em qualquer parâmetro seminal estudado. O volume médio de sêmen coletado foi $1,1 \pm 0,15$. A concentração espermática média observada foi de $1,94 \pm 0,21 \times 10^9$. Observou-se um turbilhonamento médio de $3,6 \pm 0,23$. Foi observada uma motilidade espermática de $77,5 \pm 1,37$ e $32,2 \pm 1,37$, para o sêmen fresco e descongelado, respectivamente. Os valores médios para o vigor observado foi $3,8 \pm 0,09$ e $2,7 \pm 0,12$, para o sêmen fresco e descongelado, respectivamente. Não foram encontradas diferenças ($P > 0,05$) entre os testes de ligação do oócito bovino e gema do ovo em relação ao teste de ligação ao oócito caprino. Não havendo também diferença ($P > 0,05$) encontrada entre as médias do teste de ligação com

sêmen fresco ou descongelado. Concluiu-se que, tanto o MPVGOD quanto o LIGBOV podem ser utilizados em substituição ao LIGCAP. O sêmen fresco ou descongelado pode ser utilizado para a avaliação da capacidade de ligação do sêmen por meio do teste de ligação à membrana perivitelina da gema do ovo sem qualquer alteração nos resultados da mesma.

ABSTRACT

SANTOS, Madriano Christilis da Rocha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2010. **Alternatives methods for analysis of the goat sperm binding Capacity.** Adviser: Ciro Alexandre Alves Torres. Co-Advisors: José Domingos Guimarães and Simone Eliza Facioni Guimarães.

This study aimed to carry out the analysis using the simple binding of goat sperm to bovine oocytes and to the perivitelline membrane of the hen's egg yolk compared to binding to the goat oocytes, looking for an alternative to predict the buck semen quality without losing the precision and accuracy of their own oocytes. Sixteen doses of goat semen were collected from 04 breed bucks, 2 Saanen and 2 Alpine via artificial vagina, using an estrus female as dummy. The physical aspects of the semen (volume, sperm whirlwind, force and motility) and sperm concentration were evaluated. Three groups were formed, and 20 μL of semen from the same collection were thawed at a concentration of 5×10^6 spermatozoon/mL and used. In the 1st group goat oocytes (LIGCAP) and in the 2nd group bovine oocytes (LIGBOV) were inseminated and in the 3rd one the perivitelline membrane of the hen's egg yolk (MPVGOD) were used. Two others groups were formed, in the first and in the second one 16 doses of fresh (MPVGOF) and thawed (MPVGOD) semen from the same collection were used, respectively, to inseminate. Semen samples from both groups were used to inseminate perivitelline membrane from chicken egg yolk. The imposed treatment did not affect the animals variables studied ($P > 0.05$). The average volume of semen collected was 1.1 ± 0.15 mL. The average sperm concentration observed was: $1.94 \pm 0.21 \times 10^9$. The average sperm whirlwind was 3.6 ± 0.23 . The sperm motility was 77.5 ± 1.37 and 32.2 ± 1.37 for fresh and thawed sperm, respectively. No differences ($P > 0.05$) among the binding assays using the bovine oocytes or hen's egg yolk in relation to the goat oocytes were showed. The binding assay using fresh and thawed semen did not differ between themselves. It is concluded that, both the MPVGO and the LIGBOV may be used to replace LIGCAP. The fresh or thawed semen may be used to evaluate the binding capacity of the semen through the MPVGO without compromise the results.

1. INTRODUÇÃO

Os caprinos são uma espécie de elevada importância econômica pela sua contribuição na produção de carne, leite e pele em diversos países. A caprino-ovinocultura foi intensificada nos últimos anos, sobretudo nos países em desenvolvimento, que são detentores dos maiores rebanhos caprinos.

Segundo o Food and Agriculture Organization - FAO (2003) existem aproximadamente 700 milhões de caprinos distribuídos mundialmente. Destes, mais de 10 milhões compõem o rebanho brasileiro, deste total, 92,4% são explorados na região Nordeste brasileira (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2006).

Atualmente, a caprinocultura no Brasil apresenta-se em expansão, projetando em algumas décadas crescimento da ordem de cinco vezes o rebanho atual, contando com o incentivo de ações conjuntas de governos estaduais, instituições de pesquisa e criadores (FONSECA, 2005).

Entretanto, verifica-se uma produção incipiente, principalmente quando se compara o efetivo caprino brasileiro com o de outros países, estando esta baixa produção nacional diretamente relacionada com a precariedade da tecnologia aplicada. Sendo necessária implantação de técnicas de reprodução assistida que aumentem a eficiência reprodutiva elevando direta e indiretamente a produtividade do rebanho.

O desenvolvimento de técnicas adequadas para preservação de sêmen é um dos passos mais importantes no avanço da reprodução animal nas diferentes espécies e vem sendo alcançado pela aplicação de biotécnicas cada vez mais modernas (PAPA et. al., 2002).

A criopreservação é uma biotécnica que permite o armazenamento de material genético por tempo indefinido. No entanto, o processo de criopreservação das células espermáticas resulta em diminuição da fertilidade quando comparado com sêmen fresco (GUTHRIE et. al. 2002). Com isto, é necessário que testes sejam realizados para avaliar as condições do sêmen criopreservado, e prever qual a capacidade de fertilização do mesmo.

Para conhecer a extensão dos danos causados à célula espermática e poder aperfeiçoar os métodos de criopreservação, é de grande importância a análise de parâmetros que não são empregados na rotina da avaliação seminal. Sendo importante estudar técnicas que possam mensurar a extensão dos danos à célula espermática pela

ação deletéria, direta e/ou indiretamente, causada pela criopreservação do sêmen, buscando aumentar as taxas de fertilidade.

Testes de fertilidade *in vivo* podem ser utilizados apesar de apresentarem alto custo, tendo a desvantagem de apresentar baixa confiabilidade se poucos animais são usados (ROTA et al., 1999; TARDIF et al., 1999). E ainda segundo Eilts (2005) mesmo que a fertilidade de um macho já houvesse sido testada em um grande grupo de fêmeas férteis, a sua fertilidade não poderia ser prevista ao se utilizar outro grupo de fêmeas que tivessem fertilidade diferente.

Em contrapartida, as análises *in vitro* têm a vantagem de mostrar quais aspectos da função espermática foram prejudicados ou mantidos, sendo de especial interesse ao se trabalhar com o aprimoramento de técnicas de preservação de sêmen. Testes como ligação a zona pelúcida (FERREIRA, 1998), penetração no oócito (GADEA et al., 1998) e fecundação (XU et al., 1998), que avaliam a interação de gametas masculino e feminino, têm sido realizados com a intenção de melhorar a capacidade de predição da qualidade seminal. Embora a variação entre os oócitos diminua a precisão das observações de diferenças entre os indivíduos estudados.

Diante disto, Barbato et al. (1998) desenvolveram um teste *in vitro*, que simula a interação dos gametas, baseado na capacidade de ligação de espermatozóides de aves e mamíferos a um substrato da membrana perivitelina do ovo de galinha.

Observando o sucesso do emprego do teste de ligação dos espermatozóides à membrana perivitelina em outras espécies, e a disponibilidade de oócitos bovinos associados à dificuldade, relativa, de se obter oócitos caprino em quantidade e qualidade suficientes para a realização de testes que permitam predizer a qualidade seminal. Buscou-se com este estudo analisar a capacidade de ligação dos espermatozóides caprinos ao oócito bovino e a membrana perivitelina da gema do ovo de galinha (ligação heteróloga) substituindo o oócito caprino (ligação homóloga), visando alternativas que predissessem a qualidade do sêmen fresco e descongelado sem perder a precisão e acurácia da ligação homóloga.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. SÊMEN

O sêmen caprino pode ser usado a fresco (puro ou diluído), resfriado ou criopreservado. O sêmen fresco e o resfriado apresentam fertilidade mais elevada, embora seu uso seja restrito a curto período de tempo após a ejaculação. Já o sêmen criopreservado pode ser mantido por longo período de tempo armazenado em nitrogênio líquido, apresentando maior aplicabilidade, no entanto, com menor taxa de fertilidade (TRALDI, 2006).

Várias técnicas de preservação de sêmen bovino foram adaptadas empiricamente para conservação do sêmen caprino, sem muito sucesso. Utilizaram-se diluentes a base de gema de ovo ou leite por décadas para esse propósito, com sucesso limitado (AMOAHA e GELAYE, 1997).

Segundo Roy (1957) corroborado por Gibbons (2002), a secreção da glândula bulbouretral de bodes possui uma enzima (EYCE) que coagula a gema de ovo. Os mesmos ainda afirmaram que na presença de cálcio a enzima EYCE, que é uma fosfolipase A, atua como catalisadora e hidrolisa a lecitina da gema de ovo em ácidos graxos e lisolecitina. Sendo a atividade fusogênica da membrana dos espermatozoides promovida pela reação hidrolítica, induzindo a reação acrossômica e a descondensação da cromatina.

Uma fração glicoprotéica do plasma seminal de caprinos (SBUIII), também originada das glândulas bulbouretrais, interage com o diluente à base de leite, provocando inibição da motilidade espermática, ruptura do acrossoma e morte celular espermática. A SBUIII foi identificada por Nunes (1982) e é responsável por hidrolisar triglicerídeos de membrana plasmática e também os triglicerídeos contidos no leite desnatado, resultando no ácido oléico, que é tóxico aos espermatozoides (PELLICER-RUBIO et al., 1997).

Segundo Nunes (1982), a secreção de grandes quantidades de fosfolipase A contida no plasma seminal tem efeito deletério nos processos de preservação do sêmen, agindo sobre os fosfolipídios dos diluentes. O mesmo autor, demonstrou que o congelamento do sêmen caprino diluído em leite, contendo acima de 10 mg de fosfolipídios causa a morte de todos os espermatozoides.

O método convencional de superar as interações prejudiciais do plasma seminal e as proteínas da gema de ovo ou do leite é diluir a amostra de sêmen caprino num

diluyente tamponado e, então, separar o plasma seminal dos espermatozóides pela centrifugação (PURDY, 2006). Segundo este autor, o sêmen pode ser centrifugado a 550-950 x g por 10 a 15 minutos. Aboagla e Terada (2004) sugerem a centrifugação do sêmen caprino diluído em Triscitrato-glucose a 1600 x g, em duas etapas de 30 minutos cada.

Ritar e Salamon (1982) sugerem que o diluyente a base de Tris, gema de ovo e glicerol deve ser adicionado ao sêmen sem a retirada do plasma seminal, sendo a proporção de gema de ovo e glicerol de 2 e 4%, respectivamente. Chauhan e Anand (1990) observaram que a criopreservação do sêmen caprino em diluyente à base de Tris-gema de ovo, sem a remoção do plasma seminal, produz altas taxas de fertilidade. Em adição, Azeredo et al. (2001) verificaram que a motilidade dos espermatozóides é maior com o plasma seminal, e que o porcentual de espermatozóides com membranas lesadas aumenta com a retirada do plasma seminal por centrifugação, sendo ainda, acentuada pelos processos de criopreservação e descongelamento. Com isto, pode-se concluir que a remoção do plasma seminal seria prejudicial, quando a finalidade fosse utilizar o sêmen caprino criopreservado.

Foi sugerido, que o plasma seminal fosse adicionado ao sêmen descongelado, com o intuito de “reverter” à capacitação precoce induzida pelo processo de criopreservação. No entanto, nenhum aumento de fertilidade, após a inseminação artificial, foi observado (ABAD et al., 2007).

2.2. MEMBRANA PLASMÁTICA DOS ESPERMATOZÓIDES

Os espermatozóides são revestidos por uma membrana plasmática formada basicamente por bicamada lipídica com proteínas integrais e periféricas, glicoproteínas de superfície e glicolipídios organizados em um mosaico fluido (SINGER e NICHOLSON, 1972).

Os fosfolipídios estão em arranjo lamelar que organiza a cadeia de ácido graxo em barreira hidrofóbica, prevenindo a entrada de água ou outras moléculas. A fluidez da membrana plasmática dos espermatozóides se dá pela relação de colesterol e fosfolipídios (DARIN-BENNET et al. 1977). A região mais fluida da membrana plasmática contém maior teor de fosfolipídios (AMANN e PICKETT, 1987).

2.3. ZONA PELÚCIDA

A zona pelúcida é o revestimento extracelular que circunda o oócito de mamíferos. Forma uma membrana celular esférica de espessura extremamente uniforme (05-10 µm em mamíferos) (GREEN, 1997). A zona pelúcida é composta de três glicoproteínas principais, ZP1, ZP2 e ZP3. Sendo a ZP3 uma glicoproteína responsável pelo reconhecimento dos espermatozóides, também chamado atividade de zona. Enquanto que a ZP2 mantém a ligação entre o espermatozóide e a zona pelúcida após a reação acrossômica (BLEIL et al., 1980). Dean (1992) descreveu as ZP3 e ZP2 como receptores primários e secundários, respectivamente, com papel fundamental na interação entre o espermatozóide e oócito.

O gene da ZP3 é composto de 8 éxons em ratas, mulheres e hamsters (CHAMBERLIN e DEAN, 1989). As sequências gênicas da ZP3 em mulheres e ratas têm uma relação de homologia de 74%, com 64% de similaridade entre as sequências de aminoácidos. O gene da ZP2 de ratas apresenta uma relação de homologia de 70% com a sequência gênica da mulher que tem 19 éxons, e uma similaridade de 67% entre as sequências de aminoácidos (DEAN, 1992).

O código genético das ZP2 e ZP3 é conservado na maioria dos mamíferos. O grau de conservação é variável, onde nas ratas, cadelas, vacas e mulheres existem relações de homologia maiores com as cobaias do que com porcas e coelhas (RINGUETE et l., 1986).

A expressão das glicoproteínas ZP2 e ZP3 é restrita aos oócitos em crescimento em ratas, não sendo observadas em outras fases da célula ou outros tecidos (LIANG et al., 1990). O mecanismo molecular pelo qual a expressão dos genes das ZP2 e ZP3 está restrita às células germinativas em crescimento da rata, ainda, não está devidamente elucidado.

A zona pelúcida funciona como receptor espécie-específico de espermatozóides capacitados e promove indução da reação acrossomal. Segundo Sinowatz et al. (2003) a remoção da zona pelúcida elimina a especificidade da interação dos gametas masculino e feminino. Entretanto, alguns ensaios *in vitro* permitiram ligação de heterólogos (MORTILLO e WASSARMAN, 1991). Muitas proteínas estão envolvidas com a penetração dos espermatozóides através das células do *cumulus* e da zona pelúcida e fusão com oolema, garantindo uma interação espécie – específica. Diversos estudos estão sendo realizados na tentativa de elucidar a estrutura e função de cada proteína

presente na membrana dos gametas. Proteínas como galactosil-transferase (GaIT) (MILLER et al., 1992), Fertalina β (CHEN et al., 1999), Ciritestina (Evans, 2002) e Izumo (INOUE et al., 2005) já foram descritas na membrana do espermatozóide. Além da CD9 (tetraspanina) (MYIADO et al., 2008), integrina ($\alpha 6\beta 1$) (WASSARMAN, 1990) e glicosilfostatidilinositol (GPI) (ALEGRETTI et al., 2009) ancoradas no oolema.

A penetração da zona pelúcida é um dos passos cruciais para a fecundação. Por isso, os espermatozoides que são incapazes de reconhecer e se ligarem às glicoproteínas, falham em fecundar o ócito. O reconhecimento do gameta e as próximas interações são realizados pelas associações proteína-carboidrato dos receptores da zona pelúcida que ativam o sinal da cascata, iniciando a exocitose acrossomal pelas reações de fosforilação/ defosforilação (TOPFER-PETERSEN et al., 2000).

A interação da zona pelúcida com o espermatozóide capacitado, levando à exteriorização das cadeias de oligossacarídeos dentro da estrutura tridimensional da zona pelúcida, pode iniciar a formação de um complexo receptor na membrana espermática, mediado pelo cálcio. Estes eventos levam à agregação de moléculas sinalizadoras do complexo que, então, ativam a cascata, com exocitose, penetração da zona pelúcida e a fusão do espermatozóide com o ócito (TOPFER-PETERSEN et al., 2000; BEN-YOSEF e SHALGI, 2001).

2.4. COLETA E AVALIAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO

A coleta de sêmen caprino geralmente é feita por meio de vagina artificial, mas pode-se fazer também por meio de um eletroejaculador, ou ainda pelo acesso cirúrgico à cauda do epidídimo (KUNDU et al., 2002). A eletroejaculação é um método pouco utilizado para a coleta de sêmen na espécie caprina. Segundo Lima (2008), este método fica reservado às situações em que o animal encontra-se impossibilitado de realizar a monta por problemas ou defeitos adquiridos que o impeçam de realizar a monta.

A vagina artificial é um instrumento que simula as condições de pressão e temperatura da vagina natural. Para a coleta, é necessário utilizar um manequim que pode ser uma cabra em estro induzido ou natural, ou outro macho, devidamente contido, para que o reprodutor realize o salto. É extremamente importante a manutenção do sêmen sob a proteção da luz solar e poeira, além de evitar agitações bruscas (GRANADOS et al., 2006). Segundo Yamashiro et al. (2006), a presença de albumina

sérica bovina (BSA) nos tubos de coleta, proporcionam uma melhora nos resultados de motilidade e integridade acrossomal após o descongelamento.

Para se obter ejaculados de melhor qualidade, recomenda-se estabelecer um programa de coleta semanal de sêmen caprino. Este programa pode consistir, usualmente, na realização de uma coleta por dia, durante cinco dias, com descanso de 48h, podendo-se fazer uso de bodes a partir de 7 a 8 meses de idade (GIBBONS, 2002), embora existam vários outros modelos de programas sugeridos. Após a coleta, o sêmen caprino deve ser avaliado de acordo com parâmetros macros e microscópico preconizados pelo CBRA (1998).

2.5. CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação mantém a vida útil do sêmen por um período indefinido à temperatura de -196°C em nitrogênio líquido, entretanto uma grande proporção de espermatozoides é morta no processo de congelamento e descongelamento do sêmen (NOAKES et al., 2001).

A velocidade de congelamento é responsável pela cristalização e vitrificação da água intraespermática. Se há um congelamento mais lento, a cristalização da água livre extraespermática dá origem a uma exosmose e desidrata a célula espermática. O congelamento rápido evita esta desidratação dos espermatozoides e, conseqüentemente, promove menos danos à célula (AZEVEDO et al., 2000).

É bem conhecido que o resfriamento rápido do sêmen dos ungulados, entre 30 a 0°C induz um estresse letal para algumas células, sendo este proporcional à taxa de resfriamento, ao intervalo de temperatura e ao limite de temperatura. Esse processo é conhecido como choque térmico, que afeta variavelmente o sêmen de todas as espécies (WATSON, 2000). Desta forma, uma taxa de resfriamento adequada é necessária para prevenir danos estruturais, bioquímicos e biofísicos a membrana. Rovay et al. (2006) mostraram uma maior eficiência de um resfriamento não linear antes do congelamento, apresentando motilidade total e percentagem de células vivas maiores que quando submetido ao resfriamento linear.

Uma diminuição significativa da motilidade total e progressiva dos espermatozoides, assim como, uma fragmentação do DNA, pode ocorrer no sêmen criopreservado quando comparado ao sêmen fresco.

Os espermatozóides, quando congelados, são capazes de gerar espécies reativas ao oxigênio (ROS), e esta geração têm um papel importante na capacitação espermática (LECLERC et al., 1997), reação acrossomal (de LAMIRANDE, 1998), hiperativação (de LAMIRANDE e GAGNON, 1995) e fusão do espermatozóide com o oócito (AITKEN et al., 1995)

A geração do ROS *in vitro* pela Xantine e Xantine-oxidase resulta em redução na motilidade espermática, viabilidade e reação acrossomal (de LAMIRANDE e GAGNON, 1992) e fusão do espermatozóide ao oócito (AITKEN et al., 1993). O peróxido de hidrogênio é o principal responsável pelas alterações nos espermatozóides (ALVAREZ e STOREY, 1989).

A cascata de peroxidação lipídica tem início quando o ROS reage com os ácidos graxos poliinsaturados na membrana da célula espermática. Como consequência a membrana da célula espermática perde integridade e capacidade de participar dos eventos relacionados com a fertilização (STOREY, 1997).

Em adição aos efeitos na membrana, a peroxidação lipídica pode causar danos ao DNA, como mudanças de bases, quebra de ligações do DNA entre outras (TWIGG et al., 1998). A peroxidação do DNA pelos produtos citotóxicos da peroxidação dos lipídios (radical peroxil, malandialdeído e 4-didroxinonenol), é um importante mecanismo de perda da integridade do DNA, assim como também, da membrana e da capacidade de fertilização da célula espermática.

2.6. DESCONGELAMENTO

Desde que o sêmen caprino foi congelado pela primeira vez por Smith e Polge (1950), e esses autores se reportaram à fertilidade pós-descongelamento do sêmen dessa espécie como muito baixa para serem consideradas de valor prático. Desde então, muitas investigações têm sido desenvolvidas sobre a criopreservação do sêmen caprino e todas as etapas envolvidas no processo (LEBOEUF et al., 2000).

O tempo de equilíbrio é considerado o tempo total em que os espermatozóides são mantidos em contato com o crioprotetor e todos os demais componentes do diluidor, previamente ao congelamento. Durante esse período, ocorre o equilíbrio osmótico entre o meio intracelular espermático e extracelular, formado por todos os componentes osmoticamente ativos presentes no meio diluidor (SALAMON e MAXWELL, 2000). Segundo Oettlé (1986), um período de equilíbrio apropriado, assim como adequadas taxas de diluição e resfriamento celular, são fatores fundamentais para a prevenção do

surgimento de alterações espermáticas durante o processo de criopreservação espermática. Com o desenvolvimento de melhores técnicas nos processos iniciais de congelamento, podem aumentar os índices de viabilidade espermática pós-descongelamento.

Alguns trabalhos demonstram que o período de equilíbrio ao qual o sêmen caprino deve ser submetido, previamente ao congelamento, vai até 4h de tempo total, enquanto períodos maiores (5 a 6 h) não promoveram melhorias no sêmen caprino descongelado. (SINHA et al., 1992; DUTTA et al., 1996). Deka e Rao (1986) encontraram menores taxas de alterações de acrossoma nos espermatozoides submetidos a um menor tempo de equilíbrio (1h), quando comparados com o sêmen mantido por períodos maiores (3 e 5 h). Entretanto, Das e Rajkonvar (1994) observaram que o sêmen que permaneceu por 3 h em tempo de equilíbrio obteve melhores índices de motilidade pós-descongelamento e de lesões acrossomais, quando comparado ao sêmen que permaneceu por 1 e 6 h. Baruah et al. (2003) não verificaram diferenças significativas em relação às taxas de motilidade espermática e lesões acrossomais, para as amostras de sêmen equilibradas por 0,5, 1 e 1,5 h.

Segundo Evans e Maxwell (1987), o processo de descongelamento das amostras de sêmen deve ser determinado pelo método de congelamento usado. Por exemplo, amostras peletizadas são descongeladas em um tubo seco a 37 °C, enquanto as amostras nas palhetas podem ser descongeladas de diversas maneiras.

Em bovinos, o procedimento usual de descongelamento é mergulhar as palhetas em água a 35 °C por 20 a 30 segundos quando se utiliza de palhetas de 0,25 mL por 40 a 60 segundos para palhetas de 0,5 mL, sendo que após o descongelamento, o ideal é utilizar a dose de sêmen num período máximo de 15 minutos (BALL e PETERS, 2006). Já nos caprinos, tradicionalmente, o descongelamento a 37 °C por 12-30 segundos é mais utilizado por serem obtidos resultados superiores aos obtidos pelo descongelamento a 05 °C por 2 minutos, entre outros métodos (PURDY, 2006).

2.7. AVALIAÇÃO DE MOTILIDADE E VIGOR ESPERMÁTICA

A avaliação da motilidade espermática é o parâmetro mais utilizado para a avaliação do sêmen, definida como porcentagem de espermatozoides móveis da amostra avaliada imediatamente após a coleta ou após a criopreservação do sêmen (SEAGER e FLETCHER, 1972). A avaliação da motilidade após a criopreservação tem como

objetivo verificar a proporção de espermatozóides que mantiveram a motilidade após as injúrias causadas por esse processo de conservação (PEÑA, 2000).

A proporção de espermatozóides exibindo motilidade progressiva é, geralmente, estimada, subjetivamente, no microscópio óptico de contraste de fase ou, de forma objetiva, utilizando-se a análise computadorizada (PEÑA MARTINEZ, 2004). O vigor da célula espermática é um parâmetro, normalmente, avaliado em conjunto com a motilidade espermática e é definido como a qualidade do movimento exibido pelos espermatozóides móveis. Para tanto, faz-se uso de uma escala compreendida numa faixa de 0 a 5 (CHRISTIANSEN, 1988).

Estudos têm demonstrado que tanto nos ejaculados frescos (CASEY et al., 1993) como nos congelados (JANUSKAUSKAS et al., 1996), há uma proporção de espermatozóides que são viáveis mesmo estando imóveis, podendo adquirir motilidade após estimulação com cafeína (LARSSON et al., 1976). Portanto, a avaliação da motilidade não pode ser usada como técnica de mensuração dos espermatozóides vivos e mortos, mas fornece informação de um fator necessário para a capacidade fertilizante da célula espermática, pois é a manifestação da sua competência estrutural e funcional (PEÑA MARTINEZ, 2004).

Embora a motilidade espermática esteja geralmente correlacionada à integridade da membrana plasmática (KUMI-DIAKA, 1993), os relatos de correlações entre a motilidade espermática e a taxa de fertilidade ainda são conflitantes (KJAESTAD et al., 1993; SANCHEZ-PARTIDA et al., 1999; TARDIF et al., 1999).

2.8. AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

A morfologia espermática é um parâmetro indispensável na avaliação seminal, pois é intrinsecamente implicada a problemas de fertilidade (OETTLÉ, 1993). Este autor relatou que à medida que se aumenta o percentual de espermatozóides anormais, a fertilidade é reduzida, sendo observado que, quando a proporção de espermatozóides morfológicamente normais estava abaixo de 60%, a fertilidade foi adversamente afetada.

Vários métodos têm sido desenvolvidos para avaliar a morfologia da célula espermática. Esfregaços úmidos de sêmen podem ser examinados por microscopia de contraste de fase após a fixação com glutaraldeído ou de tampão formol salina para manter as características celulares e permitir uma observação futura (CBRA, 1998). A

morfologia também pode ser avaliada, após o uso de corantes Wright, Rosa de Bengala, Diff-Quik, Spermac® (PURSWELL et al., 1992; OETTLÉ e SOLEY, 1985; STRÖM et al., 1997), Giemsa (CARDOSO et al., 2003), Hematoxilina-eosina (SILVA et al., 2003) e Eosina-nigrosina (PEÑA, 2000).

O acrossoma do espermatozóide pode ser avaliado pela microscopia óptica em esfregaços corados com Eosina-nigrosina (OETTLÉ, 1988; PEÑA et al., 1998a), Giemsa (DAHLBOM et al., 1997) coloração tripla composta por Rosa de bengala/azul de tripan/marrom de Bismarck (TALBOT e CHACON, 1981), rosa bengala (RODRIGUES, 1997) e Spermac® (OETTLÉ 1993; STRÖM et al., 1997).

Existem dois principais métodos de classificação das alterações morfológicas. Um deles é dividido em alterações primárias e secundárias (JOHNSTON et al., 2001), e o segundo em defeitos maiores e menores (OETTLÉ, 1993). Outra classificação pode dividir os defeitos maiores e menores quanto à região do espermatozóide em que está situada a alteração, ou seja, cabeça, peça intermediária e/ou cauda (CARDOSO et al., 2003).

Blom (1973) classificou as patologias do sêmen em defeitos maiores e menores. Sendo os defeitos maiores aqueles que podem ter um efeito negativo maior na fertilidade, diferentemente dos menores.

2.9. TESTES DE INTERAÇÃO OÓCITO-ESPERMATOZÓIDE

A ligação do espermatozóide à zona pelúcida (ZP) é um evento crítico na interação gametogênica que culmina com a fertilização do oócito (MAYENCO-AGUIRRE e PÉREZ-CORTES, 1998). A habilidade de um espermatozóide de interagir, corretamente, com o oócito é crucial e dependente de vários fatores, incluindo a motilidade espermática e a fluidez de membrana.

A habilidade do espermatozóide em se ligar a algum receptor da zona pelúcida é um teste potencialmente valioso ao se avaliar técnicas de criopreservação de sêmen. Pois está diretamente relacionado à capacidade fecundante dos espermatozoides (BARBATO et al., 1998). Testes avaliando essa habilidade dos espermatozoides têm sido desenvolvidos para eqüinos (FAZELLI et al., 1993a), bovinos (FAZELLI et al., 1993b), suínos (FAZELLI et al., 1995) e caninos (MAYENCO-AGUIRRE e PEREZ-CORTEZ, 1998; STRÖM HOLST et al., 2001).

Os testes de ligação do espermatozóide canino à zona pelúcida podem ser realizados utilizando-se oócitos homólogos íntegros (STRÖM HOLST et al., 2001) ou bisseccionados (hemizona) (MAYENCO-AGUIRRE e PEREZ-CORTEZ, 1998). Segundo Olar (1984), a avaliação da capacidade fecundante do espermatozóide, imediatamente após o descongelamento, seria um parâmetro mais importante do que a simples observação da manutenção da motilidade após um período de incubação (teste de termorresistência).

A interação entre oócito e espermatozóide pode ser avaliada pela fluorescência (Hoechst 33258) ou pela microscopia óptica (aceto-orceína), na qual se observa a presença de cabeças espermáticas ligadas à zona pelúcida ou no espaço perivitelínico e ooplasma do oócito (HEWITT e ENGLAND, 1997).

O teste de penetração oocitária consome menos tempo do que fertilização *in vitro*, visto que não há a necessidade de maturar o oócito, e somente a ligação/penetração é avaliada e não o desenvolvimento embrionário (HEWITT e ENGLAND, 1997).

A ligação do espermatozóide na zona pelúcida e a penetração no ooplasma mostraram-se, intimamente, associada à motilidade espermática (HAY et al., 1997), mas não se correlacionaram com a morfologia acrossomal (RODRIGUES et al., 2004).

A concentração, morfologia e motilidade espermática são utilizadas como parâmetros indicativos básicos de fertilidade do macho. Os eventos bioquímicos relacionados à fertilização e a capacidade fecundante são difíceis de mensurar por meio de técnicas básicas de análise de sêmen. Com isto, podem-se utilizar os testes de ligação e penetração da zona pelúcida como técnicas de avaliação do potencial de capacitação e reação acrossômica do espermatozóide (AMORIM et al., 2008).

Similaridades entre as glicoproteínas da zona pelúcida e da membrana perivitelina da gema de ovo de galinha permite a ligação dos espermatozoides de outras espécies a esta membrana segundo Barbato et al. (1998). Estes ainda observaram que a membrana da gema de ovo de galinha poderia ser utilizada para avaliar a capacidade de ligação de espermatozoides de perus, e apresentaram um gráfico comparativo (Figura 01) demonstrando o comportamento da capacidade de ligação dos espermatozoides de diferentes espécies de mamíferos à membrana perivitelina da gema do ovo de galinha.

Segundo Amorim et al. (2008) ensaios de ligação com a membrana perivitelina são simples, e de fácil obtenção. Com este teste, Barbato et al. (1998) esperavam maior

uniformização das respostas de um mesmo indivíduo, aumentando, assim, a probabilidade de observar diferenças entre indivíduos. Com isto, este teste foi utilizado para identificar subfertilidade em galos (BARBATO et al., 1998), Perus (GILL et al., 1999), e homens (AMANN et al., 1999), além de avaliar danos aos espermatozoides causados pelo processo de criopreservação do sêmen (AMANN et al., 1999a).

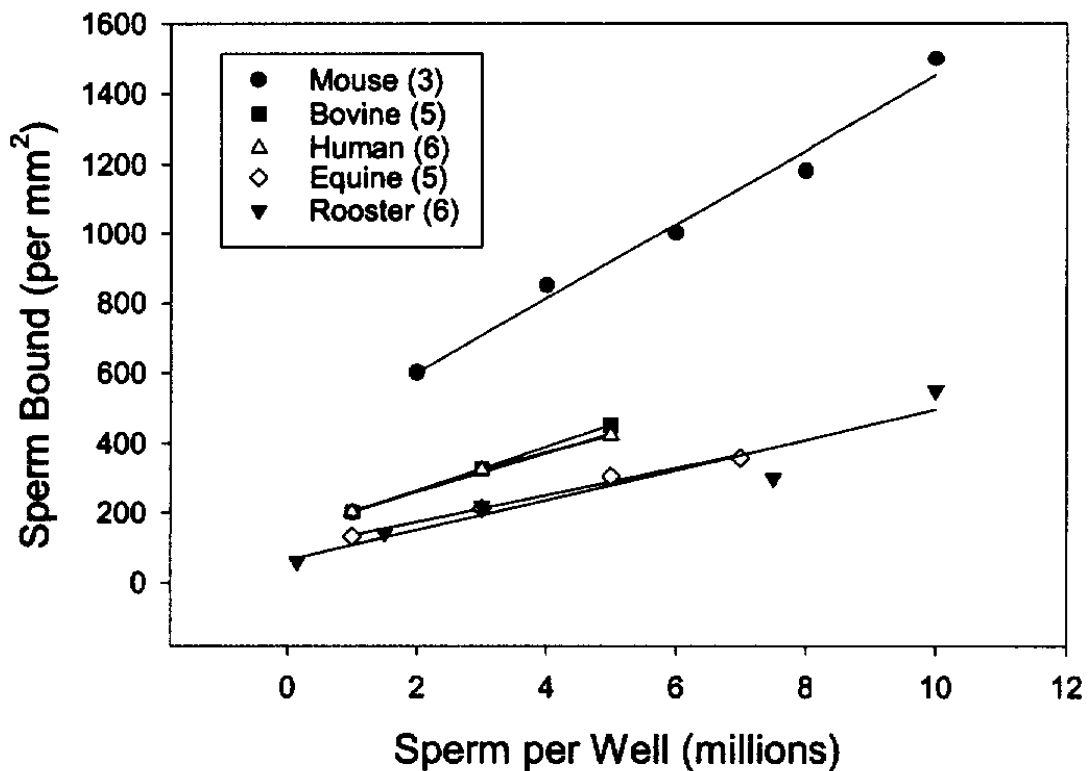


Figura 01. Comportamento do percentual de adesão dos espermatozoides por milímetro quadrado (linha vertical) em função da concentração de espermatozoides em milhões por campo (linha horizontal) em ratos, bois, homens, garanhões e galos. Fonte: Barbato et al. (1998)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. LOCAL

O experimento foi realizado no Setor de Caprinocultura e no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, no período de abril a maio de 2009.

3.2. ANIMAIS

Foram utilizados machos das raças Saanen (2) e Pardo Alpina (2), com idades entre 3 e 7 anos, simetria testicular e bolsa escrotal sem qualquer alteração, prepúcio e pênis normais, boa libido e clinicamente normais.

3.3. MÉTODO DE COLETA DO SÊMEN

O sêmen foi coletado por meio de vagina artificial, constituída por um cilindro rijo, aberto em ambas as extremidades, válvula controladora de entrada e saída de água e ar, mucosa de borracha, revestida internamente por um saco plástico (camisinha) que na outra extremidade estava acoplada ao tubo de coleta graduado, e uma proteção de tecido escuro. (Modificado de MIES FILHO, 1987). A vagina foi preenchida com água a 60 °C e ar, até a obtenção da pressão necessária para a coleta do sêmen, obtendo-se a temperatura média de 41 °C (40 a 42 °C) no ato da coleta. Além disso, o tubo de coleta foi revestido com o saco de tecido escuro, para proteger sêmen das variações térmicas e radiação solar ultravioleta. Utilizou – se cabras em cio natural, como manequim, que foram colocadas em um tronco de contenção. As coletas foram realizadas em dias alternados, sendo quatro coletas para cada animal, totalizando 16 ejaculados.

3.4. EXAMES DO SÊMEN

O sêmen coletado foi colocado em banho-maria a 37 °C, para preservação dos espermatozoides durante as análises. Os materiais utilizados no experimento, como lâminas, lamínulas, pipetas e recipientes, foram colocados sobre uma placa aquecedora a 37 °C, evitando que os espermatozoides passassem por variações térmicas.

3.4.1. VOLUME

A determinação do volume do ejaculado foi realizada no laboratório, por meio de leitura no tubo de coleta graduado, antes da colocação no banho-maria.

3.4.2. COR

A cor do sêmen foi determinada visualmente, de acordo com Mies Filho (1987).

3.4.3. TURBILHONAMENTO

Para proceder-se a avaliação do turbilhonamento, colocou-se 10 μ L de sêmen recém-coletado sobre lâmina a 37 °C, levando-a ao microscópio de contraste de fase, com aumento de 10x. A interpretação foi subjetiva, sendo considerada escala de zero a cinco pontos (FONSECA et al., 1992).

3.4.4. MOTILIDADE ESPERMÁTICA

Foi determinada colocando-se 10 μ L de sêmen sobre lâmina e adicionando-se 100 μ L do diluente de congelamento. O material foi homogeneizado e retirado 10 μ L e colocado sobre lâmina a 37 °C, em seguida coberto com lamínula, levando-a ao microscópio de contraste de fase, com aumento de 40x. A avaliação foi subjetiva, considerando-se variações de 0 a 100%. Para a avaliação do sêmen congelado, não se utilizou a diluição.

3.4.5. VIGOR ESPERMÁTICO

Esta avaliação foi realizada a partir da lâmina preparada para motilidade espermática e classificado numa escala de zero a cinco pontos, em que os valores mais elevados indicaram sêmen de melhor qualidade (FONSECA et al., 1992).

3.4.6. CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA

Para determinação da concentração espermática, foi utilizada a câmara de Neubauer dupla, em que o sêmen foi diluído em água destilada, na proporção de 1:200 (água:diluidor), utilizando-se a pipeta de volume variável. Preenchida a câmara de Neubauer, o material foi levado ao microscópio de contraste de fase em aumento de 40x (FONSECA et al., 1992).

Obs.: A partir daqui cada coleta será denominada partida. Foram congeladas 12 palhetas de 0,25 ml de cada partida, totalizando 184 palhetas congeladas.

3.5. DELINEAMENTO

Para cada partida congelada se utilizou uma alíquota de 20 μ L de sêmen fresco para inseminar uma membrana perivitelina de gema do ovo, onde se denominou este grupo de ligação em membrana perivitelina da gema do ovo com sêmen fresco (MPVGOF). Após o congelamento outros três grupos foram formados. No primeiro grupo, para cada partida de sêmen descongelado foi inseminada uma membrana perivitelina da gema do ovo, sendo este grupo denominado ligação em membrana perivitelina com sêmen descongelado (MPVGOD). No segundo grupo para cada partida foi utilizado um oócito bovino, denominando-se ligação em oócito bovino (LIGBOV), já no terceiro grupo, em cada partida se utilizou um oócito caprino, onde foi denominado ligação em oócito caprino (LIGCAP).

Por meio de recursos disponíveis no site <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>, foi feito o alinhamento das sequências gênicas (disponíveis no GENBANK, www.genbank.com.br), das proteínas Integrina, Tetraspanina (CD9), ZP2 e ZP3, das espécies, bovina e aves domésticas (galinha) em relação à espécie caprina.

3.6. CONGELAMENTO DO SÊMEN

As amostras foram congeladas com o meio comercial a base de Tris (Bioxcell – IMV) (tabela. 01). O sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL, estas palhetas foram colocadas em tubo de ensaio de 20 mL revestido por refil (saco plástico) e colocado dentro de recipiente de plástico com capacidade de 240 mL contendo 125 mL de álcool etílico absoluto. O recipiente foi então colocado na posição horizontal dentro da geladeira, com temperatura interna entre 04 e 05 ° C, durante 60 minutos.

Tabela 01. Composição química do diluidor.

COMPONENTES	g/L
Tris	2,3
Citrato de sódio	6,2
Cloreto de potássio	0,8
Frutose	1,2
Lactose monohidratada	0,8
Glicina	0,2
Glicose anidra	0,5
Taurina	0,005
Sulfato de gentamicina	0,24
Tartrato de tilosina	0,33
Lincospectina 100	0,383
Glicerol	40,2
Hidrato de lactato de cálcio	0,7
Lecitina de soja	1,5
Ácido cítrico monohidratado	2,5
Água ultra pura q.s.p.	1000 mL

FONTE: IMV® - BRASIL.

O pré-congelamento foi realizado durante 15 minutos em vapor de nitrogênio líquido, colocando-se as palhetas sobre suporte de aço inox, à altura de 5 cm acima da lâmina de nitrogênio líquido, acondicionadas em caixa de isopor com 40 cm de comprimento x 32 cm de altura x 20 cm de largura, contendo lâmina de 5 cm de altura de nitrogênio em seu interior. Após esse período, as palhetas foram imersas no nitrogênio para o congelamento final do sêmen, sendo colocadas em raques, devidamente identificadas, ainda submersas no nitrogênio. Em seguida as raques foram estocadas em botijão com nitrogênio líquido para análises posteriores.

3.7. TESTE DE LIGAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES AOS OÓCITOS CAPRINO E BOVINO

Foram descartadas quatro cabras do rebanho do setor de caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, por baixa produção de leite, sem qualquer relação com problemas reprodutivos. Destas foram retirados os ovários, e por meio de aspiração folicular, utilizando seringa de 1000 µL com agulha acoplada, os oócitos foram coletados e em seguida foram armazenados em solução saturada de cloreto de sódio a temperatura de 4 °C.

Os oócitos bovinos foram coletados e armazenados da mesma forma que os oócitos caprinos, e os ovários foram adquiridos em frigorífico do município de viçosa, a 40 minutos do laboratório.

Para realização dos testes, os oócitos foram retirados da solução saturada e lavados quatro vezes em BTS, em seguida, foram colocados em 200 µL de Bull TALP (B-TALP), para cada oócito, e postos na estufa a 37 °C com pressão atmosférica de 5% de CO₂ por 60 minutos. Em seguida cada oócito foi inseminado com 20 µL de sêmen descongelado, com a concentração de 5×10^6 espermatozóides/ mL. Após 45 minutos foi adicionado 1µL de corante de Hoechst 33342, permanecendo incubado por mais 15 minutos. Após 60 minutos de incubação do oócito inseminado estes foram lavados quatro vezes em BTS. Em seguida, o oócito foi colocado sobre a lâmina disperso em 10 µL de BTS e coberto com lamínula para observação em microscópio Olympus – Modelo BX 60F5, equipado com filtro de excitação (365 nm) e filtro de barreira (410 nm), com um aumento de 400x. Todas as células espermáticas ligadas à membrana do oócito foram contadas.

3.8. TESTE DE LIGAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES À MEMBRANA PERIVITELÍNICA DA GEMA DO OVO

A membrana perivitelina foi preparada pela separação da gema da clara do ovo, removendo o excesso de clara usando um papel toalha. A gema intacta foi colocada sobre um pedaço de parafilme, a membrana sendo delicadamente rompida e lavada usando B-TALP mantendo a membrana no parafilme. A membrana removida do parafilme foi colocada em tubo de vidro de 10 mL. A membrana foi lavada várias vezes com B-TALP até que a solução estivesse limpa. A membrana perivitelina foi colocada dentro de placa de Petri, A membrana foi espalhada delicadamente e cortada em

pequenos quadrados (1 cm²), usando uma cubeta de espectrofotômetro como modelo. Cada pedaço foi colocado em um tubo de cultura (10 mL) contendo 1 mL de B-TALP. Cada quadrado da membrana foi inseminado com 20 µL de sêmen na concentração de 5 x 10⁶ espermatozoides/ mL.

A membrana com os espermatozoides foram incubados por 1 hora a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Agitando-se suavemente após 30 minutos. Neste momento acrescentou-se 1µL de Hoechst 33342 (1mg/mL de água), para corar o núcleo dos espermatozoides. Depois da incubação, a membrana foi colocada em um tubo contendo 1 mL de B-TALP, e as membranas foram lavadas cinco vezes com B-TALP.

Colocou-se a membrana sobre uma lâmina, e delicadamente espalhada para remover possíveis dobras, foram cobertas com lamínulas e examinadas utilizando microscópio Olympus – Modelo BX 60F5, equipado com filtro de excitação (365 nm) e filtro de barreira (410 nm), com um aumento de 400x. Observaram-se os núcleos dos espermatozoides aderidos à membrana.

Para cada membrana foram contados todos os espermatozoides que estavam aderidos em 06 microcampos, e estimando, assim, o percentual de espermatozoides aderidos segundo Barbato et al. (1998).

3.9. ESTATÍSTICA

Seguiu-se o delineamento inteiramente casualizado, comparando-se no primeiro momento dois tratamentos (LIGBOV e MPVGOD) em relação ao tratamento padrão (LIGCAP) pelo teste de DUNNET (P<0,05), e no segundo momento, foi feita a análise de variância (P<0,05) entre os tratamentos MPVGOF e MPVGOD. Em todas as características estudadas realizou-se a estatística descritiva (médias, desvio padrão da média e coeficiente de variação). O teste de Lilliefors foi utilizado para a verificação de normalidade dos dados. E para avaliar a homogeneidade das variâncias empregou-se o teste de Cochran e Bartlett. Foi realizada a correlação simples de Pearson entre todas as variáveis estudadas. Foi calculado um intervalo de confiança com 95% de probabilidade do valor real da média estar contido neste intervalo, em seguida comparou-se com intervalos de confiança gerados a partir de dados observados na literatura.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios com seus respectivos desvios padrão da média (Média \pm S \bar{x}) referente ao volume do ejaculado (VOL), concentração espermática (CONC), motilidade espermática (MT), vigor espermático (VIG) do sêmen a fresco e motilidade espermática (MT) e vigor espermático (VIG) do sêmen descongelado encontram-se na tabela 02. Não houve variação ($P > 0,05$) entre os animais utilizados em qualquer variável estudada.

O volume médio de sêmen coletado foi $1,1 \pm 0,15$ mL. Estes resultados são coerentes com os valores, encontrados na literatura, para bodes durante a estação reprodutiva (KARATZAS et al., 1997). Segundo Hafez e Hafez (2004) o volume do sêmen varia de acordo com o método de coleta, com a idade do animal, estação e frequência das coletas, variando entre 0,5 a 2 mL em animais adultos e de 0,5 a 0,7 mL nos jovens.

As médias observadas para volume foram superiores aos valores médios preconizados pelo CBRA (1998) para a espécie caprina, que é de 0,8 mL. Assim, também, Martins et al. (2006) observaram um volume de $0,7 \pm 0,32$ em animais da raça Parda Alpina. No entanto, Lima et al. (1991) trabalhando com caprinos da raça Saanem, observaram média de 1,54 mL para volume do ejaculado. Sendo assim, os resultados mantiveram-se na média, como seria esperado, visto que, animais de ambas as raças foram utilizados no presente estudo.

A concentração espermática média observada foi de $1,94 \pm 0,21 \times 10^9$ espermatozóides, resultado semelhante aos apresentados por Siqueira (2006) $2,02 \pm 0,64 \times 10^9$, Rovay (2006) $2,2 \pm 0,7 \times 10^9$, diferindo dos resultados de Martins et al. (2006) $3,45 \pm 1,25 \times 10^9$, demonstrando a alta variabilidade da concentração espermática de caprinos na literatura consultada. Pois, os últimos autores observaram resultados fora do intervalo de confiança (95%) dos demais estudos inseridos.

Observou-se turbilhonamento médio de $3,6 \pm 0,23$, sendo igual aos $3,83 \pm 0,57$ reportado por Siqueira (2006), aos $4,06 \pm 0,66$ observado por Martins et al. (2006) e aos $4,0 \pm 0,6$ constatado por Castilho (2008). Foi observada motilidade espermática de $77,5 \pm 1,37$ para o sêmen fresco, sendo superior aos $72,00 \pm 11,59$ reportado por Bittencourt et al. (2007) e inferior aos $82,87 \pm 7,32$ de Martins et al. (2006), $83,0 \pm 5,0$ de Siqueira (2006) e $86,0 \pm 4,0$ de Rovay (2006), no entanto, todos estão dentro do mesmo intervalo de confiança com 95% de probabilidade deste intervalo conter a média real da

população. Estes valores observados são classificados como normais para a espécie de acordo com os valores mínimos de motilidade espermática preconizados para a espécie pelo CBRA (1998).

Os valores médios do vigor observado foi $3,8 \pm 0,1$, são iguais aos $4,14 \pm 0,48$ reportados por Siqueira (2006), aos $4,0 \pm 0,8$ de Rovay (2006) e aos $4,1 \pm 0,3$ de Castilho (2008), diferindo de $3,35 \pm 0,46$ verificado por Martins et al. (2006), estando acima do valor mínimo preconizado pelo CBRA (1998).

Tabela 02. Médias, desvio padrão da média e coeficiente de variação do volume, concentração, turbilhonamento, vigor e motilidade espermática do sêmen fresco e o vigor e motilidade espermática do sêmen descongelado.

	Média	S _x	CV(%)
Volume	1,1	0,15	54,74
SPTZ x 10 ⁹ /mL	1,94	0,21	41,42
Turbilhonamento	3,6	0,23	25,3
VGSF	3,8	0,10	9,57
VGSD	2,7	0,12	17,72
MotSF	77,5	1,37	7,07
MotSD	32,2	1,37	16,98

SPTZ – espermatozóide; VGSF – vigor do sêmen fresco; VGSD - vigor do sêmen descongelado; MotSF – motilidade do sêmen fresco; MotSD - motilidade do sêmen descongelado; S_x – desvio padrão da média; CV (%) – coeficiente de variação.

As médias dos testes de ligação de espermatozoides aos oócitos caprino e bovino e também a membrana perivitelina da gema do ovo com sêmen descongelado estão sumariados na tabela 03.

Não foram encontradas diferenças ($P>0,05$) entre os testes de ligação do oócito bovino e gema do ovo em relação ao teste de ligação ao oócito caprino (tratamento padrão), sugerindo a possibilidade de substituir este ultimo, por qualquer dos testes

anteriores, na realização de análises *in vitro* para determinar a qualidade seminal de caprinos pela sua capacidade de adesão espermática.

Tabela 03. Médias, desvio padrão da média e coeficiente de variação dos testes de ligação dos espermatozóides caprinos aos oócitos caprino, bovino, e a membrana perivitelina da gema do ovo.

Teste	Média	S _x	CV (%)
LIGCAP (Padrão)	231,4 ^a	8,97	14,50
LIGBOV	218,6 ^a	8,97	15,35
MPVGOD	190,6 ^a	29,92	58,73

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem do padrão (P<0,05) pelo teste de Dunnett. LIGCAP – ligação ao oócito caprino; LIGBOV – ligação ao oócito bovino; MPVGOD – a membrana perivitelina da gema do ovo com sêmen descongelado; S_x – desvio padrão da média; CV (%) – coeficiente de variação.

Os resultados da análise comparativa do teste de ligação da gema do ovo, utilizando o sêmen caprino fresco e descongelado estão sumariados na tabela 04. Não houve diferença (P>0,05) entre as médias do teste de ligação com sêmen fresco ou congelado, em contraste aos resultados de Barbato et al. (1998) num trabalho com sêmen de galo, em que observaram diminuição do percentual de espermatozóides ligados e atribuíram esta aos danos celulares causados pelo processo de congelamento.

As médias do percentual de espermatozóides ligados foram $18,4 \pm 2,0$ e $19,1 \pm 2,9$ %, para o sêmen fresco e descongelado, respectivamente. Reis (2002) estudando a ligação à membrana da gema do ovo com sêmen suíno *in natura* nas concentrações de 6,25 e 12,5 x 10⁶ espermatozóides/ mL, observou uma variação no número de espermatozóides ligados de 0,05 a 8,97% e 0,43 a 8,83, respectivamente. Amann et al. (1999) estudando o sêmen humano observaram que o percentual de espermatozóides ligados foi dose dependente decrescente, sugerindo que a medida que aumentava a concentração havia também aumento na competição, reduzindo a probabilidade de ligação, independente do potencial de ligação da célula espermática.

Em outra pesquisa Amann et al. (1999a) observaram variação de 3 a 35% de espermatozoides de homens ligados à membrana da gema do ovo. Atribuiu-se esta variação às diferenças na capacidade de fertilização entre os indivíduos. É possível que nos resultados deste estudo não tenha ocorrido diferença ($P>0,05$) entre as médias por dois motivos. 1º - o processo de congelamento utilizado não afetou as estruturas de superfície dos espermatozoides responsáveis pela sua adesão a membrana. E segundo, os indivíduos utilizados não apresentaram diferenças ($P>0,05$) entre qualquer outra variável analisada, estando estes, possivelmente, com as mesmas condições de fertilização.

Tabela 04. Médias percentuais, desvio padrão da média e coeficiente de variação dos testes de ligação da gema do ovo, utilizando sêmen caprino fresco e descongelado.

Descrição	Média (%)	S _x	CV (%)
MPVGOF	18,4 ^a	2,0	43,28
MPVGOD	19,1 ^a	2,9	58,73

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P<0,05$) pelo teste ANOVA. MPVGO – membrana perivitelina da gema do ovo com sêmen fresco; MPVGOD – a membrana perivitelina da gema do ovo com sêmen descongelado; S_x – desvio padrão da média; CV (%) – coeficiente de variação.

Estão sumariadas na tabela 05, as correlações entre os aspectos físicos do sêmen *in natura* com os testes de ligação dos espermatozoides aos oócitos caprino e bovino, e também à membrana perivitelina da gema do ovo.

Houve uma correlação média e positiva entre o turbilhonamento e a concentração espermática ($r = 0,61$), e o vigor espermático do sêmen fresco ($r = 0,50$), indicando que os ejaculados de maior concentração e com espermatozoides mais vigorosos foram àqueles melhores classificados quanto ao turbilhonamento. Não houve correlação da motilidade espermática com os demais parâmetros físicos do sêmen, ao contrário de Bezerra e Oliveira (2007) que observaram correlação entre o turbilhonamento e a motilidade espermática ($r = 0,93$), e ainda com o vigor espermático

($r = 0,94$). Enquanto que Castilho (2008) observou correlação entre a motilidade e o vigor espermático ($r = 0,52$) e com o teste supra vital ($r = 0,55$)

A motilidade espermática apresentou correlação média e positiva com o LIGBOV ($r = 0,56$), indicando que nas partidas de sêmen com maior motilidade antes do congelamento tiveram maior número de espermatozóides aderidos ao oócito. Sugerindo que: 1^o – O processo de congelamento é menos prejudicial, quanto à capacidade de ligação quando os espermatozóides estão mais ativos. 2^o – O oócito bovino é mais seletivo que o a membrana da gema do ovo, visto que, é necessário que os espermatozóides estejam mais ativos para se aderir ao oócito.

Tabela 05. Correlações simples de Pearson entre aspectos físicos do sêmen in natura com os testes de ligação dos espermatozóides caprinos aos oócitos caprino, bovino, e também a membrana perivitelina da gema do ovo.

	VOLUME	TURB	CONC	VGSF	MotSF	LIGCAP	LIGBOV	MPVGOD
VOLUME	1	-0,14	-0,31	-0,15	0,23	0,15	0,03	0,09
TURB		1	0,61*	0,50*	-0,03	0,06	0,25	-0,38
CONC			1	0,33	-0,28	-0,15	0,02	0,26
VGSF				1	-0,04	0,01	-0,01	-0,26
MotSF					1	0,37	0,56*	0,03
LIGCAP						1	0,80*	0,27
LIGBOV							1	0,01
MPVGOD								1

Números seguidos por (*) apresentam correlação significativa ($p < 0,05$). TURB – turbilhonamento; CONC – concentração; VGSF – vigor do sêmen fresco; MotSF – motilidade do sêmen fresco; LIGCAP – ligação ao oócito caprino; LIGBOV – ligação ao oócito bovino; MPVGOD – a membrana perivitelina da gema do ovo com sêmen descongelado.

Os resultados do alinhamento entre as sequências gênicas das proteínas Integrina, CD9, ZP3 e ZP2 estão sumariados na tabela 06.

A Integrina que é uma proteína de superfície dos gametas femininos e em conjunto com a CD9 responsáveis pela adesão entre os gametas (CHEN et al., 1999) apresenta em sua sequência gênica homologia de 42% entre caprinos (GenBank: AY787746.1) e bovinos (NCBI: NM_174368.2), e de 35% entre caprinos e aves domésticas (NCBI: NM_001039254.1). A CD9 que além de ter participação na adesão entre os gametas masculinos e femininos, também é fundamental no processo de fusão das membranas do espermatozóide e oolema (MIYADO et al., 2008), apresenta homologia de 90% entre caprinos (GenBank: EU395804.1) e bovinos (GenBank: M81720.1) e apenas 56% entre caprinos e aves domésticas (NCBI: NM_204762.1).

Analisando também as sequências gênicas das proteínas da família das ZPs, observou-se, que a ZP3 proteína responsável pelo reconhecimento do espermatozóide e pela especificidade da interação entre os gametas masculinos e femininos (BLEIL e WASSARMAR, 1983), apresenta homologia de 53% nos éxons analisados 3 e 4, entre caprinos (GenBank: DQ357879.1) e bovinos (NCBI: NM_173974.2) e de 37% nas mesmas sequências entre caprinos e aves domésticas (NCBI: NM_204389.1). A ZP2 que é responsável pela manutenção da adesão do espermatozóide a zona pelúcida após a reação acrossomal (MORTILLO e WASSARMAN, 1991), apresentou homologia de 62% entre caprinos (GenBank: DQ357903.1) e bovinos (NCBI: NM_173973.2) e de 35% entre caprinos e aves domésticas (GenBank: AY268034.1).

Com isto, pode-se observar que os sinalizadores dos espermatozoides caprinos, em tese, têm maior probabilidade de serem reconhecidos pelos receptores do oócito bovino em relação à membrana perivitelina da gema do ovo.

O LIGCAP apresentou correlação alta e positiva com o LIGBOV ($r = 0,80$), indicando que existe uma semelhança alta, nas estruturas de reconhecimento dos sinalizadores dos espermatozoides caprino, entre os oócitos caprinos e bovinos. Provavelmente a probabilidade do espermatozóide caprino ser reconhecido pelo oócito bovino é maior que pela membrana perivitelina da gema do ovo. Embora o teste de média tenha mostrado não haver diferença destes testes em relação ao teste com oócito caprino.

Correlação entre o MPVGO não foi observada com qualquer parâmetro avaliado, enquanto que Reis et al. (2003) trabalhando com sêmen de suíno, observaram correlação considerada baixa pelos autores ($r = 0,33$) com a motilidade.

Com a maior relação de homologia entre as sequências gênicas das proteínas responsáveis pela interação dos gametas masculinos e femininos do LIGCAP e LIGBOV, que entre LIGCAP e MPVGO, associada à alta correlação entre o LIGCAP e o LIGBOV, pode justificar a proximidade entre os seus coeficientes de variação.

Sabendo-se que os resultados de ensaios de ligação espermática *in vitro* com oócitos, são afetados por grande número de variáveis, tais como a variabilidade natural entre os oócitos, as condições da doadora, as condições laboratoriais, há necessidade de grande número de oócitos para realização das avaliações. A MPVGO poder ser a alternativa mais adequada, visto que, apresenta comportamento similar ao LIGCAP, além de eliminar algumas variáveis, dentre elas a variabilidade natural entre oócitos, pois a membrana de uma única gema pode ser fragmentada e a mesma ser utilizada para diferentes doses, avaliando assim mais de um indivíduo ou tratamento. O MPVGO ainda apresenta uma logística melhor, pois, é muito mais fácil adquirir membranas do ovo de galinha que conseguir oócitos de bovinos e principalmente os oócitos de caprinos.

Tabela 06. Percentual de homologia entre as sequências gênicas das proteínas Integrina, CD9, ZP3 e ZP2, entre caprinos e bovinos (CAP-BOV) e entre caprinos e aves domésticas (CAP-MPVGO).

Proteína	CAP-BOV (%)	CAP-MPVGO (%)
Integrina	42	35
CD9	90	56
ZP3	53	37
ZP2	62	35

CAP-BOV – relação de homologia entre sequências gênicas de caprinos e bovinos; CAP-MPVGO – relação de homologia entre sequências gênicas de caprinos e aves domésticas.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos conclui-se que, tanto o MPVGOD quanto o LIGBOV podem ser utilizados em substituição ao LIGCAP.

Para a avaliação da capacidade de ligação do sêmen caprino por meio do teste de ligação à membrana perivitelina da gema do ovo pode ser utilizado o sêmen fresco ou descongelado, sem comprometer os resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABAD, M.; SPRECHER, D.J.; FRIENDSHIP, R.M.; KIRKWOOD, R.N. Effect of sperm cryopreservation and supplementing semen doses with seminal plasma on the establishment of a sperm reservoir in gilts. *Reprod. Dom. Anim.*, v.42, p.149-152. 2007.
2. ABOAGLA, E.M.E.; TERADA, T. Effects of the supplementation of the trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, v.62, p.809-818. 2004a.
3. AITKEN, R.J.; BUCKINIGHAM, D.W.; BRINDLE, J.; GOMES, E.; BAKER, H.W.; IRVINE, D.S. Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma. *Hum. Reprod.*, v.10, p.2061-2071. 1995.
4. AITKEN, R.J.; HARKISS, D.; BUCKINIGHAM, D.W. Relationship between iron-catalyzed lipid peroxidation potential and human sperm function. *J. Reprod. Fétil.*, v.98, p.257-265. 1993.
5. ALEGRETTI, A.P.; MUCENIC, T.; BRENO, J.C.T.; XAVIER, R.M. O papel das proteínas reguladoras do complemento CD55/CD59 em células de sangue periférico de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. *Rev Bras Reum.*, v.49(3), p.276-87, 2009.
6. ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gam. Res.*, v.23, p.77-90. 1989.
7. AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H.; SHABANOWITZ, R. B. Exposure of human, boar, or bull sperm to a synthetic peptide increases to binding to an egg-membrane substrate. *J. of Androl.*, Champaign, v. 20, n. 1, p. 34-41, 1999a.
8. AMANN, R. P.; SHABANOWITZ, R. B.; HUSZAR, G.; BRODER, S. J. Increased in vitro binding of fresh and frozen-thawed human sperm exposed to a synthetic peptide. *J. of Androl.*, v. 20, n. 5, p. 655-660, Sept. 1999.
9. AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa, *J. Equine Vet. Sci.* v.7, p.145-173, 1987.

10. AMOAH, E.A.; GELAYE, S. Biotechnological advances in goat reproduction. *J. Anim. Sci.*, 75: 578–585. 1997.
11. AMORIM, E.A.M. Alteração da membrana espermática de suínos, bovinos e eqüinos na qualidade do sêmen, Tese (doutorado em Zootecnia), Viçosa – MG, 2008. 174p.
12. AZEREDO, G. A.; ESPER, C.R.; RESENDE, K.T. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small Rum. Rese.*, v.41, p.257-263. 2001.
13. BALL, P.J.H.; PETERS, A. R. Reprodução em bovinos. 3 ed. São Paulo: Roca, p.118-133, 2006.
14. BARBATO, G. F.; CRAMER, P. G.; HAMMERSTEDT, R. H. A practical in vitro sperm-egg binding assay that detects subfertiles males. *Biol. of Reprod.*, v. 58, p. 686-699, 1998.
15. BARUAH, C.K.; BISWAS, R.K.; DEKA, B.C.; BORGOHAIN, B.N. Effect of glycerol equilibration periods on quality of frozen semen in Beetal x Assam local crossbred goats. *Indian Vet. J.*, v.80, n.8, p.763-765, 2003.
16. BEZERRA, F.Q.G.; OLIVEIRA, M.A.L. Avaliação de parâmetros fisiológicos e andrológicos de caprinos jovens da raça Bôer. *Medicina Veterinária, Recife*, v.1, n.1, p.99-100, jan-jun, 2007.
17. BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO FILHO, A.L.; ALVES, S.G.G. BISCARDE, C.E.; VASCONCELOS, M.F.; OBA, E. Criopreservação do sêmen caprino: efeito da curva de resfriamento e do tempo de equilíbrio. *Ciência Animal*, v.17(2), p.75-82, 2007.
18. BLEIL, J.D.; WASSARMAN, P.M. Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev. Biol.*, v.76, p.185–202, 1980.
19. BLEIL, J.D.; WASSARMAN, P.M. Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev. Biol.*, v. 95, p. 317–324. 1983.
20. BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermiogram. *Nordic Veterinary Medicine*, v. 25, p. 383 – 391, 1973.
21. CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk

- and three different glycerol concentrations. *Theriogenology*, v.59, p.743-75, 2003.
22. CASEY, P.J.; HILLMAN, R.B.; ROBERTSON, K.R.; YUDIN, A.I.; LIU, I.K.M.; DROBNIS, E.Z. Validation of an acrossomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. *J. Androl*, v.14, p.289-297, 1993.
 23. CASTILHO, E.F. Uso da própolis e do ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2008. 63p.
 24. CHAMBERLIN, M.E., DEAN, J. Genomic organization of a sex specific gene: the primary sperm receptor of the mouse zona pellucida. *Development Biology*, v.131, p.207-214, 1989.
 25. CHAUHAN, M.S.; ANAND S.R. Effect of egg yolk lipids on the freezing of goat semen. *Theriogenology*, v.34, p.1003-1013, 1990.
 26. CHEN, M. S.; TUNG, K. S. K.; COONROD, S. A. et al. Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin $\alpha 6 \beta 1$: Implications for murine fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 96, n. 21, p. 11830 - 11835, 1999.
 27. CHEN, M.S., K.S. TUNG, S.A. COONROD, Y. TAKAHASHI, D. BIGLER, A. CHANG, Y. YAMASHITA, P.W. KINCADE, J.C. HERR, AND J.M. WHITE Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between spermADAM2 and the egg integrin $\alpha 6 \beta 1$: Implications for murine fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* v.96, p.11830–11835, 1999.
 28. CHRISTIANSEN, I.J. Reprodução no cão e no gato. São Paulo: Ed. Manole, 1988.
 29. DAHLBOM, M.; ANDERSSON, M.; VIERULA, M.; ALANKO, M. Morphometry of normal and teratozoospermic canine sperm heads using an image analyzer: work in progress. *Theriogenology*, v.48, p.687-698, 1997.
 30. DAS, K.K.; RAJKONWAR, C.K. Acrosomal changes of buck spermatozoa at different periods of equilibration and after freezing with skimmed milk egg yolk glycerol extender. *J. Assam. Vet. Council*, v.4, p.34-37, 1994.
 31. de LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and sperm axonemes. *J. Androl*. v.13, p.368-378. 1992.

32. de LAMIRANDE, E.; TSAI, C.; HARAKAT , A.; GAGNON, C. Involvement of reactive oxygen species in human sperm acrossome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluidultrafiltrats. *J. Androl.*v.19, p.585-594. 1998.
33. DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum. Reprod.*, v.10(suppl. 1), p.15-21, 1995.
34. DEAN, J. Biology of mammalian fertilization: role of the zona pellucida. *Journal of Clinical Investigation*, v. 89, p.1055–1059, 1992.
35. DEKA, B.C.; RAO, A.R. Effect of glycerol level in Tris-based extender and equilibration period on quality of frozen goat semen. *Theriogenology*, v.26, n.2, p.231-238, 1986.
36. DUTTA, S.; GHOSH, B.B.; BONDYOPADHYAY, S.K.; CHOUDHURY, R.R.; BASU, S.; GUPTA, R.D. Effect of different extenders, glycerol levels and equilibration times on deep-freezing of buck semen. *Indian Journal of Animal Health*, v.35, n.1, p.35-38; 1996.
37. EILTS, B.E. Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. *Theriogenology*, v.64, p.685-691, 2005.
38. EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of semen. In: Salamon's *Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Wellington: Butterworths, p.122–141. 1987.
39. EVANS, J. P. The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. *Human Reproduction Update*, v.8, n.4, p.297-311, 2002.
40. FAZELLI, A.R.; STEENWEG, W.; BEVERS, M.M.; DE LOOS, F.A.M.; VAN DEN BROEK, J.; COLENBRANDER, B. Development of a sperm zona pellucida binding assay for bull semen. *Vet. Rec.*, v.132, p.14-16, 1993b.
41. FAZELLI, A.R.; HOLT, C.; STEENWEG, W.; BEVERS, M.M.; HOLT, W.V.; COLENBRANDER, B. Development of a sperm hemizona binding assay for boar semen. *Theriogenology*, v.44, p.17-27 1995.
42. FAZELLI, A.R.; STEENWEG, W.; BEVERS, M.M.; BRACHER, V.; PARLEVLIET, J.; COLENBRANDER B. Use of sperm binding to homologous hemizona pellucida to predict stallion fertility. *Equine Vet. J. Suppl.*, v.15, p.57-59, 1993a.

43. FERREIRA, F. M. Functional aspects of porcine sperm binding to the zona pellucida using the hemizona assay. 1998. 77 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Escola Superior de Medicina Veterinária de Hannover, Alemanha, 1998.
44. FONSECA, JF. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia, GO. Anais... Belo Horizonte, MG: CBRA, 2005.
45. FONSECA, V.O.; VALE FILHO, V.R.; MIES FILHO, A.; ABREU, J.J. Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte: Editora Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1992. 79p.
46. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Production yearbook. Roma: FAO, 2003. v.57.
47. GADEA, J.; MATÁS, C.; LUCAS, X. Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (hIVP) assay. *Animal Reproduction Science*, v. 56, p. 95-108, 1998.
48. GIBBONS, A. Inseminacion artificial con semen congelado en cabras da raza angora. *Rev. Taurus*, v.4(16), p.24-32, 2002.
49. GILL, S. P. S.; DONOGHUE, A. M.; HOLSBERGER, D. R.; AMANN, R. P.; HULET, R. M. Identifying potentially subfertile tons via a sperm-binding assay. *Poultry Science*, v. 78, p. 1208-1218, 1999.
50. GRANADOS, L.B.C.; DIAS, A.J.B.; SALES, M. P. Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos. Campos dos Goytacazes-RJ: Proj. Proex/UENF, 2006. 54p.
51. GREEN, D.P.L. Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Reviews of Reproduction*, v.2, p.147–156, 1997.
52. GUTHRIE, H. D.; LIU, J.; CRITSER, J. K. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v. 67, n. 6, p. 1806-1811, 2002.
53. HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Reprodução animal. Barueri, SP: Manoele, il.; Tradução de: *Reproduction in farm animals*. 2004.
54. HAY, M.A.; KING, W.A.; GARTLEY, C.J.; LEIBO, S.P.; GOODROWE, K.L. Canine spermatozoa – cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology*, v.48, p.1329-1342, 1997.

55. HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. The canine oocyte penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoal performance in vitro. *Anim. Reprod. Sci.*, v.50, p.123–39, 1997.
56. INOUE N; IKAMA M; ISOTANI A; OKABE M The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*. v.434, p.234-237, 2005.
57. INSTITUTO Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Produção pecuária municipal. Rio de Janeiro: IBGE, 2006. v.48, p.62
58. JANUSKAUSKAS, A.; HAARD, M.G.; HAARD, M.C.H.; SÖDERQUIST, L.; LUNDEHEIM, N.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Estimation of sperm viability in frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. *J. Vet. Med. Assoc.*, v.43, p.281-287, 1996.
59. JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. Canine and feline theriogenology, Philadelphia: W.B. Saunders, 2001.
60. KARATZAS, G.; KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S. et al. Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. *Theriogenology*, v.48, n.6, p.1049-1059, 1997.
61. KJAESTAD, H.; ROPSTAD, E.; ANDERSEN, B.K. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta Vet. Scand.*, v.34, p.299-303, 1993.
62. KUMI-DIAKA J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*, v.39, p.1279-1289, 1993.
63. KUNDU, C.N.; CHAKRABORTY, J.; DUTTA, P.; BHATTACHARYYA, D.; GHOSH, A.; MAJUMDER, G.C. Effect of dextrans on cryopreservation of goat cauda epididymal spermatozoa using a chemically defined medium. *Reproduction*. v.123, p.907–913, 2002.
64. LARSSON, K.; EINARSOON, S.; NICANDER, L. Influence of thawing diluents on viability, acrossome morphology, ultrastructure and enzyme release of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Vet. Scand*, v.17, p.83-100, 1976.
65. LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.113-141, 2000.

66. LECLERC, P.; de LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Rad. Biol.Med.* v.22, p.643-656. 1997.
67. LIANG, L.F.; GHAMOW, S.M; DEAN, J. Oocyte-specific expression of mouse ZP-2: developmental regulation of the zona pellucida genes. *Mol. Cell. Biol.*, v.10, p.1507-1515, 1990.
68. LIMA, A.J. 2008. Coleta, conservação de sêmen e inseminação artificial de caprinos e ovinos. <http://www.serratalhada.net/meioambiente/mostra.asp?noticia=noticia22.asp>
In: Acesso em 29 de janeiro de 2010.
69. LIMA, S.; MORAES, G.V.; MACEDO, F.A.F. Avaliação quali-quantitativa do sêmen de caprinos, coletado em diferentes épocas do ano. In: REUNIÃO ANUAL DA SBZ, 28, 1993. João Pessoa, PB. Anais... João Pessoa: SBZ, 1991. p.470.
70. MANUAL para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA, 1998. 49p.
71. MARTINS, L.F.; PEREIRA, M.C.B.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P.; SILVEIRA, T.S.; TORRES, C.A.A.; RODRIGUES, M. T.; BRAZ, V.B. Avaliação espermática e da concentração de proteínas solúveis no plasma seminal de bodes da raça Alpina em regime de monta controlada. *R. Bras. Zootec.*, v.35, n.4, p.1653-1659, 2006 (supl.).
72. MAYENCO-AGUIRRE, A.M.; PÉREZ CORTÉS, A.B. Preliminary results of hemizona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa. *Theriogenology*, v.50, p.195-204, 1998.
73. MIES FILHO, A. Inseminação artificial. Porto Alegre: Livraria Sulina, 1987. v.2.
74. MILLER D.J., MACEK MB. AND B.D. SHUR Complementary between sperm surface b-1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature*, v.357, p.589-593. 1992.
75. MIYADO, K.; YOSHIDA, K.; YAMAGATA, K.; SAKAKIBARA, K.; OKABE, M.; WANG, X.; MIYAMOTO, K.; AKUTSU, H.; KONDO, T.; TAKAHASHI, Y.; BAN, T.; ITO, C.; TOSHIMORI, K.; NAKAMURA, A.; ITO, M.; MIYADO, M.; MEKADA, E.; UMEZAWA, A. The fusing ability of

- sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. *Dev. Biol.*, v.105, nº35, p.1021-1026. September, 2008.
76. MORTILLO, S.; WASSARMAN, P.M. Differential binding of gold-labeled zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 to mouse sperm membrane compartments. *Development*, v. 113, p. 141–149. 1991.
 77. NOAKES, D.E.; PARKISON, T.J.; ENGLAND, G.C.W. *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 8^a. ed. London: Saunders, 2001. 868 p.
 78. NUNES, J. Etude des effets du plasma séminal sur la survie in vitro des spermatozoides de bouc., 33f. These de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie. Paris. 1982.
 79. OETTLÉ, E.E. Sperm morphology and fertility in the dog. *J Reprod Fertil Suppl*, n.47, p.257-260, 1993.
 80. OETTLÉ, E.E.; SOLEY, J.T. Infertility in a malttese poodle as a result of a sperm midpiece defect. *J S Afr Vet Assoc*, v.56, p.103-106, 1985.
 81. OETTLÉ, E.E.; SOLEY, J.T. Sperm abnormalities in the dog: a light and electron microscopic study. *Vet Med Rev*, v. 59, p. 28-70, 1988.
 82. OLAR, T.T. Cryopreservation of dog spermatozoa. Thesis (PhD) - Colorado State University, Fort Collins, 1984.
 83. PAPA, F.O., ZAHN, F.S., DELL'AQUA Jr., et al. Utilização do diluente MP50 para criopreservação de sêmen equino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v. 26, p. 184-191, 2002.
 84. PELLICER-RUBIO, M.T.; MAGALLON, T.; COMBARNOUS, Y. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biol. Reprod.*, v.57, p.1023–1031, 1997.
 85. PEÑA MARTINEZ, A.I. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim. Reprod. Sci.*, v.82-83, p.209-224, 2004.
 86. PEÑA, A.I. Flow cytometry in the assessment of fresh and frozen-thawed dog semen, and the effects of different cryopreservation methods on post-thaw sperm survival and longevity. 2000. 86f. Thesis (Doctorat) – Swedish University of Agriculture Sciences, Uppsala, 2000.
 87. PEÑA, A.I.; BARRIO, F.; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P.G. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrossomal integrity. *Theriogenology*, v.50, p.163-174, 1998.

88. PURDY, P.H. The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48h at 5°C prior to cryopreservation, *Anim. Reprod. Sci.*, v.93, p.114–123, 2006.
89. PURSWELL, B.J.; LTHOUSE, G.C.; ROOT, M.V. Guidelines for using the canine breeding soundness evaluation form. In: Annual Meeting of the Society for Theriogenology, 1992, Montgomery, AL. Proceedings ... Montgomery, AL: Society for Theriogenology, 1992. p.174-181.
90. REIS, G.R. Avaliação de machos suínos: sensibilidade ao resfriamento e capacidade de ligação espermática a um substrato sintético. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2002.
91. Reis, G.R.; Bernardi, M.L.; Wentz, I.; Bortolozzo, F.P.;
92. RINGUETE, M.J.; SOBIESKI, D.A.; GHAMOW, S.M; DEAN, J. Oocyte-specific gene expression: molecular characterization of a DNA codin for ZP-3, the sperm receptor of the mouse zon pellucida. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, v.83, p. 4341-4345, 1986.
93. RITAR, A.J.; SALAMON, S. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.*, v.35, p.305–312, 1982.
94. RODRIGUES, B.A. Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina (BSA) sobre a viabilidade in vitro do sêmen canino criopreservado. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 1997. 176p.
95. RODRIGUES, B.A.; SANTOS, L.C.; RODRIGUES, J.L. Embryonic development of in vitro matured and in vitro fertilized dog oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, v.67, p.215–223, 2004.
96. ROTA, A; IGUER-OUADA, M; VERSTEGEN, J.P.; LINDE-FORSBERG, C. Fertility after vaginal or intrauterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without Equex STM paste. *Theriogenology*, v.51, p.1045-1058, 1999.
97. ROVAY, H. Efeitos de diferentes curvas de resfriamento, tempos de equilíbrio e crioprotetores permeáveis no congelamento de espermatozóides de caprinos. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2006. 73p.
98. ROY A. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper’s gland of the goat. *Nature*, v.179, p.318–319. 1957.

99. SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction. Science*, v.37, p.185–249, 1995.
100. SANCHEZ-PARTIDA, L.G.; WINDSOR, D.P.; EPPLESTON, J.; SETCHELL, B.P.; MAXWELL, W.M. Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. *J. Androl.*, v.20, p.280-288, 1999.
101. SEAGER, S.W.J.; FLETCHER, W.S. Progress on the use of frozen semen in the dog. *Vet. Rec.*, v.92, p.6-10, 1972.
102. SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Quality of canine semen submitted to single or fractioned glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*, v.59, p.821-829, 2003.
103. SINGER, S.J.; NICHOLSON, G.L. Fluid mosaic model of structure of cell-membrane. *Science*, v.175, p.720–731, 1972.
104. SINHA, S.; DEKA, B.C.; BORGOHAIN, B.N.; TAMULI, M.K. Study on freezing of goat semen in skim milk extender with different glycerol levels and equilibration periods. *Indian Journal of Animal Sciences*, v.13, n.1, p.38-41, 1992.
105. SINOWATZ, F.; WESSA, E.; NEUMÜLLER, C.; PALMA, G. On the species specificity of sperm binding and sperm penetration of the zona pellucida. *Reprod. Dom. Anim.*, vol. 38, p. 141-146, 2003.
106. SIQUEIRA, A.P. Inseminação artificial em caprinos com sêmen resfriado. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, 2006. 106 p.
107. SMITH A.H.; POLGE C. Survival of spermatozoa at low temperatures. *Nature (London)*, v.166, p.668-671, 1950.
108. STOREY, B.T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol. Human Reprod.* v.3, p. 203-213. 1997.
109. STRÖM HOLST, B.; LARSSON, B.; RODRIQUEZ-MARTINEZ, H.; LAGERSTEDT, A.S.; LINDE-FORSBERG, C. Zona pellucida binding-assay: a

- method for evaluation of canine spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v.57, p.137–140, 2001.
110. STRÖM, B.; ROTA, A.; LINDE-FORSBERG, C. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology*, v.48, p.247-256, 1997.
 111. TALBOT, T.L.; CHACON, R.S. A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J. Exp. Zool*, v.215, p.201-208, 1981.
 112. TARDIF, S.; LAFOREST, J.P.; CORMIER, N.; BAILEY, J.L. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology*, v.52, p.447-459, 1999.
 113. TOPFER-PETERSEN, E.; PETROUNKINA, A. M.; EKHLASI-HUNDRIESER, M. Oocyte–sperm interactions. *Animal Reproduction Science*, v. 60–61, p. 653–662, 2000.
 114. TRALDI, A. S. Biotécnicas Aplicadas em Reprodução de Pequenos Ruminantes. In: FEINCO 3, 2006.
 115. TWIGG, J.; FULTON, N.; GOMEZ, E.; IRVINE, D.S.; AITKEN, R.J. analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Human Reprod.* v.13, p.1429-1436, 1998.
 116. WASSARMAN, P.M. Regulation of mammalian fertilization by zona pellucida glycoproteins *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v.42, p.79–87, 1990.
 117. WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p.482-492, 2000.
 118. WEITZE, K.F.; AMANN, R.; KELLERS, C.; ZEMMRICH, J. Fertilidade de sêmen suíno avaliada pelo teste de ligação dos espermatozoides a um substrato sintético, *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v. 38, n. 11, p. 1343-1349, nov. 2003

119. YAMASHIRO, H.; WANG, H.; YAMASHITA, Y.; KUMAMOTO, K.; TERADA, T. Enhanced freezability of goat spermatozoa collected into tubes containing extender supplemented with bovine serum albumin (BSA). *J. Reprod. Devel.* v.52, p.407-414, 2006.