

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**INFLUÊNCIA DA REMOÇÃO DO PLASMA SEMINAL NA CRIOTOLERÂNCIA  
DO SÊMEN OVINO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LUCAS DALLE LASTE DACAMPO

Uruguaiiana, RS, Brasil

2019

**LUCAS DALLE LASTE DACAMPO**

**INFLUÊNCIA DA REMOÇÃO DO PLASMA SEMINAL NA CRIOTOLERÂNCIA  
DO SÊMEN OVINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dra. Daniela dos Santos Brum

Co-orientador: Prof. Dr. Lucio Pereira Rauber

**Uruguiana**

**2019**

**LUCAS DALLE LASTE DACAMPO**

**INFLUÊNCIA DA REMOÇÃO DO PLASMA SEMINAL NA CRIOTOLERÂNCIA  
DO SÊMEN OVINO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Reprodução e Produção Animal.

Dissertação defendida e aprovada em 06 de dezembro de 2019.

Banca examinadora:

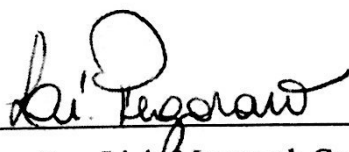


---

Dra. Daniela dos Santos Brum

Orientadora

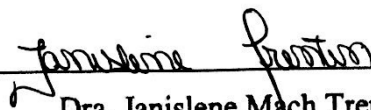
Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA



---

Dra. Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA



---

Dra. Janislene Mach Trentin

Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

## AGRADECIMENTOS

Ao nosso Pai celestial, Deus, pela vida e pela criação perfeita que temos o privilégio de desfrutar neste plano.

A minha amada família. Meus pais Leocir e Cláudia, dupla imbatível, grandes instrutores na escola da vida, obrigado por todo amor e incentivo. Meus irmãos Bianca e Cristiano pelo companheirismo e lealdade. Minha companheira Anna Carolina, por ter me apoiado nesse período mesmo distante. Muito obrigado por todo amor e dedicação.

Aos meus orientadores, Daniela Brum e Lucio Rauber, pessoas que admiro muito, obrigado por terem aceitado esse desafio e por fazerem parte da minha formação profissional. Agradeço todos os conselhos e ensinamentos, as discussões e o olhar crítico diante dos acontecimentos a nossa volta. Aos professores Fabio Leivas, Francielli Cibin e Débora Pellegrini pelo auxílio constante em todas as etapas do curso e por compartilharem seus conhecimentos.

Aos colegas Jéssica Ferreira, Natan Carvalho, Vanessa Buss, Daniele Missio, Cecilia Pavin, Hirya Pinto, Julia Helena, Gabriel Maggi, Marco Alves e tantos outros que de alguma maneira colaboraram com dedicação e entusiasmo para a concretização desse trabalho.

A Jade Pellenz e Bruna Parodes, obrigado por todos os momentos de descontração e partilha em nossa casa.

A Unipampa, ao PPG Ciência Animal e Laboratório Biotech por terem me acolhido. Aos demais professores, técnicos e alunos que dividiram conhecimento e vivência.

Aos colaboradores, Cabanha Santa Angela, Frigorífico Coxilha Vermelha, Instituto Federal Catarinense, EMBRAPA e UNOESC.

A Pro Reitoria de Pesquisa, Pós Graduação e Inovação e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Muito obrigado!!

*“In the long history of humankind (and animal kind too) those who learned to collaborate and improvise most effectively have prevailed”*

*Charles Darwin*

## RESUMO

A técnica de criopreservação permite a formação de bancos genéticos e a comercialização de gametas e embriões em diferentes espécies. Porém, o sêmen criopreservado ovino quando utilizado na inseminação artificial cervical ou por laparoscopia apresenta resultados insatisfatórios, como baixo índice de prenhez, alto custo e falta de mão de obra especializada. Diante disso, são necessárias algumas alternativas para diminuir as injúrias a essas células, como a retirada do plasma seminal, que já é uma prática comum em outras espécies. O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência do plasma seminal na qualidade espermática durante a criopreservação de sêmen ovino. O ejaculado de quatro carneiros foi coletado e avaliado quanto ao volume, cor, aspecto e motilidade. Posteriormente, foi realizado um pool com os ejaculados e dividido em três grupos: Controle (GC) onde o sêmen foi diluído de maneira tradicional, Sem Plasma Seminal (SPS) no qual o sêmen foi centrifugado a 4000 x g por 10 minutos para a remoção do plasma, e Controle Centrifugado (CC) em que o sêmen foi centrifugado porém não teve seu plasma retirado. O sêmen foi diluído em diluente comercial (OptiXcell™, IMV medium), envasado em palhetas de 0,25 mL em concentração final de  $400 \times 10^6$  espermatozoides/mL, sendo as palhetas resfriadas a 5°C por 2 horas, posteriormente expostas ao vapor de nitrogênio por 15 minutos e estocadas a -196°C. Após a criopreservação as palhetas foram descongeladas a 37°C por 20 segundos e as seguintes avaliações foram realizadas: cinética espermática, integridade de membrana plasmática e acrossomal, viabilidade mitocondrial, fragmentação de DNA, morfologia espermática, estresse oxidativo e capacidade fecundante. O grupo CC foi inferior aos grupos GC e SPS quanto a motilidade total e progressiva (P= 0,05), espermatozoides rápidos (P=0,05) e lentos (P=0,03). A integridade acrossomal foi superior no grupo SPS (P=0,05) quando comparada aos grupos CC e CG. Portanto, a remoção do plasma seminal não influenciou a qualidade do sêmen de carneiro. A cinética espermática não foi afetada e o grupo SPS preservou a integridade da membrana acrossomal durante a criopreservação, no entanto, não incrementou a capacidade fecundante dos espermatozoides.

**Palavras-chave:** Espermatozoide, carneiro, CASA, citometria de fluxo.

## ABSTRACT

Semen cryopreservation technique has allowed the formation of genetic banks and the commercialization of gametes and embryos in different species. However, sheep cryopreserved semen when used in a cervical artificial insemination or laparoscopy presents unsatisfactory results, such as low pregnancy rate, high cost and lack of specialized labor. Given this, some alternatives are needed to reduce injuries to the cells, such as the removal of seminal plasma, which is already routine in other species. The aim of this study was to evaluate the influence of seminal plasma on semen quality during cryopreservation of sheep semen. The ejaculate of four ram was collected and evaluated for volume, color, appearance, motility. Subsequently, a pool with the ejaculates was performed and split into three groups: Control Group (CG) where semen was diluted in a traditional form, Without Seminal Plasma (WSP) in which semen was centrifuged at 4000 x g for plasma removal, and Centrifuged Control (CC) in which semen was centrifuged but not plasma withdrawn. Semen was diluted in commercial extender (Optixcell™ IMV medium), filled in 0.25mL straws at a final concentration of  $400 \times 10^6$  sperm / mL, and straws were cooled at 5 °C for 2 hours, then exposed to nitrogen vapor for 15 minutes and stored. at -196 °C. After cryopreservation the straws were thawed at 37 °C for 20 seconds and the following evaluations were performed: sperm kinetics, plasma and acrosomal membrane integrity, mitochondrial viability, DNA fragmentation, sperm morphology, oxidative stress and fecundating capacity. The CC group was inferior to the CG and WSP groups in total and progressive motility ( $P = 0.05$ ), fast ( $P = 0.05$ ) and slow motility ( $P = 0.03$ ). The acrosomal integrity was higher in the WSP group ( $P = 0.05$ ) when compared to the CG and CC. Therefore, the removal of seminal plasma did not influence the quality of ram semen. The sperm kinetics was not affected and the WSP group preserved the integrity of the acrosomal membrane during cryopreservation, however, did not increase the fecundating capacity of sperm.

**Keywords:** Sperm, ram, CASA, flow cytometry.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALH – Amplitude de deslocamento lateral da cabeça

BCF – Frequência de batimento flagelar cruzado

CASA - Computer Assisted Semen Analysis

CCO – Complexo cumulus oócito

CIV – Cultivo *in vitro*

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EO – Estresse oxidativo

FIV – Fecundação *in vitro*

FRAP – Poder antioxidante redutor férrico

FSH – Hormônio folículo estimulante

IVF – *In vitro* fertilization

IVM – *In vitro* maturation

LH – Hormônio luteinizante

LIN – Linearidade

MIV – Maturação *in vitro*

PBS – Solução Salina Fosfatada

PIV – Produção *in vitro*

PM – Motilidade progressiva

PS – Plasma seminal

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SCA – Sperm Class Analyzer



STR – Retilinearidade

TBARS – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCM-199 – Meio de cultivo celular 199

UF – Unidades de fluorescência

VAP – Velocidade média da trajetória

VCL – Velocidade curvilínea

VSL – Velocidade linear progressiva

## LISTA DE TABELAS

<b>Table 1.</b> Sperm kinetics (mean $\pm$ SD) of ram semen by Sperm Class Analyzer system immediately after thawed sperm of semen cryopreserved with seminal plasma (CG), centrifuged control (CC) and without seminal plasma (WSP).....	33
<b>Table 2.</b> Parameters (mean $\pm$ SD) of the reactive oxygen species (ROS), ferric reducing antioxidant power (FRAP) and thiobarbituric acid reactive species (TBARS). .....	34
<b>Table 3.</b> Plasma membrane integrity (mean $\pm$ SD), acrosome integrity, DNA integrity and mitochondrial activity from cryopreserved ram semen (CG), centrifuged control (CC) and without seminal plasma (WSP).....	35
<b>Table 4.</b> Percentages (mean $\pm$ SD) of normal fertilization (NF), normal penetration (NP), polyspermic penetration (PP), penetration and fertilization normal (PF) for in vitro matured oocytes. ....	36

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1. Plasma Seminal.....	14
2.2. Estresse Oxidativo.....	15
2.3. Capacitação Espermática .....	17
3 OBJETIVO .....	19
3.1 Objetivo geral .....	19
3.2 Objetivos específicos .....	19
4 ARTIGO CIENTÍFICO .....	20
1. ABSTRACT .....	21
2. INTRODUCTION .....	22
3. MATERIALS AND METHODS.....	22
3.1. Semen collection and processing .....	22
3.2. Sperm Evaluation .....	23
3.2.1. Sperm Kinetics .....	23
3.2.2. Morphology and Sperm Concentration.....	24
3.2.3. Flow Cytometry.....	24
3.2.4. Production of ROS.....	24
3.2.5. Lipid Peroxidation .....	25
3.2.6. Total Antioxidant Potential .....	25
3.3. Oocyte recovery and in vitro maturation (IVM).....	25

3.4. In Vitro Fertilization (IVF) .....	26
3.4.1. Fertilization rate.....	26
3.5. Statistical analysis .....	26
4. RESULTS .....	27
5. DISCUSSION.....	27
6. CONCLUSION.....	28
REFERENCES.....	30
5 CONCLUSÃO .....	37
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

## 1. INTRODUÇÃO

O rebanho ovino mundial conta com aproximadamente 1,2 bilhão de cabeças (“FAOSTAT”, 2017) e está em crescente expansão. Dentro dos núcleos genéticos o principal produto são os reprodutores, e a sua genética precisa ser disseminada para rebanhos multiplicadores e comerciais. O crescimento da inseminação artificial tem ocorrido paralelamente ao desenvolvimento da tecnologia para a utilização de sêmen criopreservado em ovinos. O uso de sêmen criopreservado ovino é baixo na inseminação artificial cervical e tem sido limitado a inseminação por laparoscopia por apresentar baixos índices de prenhez, custo elevado e falta de mão de obra (MAXWELL; SALOMON, 1993).

A criopreservação é uma técnica consolidada e amplamente utilizada para conservação de material genético por tempo indeterminado, porém alguns efeitos adversos da técnica causam lesões nas células. O processo de criopreservação associado ao descongelamento do sêmen induz modificações bioquímicas e funcionais na estrutura da membrana plasmática, promovendo a capacitação e reação precoce de acrossoma (SALAMON; MAXWELL, 1995). Lopes et al. (2006) relatam que a integridade de membrana é um fator relacionado com a motilidade e que a presença e concentração de proteínas específicas podem influenciar particularmente essa característica. Nesse sentido, Valcárcel et al (1997), constataram que o ponto crítico que limita o sucesso da criopreservação é a manutenção da integridade de membrana plasmática. As alterações da membrana plasmática causadas pelas injúrias da criopreservação alteram principalmente a disposição da bicamada lipídica da membrana plasmática (LEBOEUF; RESTALL; SALAMON, 2000), tornando-a mais susceptível ao choque térmico, desbalanço osmótico e o efeito citotóxico de crioprotetores, resultando em baixa viabilidade do sêmen ovino congelado.

Em mamíferos, a presença de plasma seminal proveniente das glândulas acessórias junto aos espermatozoides no ejaculado é fisiológica e desempenha funções diferenciadas em cada espécie. O plasma seminal é composto por proteínas e substâncias não proteicas, incluindo aminoácidos livres, monossacarídeos, lipídios, poliaminas, prostaglandinas e hormônios esteroides (KATILA; KARESKOSKI, 2006). É sabido que o plasma seminal tem importância conhecida, porém na criopreservação seu efeito ou de seus componentes ainda não foram totalmente elucidados, além de fatores externos que podem interferir sobre a célula espermática (DE GRAAF et al., 2008). A composição bioquímica do sêmen constituído de plasma seminal

varia por diversos fatores como a estação do ano e indivíduo, interferindo na qualidade das amostras criopreservadas com associação direta na repetibilidade de resultados nas taxas de concepção de fêmeas inseminadas em diversas espécies. Estudos identificaram componentes do plasma seminal e algumas frações de proteínas capazes de reverter o estado de capacitação causado pela exposição a baixas temperaturas (BARRIOS et al., 2000). Porém a exata função que as lipoproteínas do plasma seminal exercem sobre os espermatozoides, e se podem influenciar no processo de criopreservação, ainda é desconhecida (BARRIOS et al., 2000; HOLT; NORTH, 1988), incluindo o resfriamento e congelamento de sêmen na espécie ovina. Estudos com adição de plasma seminal exógeno ao sêmen ovino apresentaram maior proteção de membranas plasmáticas (MATA-CAMPUZANO et al., 2015). No entanto, a remoção do plasma demonstra resultados positivos sobre a cinética de sêmen refrigerado a 5°C, e integridade da membrana plasmática e acrossomal, sendo o plasma adicionado após o período de resfriamento (PAUL et al., 2018). Com base neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do plasma seminal na qualidade espermática durante a criopreservação de sêmen ovino.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Plasma Seminal

O plasma seminal (PS) é uma combinação de secreções dos testículos, epidídimos e glândulas acessórias do trato reprodutor masculino e tem função de transportar e fornecer nutrientes aos espermatozoides. Sua composição engloba eletrólitos, frutose, ácido ascórbico, enzimas e vitaminas, hormônios e fatores de crescimento, que variam entre animais e entre ejaculados do mesmo animal. Durante o período de armazenamento na cauda do epidídimo o espermatozoide possui motilidade e já apresenta capacidade fecundante (GARNER, 2004), isso até o momento da ejaculação, quando os espermatozoides e o PS passam a formar o ejaculado, descapacitando as células espermáticas (GADELLA; BOERKE, 2016; YANAGIMACHI, 1989). Relatos em várias espécies sugerem que PS tem influência na motilidade e capacidade de fecundação do espermatozoide (JOBIM et al., 2003; MAXWELL et al., 2007; MOURA et al., 2010), além de modular a resposta imune do trato reprodutivo da fêmea para tolerar os espermatozoides (ROBERTSON, 2007).

A função protetora do PS sob a célula espermática durante o congelamento, garantindo a viabilidade da mesma foi relatada por Maxwell et al., (2007). Moura e colaboradores (2010), relatam que ejaculados de animais com menor concentração de proteínas apresentam incremento na motilidade espermática após a descongelação, no entanto, maior concentração de proteínas demonstrou uma maior integridade de membrana plasmática.

Pursel & Johnson (1975) sugeriram que a separação do espermatozoide do plasma seminal após um breve período de incubação forneceu alguma proteção contra choque térmico ao frio. Moore and Hibbitt (1977) citaram que a presença do plasma durante a criopreservação prejudicou à qualidade dos espermatozoides. Estudos em equinos sugerem que algumas proteínas do plasma seminal induzem a capacitação dos espermatozoides após o processo de criopreservação, prejudicando o processo de fertilização. Protocolos com adição de plasma seminal ao ejaculado de garanhões mostraram-se ineficiente por ter que personalizar diferentes volumes para cada garanhão (AL-ESSAWE et al., 2018). Dessa forma se preconizou a retirada do plasma seminal na criopreservação de sêmen equino (BRINSKO; CROCKETT; SQUIRES, 2000). No entanto, a separação do mesmo não consegue remover todas as proteínas que

envolvem o espermatozoide (KRUSE; DUTTA; MORRELL, 2011), podendo ainda restar algum efeito no processo de criopreservação.

Relatos de sucesso na criopreservação de espermatozoides do epidídimo de Ibex (*Capra pyrenaica*) demonstraram maior resistência após descongelamento do que ejaculados com plasma seminal (GARCÍA-ALVAREZ et al., 2009; PRADIEE et al., 2014). Em ovinos as pesquisas demonstravam a importância do plasma seminal, e que a adição de plasma exógeno ao ejaculado apresentava resultados positivos (MATA-CAMPUZANO et al., 2015). No entanto, estudos recentes demonstram que a retirada do plasma seminal melhora significativamente a cinética, viabilidade e integridade de membrana plasmática e acrossomal quando o sêmen é armazenado entre 3 e 5°C, tendo resultados ainda melhores com a adição do plasma após o período de resfriamento (PAUL et al., 2018), sugerindo que o plasma seminal cause injúrias nas células espermáticas durante o processo de resfriamento.

## **2.2. Estresse Oxidativo**

O estresse oxidativo (EO) ocorre devido a um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas ao oxigênio (EROs) e os agentes antioxidantes (SIKKA, 2001; SIKKA; RAJASEKARAN; HELLSTROM, 1995). Algumas das espécies reativas, como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e o radical hidroxila ( $OH^-$ ) são produzidos naturalmente durante o metabolismo celular aeróbico e possuem pelo menos um elétron não pareado na última camada eletrônica, o que os tornam instáveis e altamente reativos (SHARMA; AGARWAL, 1996). O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) não é considerado um radical livre (HICKS-GÓMEZ, 2001) e já foi relatado como principal envolvido em danos de espermatozoides equinos (BAUMBER et al., 2000). O aumento exagerado de EROs agride as células, podendo levar à apoptose, dano ao DNA e lesão de membrana plasmática (AGARWAL; HAMADA; ESTEVES, 2012; PAUL; TENG; SAUNDERS, 2009). Os mecanismos descritos para o envolvimento do estresse oxidativo na apoptose seria através da oxidação dos componentes celulares como lipídios de membrana e DNA ou como fator desencadeante da ativação da apoptose, de forma indireta (ISHII et al., 2005; SHIRAIISHI; MATSUYAMA; TAKIHARA, 2012).

Os antioxidantes são compostos ou enzimas que inibem, diminuem ou são antagonistas aos efeitos dos EROs e protegem as células por meio de três mecanismos: interceptação,



prevenção e reparação. Os antioxidantes são divididos em enzimáticos (superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) e não enzimáticos (vitamina C e E, glutathione e albumina). Devido à perda de grande parte do citoplasma durante a diferenciação celular, as propriedades antioxidantes são eliminadas dos espermatozoides via gota citoplasmática, reduzindo sua capacidade de defesa responsável por neutralizar os EROs e consequente a peroxidação lipídica (BUCAK et al., 2007). O plasma seminal possui mecanismos de defesa antioxidante que de forma compensatória protege a célula espermática contra o EO (DONNELLY; MCCLURE; LEWIS, 1999; SIKKA, 1996).

As EROs desestabilizam a membrana plasmática dos espermatozoides e causam a perda da fluidez da membrana e aumento da permeabilidade, interferindo na motilidade e capacidade fecundante (BAUMBER et al., 2000). O aumento da permeabilidade da membrana proporciona o influxo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , esgotamento de ATP e ativação de proteases e fosfolipases que induzem o dano proteico e lipídico, alterações do DNA e eventualmente morte celular (AITKEN, 1999). A produção de EROs e os danos ao DNA são maiores em espermatozoides imaturos, causando retenção de gota citoplasmática e anormalidades morfológicas de cabeça (OLLERO et al., 2001).

A manipulação do sêmen também pode desencadear a produção de EROs (TREMELLEN, 2008), através de fatores mecânicos como a centrifugação realizada durante a separação espermática (IWASAKI; GAGNON, 1992; SHEKARRIZ et al., 1995) e fatores físicos como a criopreservação (BILODEAU et al., 2000). A criopreservação do sêmen é uma biotecnologia importante que permite a conservação de gametas por tempo indeterminado. No entanto, a exposição do sêmen ao oxigênio e o choque térmico favorecem as condições para a peroxidação lipídica (BUCAK; ATEŞŞAHIN; YÜCE, 2008).

Vários estudos tem sido realizados para elucidar os efeitos tóxicos do EROs presentes no sêmen (BANSAL; BILASPURI, 2010; TVRDÁ et al., 2011). No entanto, estudos sugerem que a capacitação espermática pode ser proveniente de um processo oxidativo, sendo necessário para que os espermatozoides adquiram capacidade fecundante (AITKEN, 1999; ALI; BILODEAU; SIRARD, 2003; FUNAHASHI; SANO, 2005). Contudo ainda não está bem elucidado o equilíbrio EROs/antioxidante, de maneira que possa ser positivo a manutenção dos oócitos e/ou prejudicial a fecundação dependendo da quantidade de EROs produzida (ALI;

BILODEAU; SIRARD, 2003; BLONDIN; COENEN; SIRARD, 1997; GONÇALVES et al., 2010).

### **2.3. Capacitação Espermática**

Ao completar a fase de espermatogênese as células espermáticas transitam da cabeça até a cauda do epidídimo, onde se tornam maduras e são armazenadas até o momento da ejaculação (TULSIANI; YOSHIDA-KOMIYA; ARAKI, 1997). Durante a maturação os espermatozoides adquirem motilidade, estabilização da cromatina nuclear e a incorporação de proteínas, açúcares e lipídios na membrana plasmática (GRAHAM, 1994). No epidídimo os espermatozoides estão aptos a fecundar e ao receberem o plasma seminal durante a ejaculação tornam-se decapitados. Esse processo é fisiologicamente importante para que o espermatozoide tenha longevidade (GADELLA; BOERKE, 2016) no trato reprodutivo. A ligação de proteínas secretadas pelo epidídimo e glândulas acessórias estão envolvidas na ligação do espermatozoide com o oócito (GADELLA et al., 2001).

Mesmo apresentando motilidade e sendo morfológicamente normal após a ejaculação, os espermatozoides não possuem capacidade de fecundar o oócito (GARNER, 2004; YANAGIMACHI, 1994). A capacitação é o processo fisiológico que acontece no trato reprodutivo feminino quando o espermatozoide, através de alterações estruturais e bioquímicas, torna-se capaz de fecundar o oócito (ABOU-HAILA; TULSIANI, 2000; PÉREZ et al., 1996).

Durante o processo de capacitação a membrana citoplasmática é desestabilizada levando ao aumento da fluidez e alterações da morfologia da membrana, aumentando o influxo de cálcio e pH interno. Ainda nessa fase o colesterol é perdido da célula junto com proteínas e alguns peptídeos, gerando um aumento da motilidade e hiperativação espermática (TÖPFER-PETERSEN; PETROUNKINA; EKHLASI-HUNDRIESER, 2000), além da reação do acrossoma (YANAGIMACHI, 1989). O efluxo de colesterol está relacionado a taxa de capacitação espermática. Enquanto espermatozoides humanos e bovinos requerem um período de 6 a 8 horas para capacitarem, espermatozoides de suínos e ovinos necessitam apenas 1 ou 2 horas para a capacitação (FLESCHE; GADELLA, 2000; YANAGIMACHI, 1994).

Vários estudos tem relatado mudanças semelhantes na capacitação em espermatozoides criopreservados (GREEN; WATSON, 2001; MAXWELL; WATSON, 1996; VALCÁRCEL et

al., 1997a). As células espermáticas contêm alta proporção de ácidos graxos poli-insaturados que são particularmente susceptíveis aos danos oxidativos, especialmente após a criopreservação. A composição lipídica da membrana do espermatozoide é o maior determinante para a sua viabilidade (BUCAK; ATEŞŞAHIN; YÜCE, 2008), e as lesões funcionais do processo de criopreservação promovem a redução da motilidade e transporte espermático no trato reprodutivo da fêmea (SALAMON; MAXWELL, 1995).

As lesões espermáticas causadas pelo congelamento promovem a prematura indução de um estado semelhante de capacitação, a criocapacitação (BAILEY; BILODEAU; CORMIER, 2000). A criocapacitação do espermatozoide altera a motilidade, a viabilidade e posteriormente a sua longevidade (MAXWELL; JOHNSON, 1999), resultando em menores taxas de prenhez quando o sêmen congelado é usado. A manipulação no processamento do sêmen permite situações de estresse, como exposição da célula ao frio, estresse osmótico, toxicidade do crioprotetor e formação de gelo extracelular (WATSON, 2000). Há indícios que espermatozoides congelados estão associados a alta incidência de mortalidade embrionária precoce (SALAMON; MAXWELL, 1995).

Conseqüentemente, alternativas que preservem a viabilidade espermática após a criopreservação, a partir de ajustes nos protocolos de criopreservação, podem permitir que uma maior população de espermatozoides viáveis atinja o oócito, com possibilidades de melhora nas taxas de prenhez e aplicabilidade da técnica.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a influência do plasma seminal na qualidade espermática durante a criopreservação de sêmen ovino.

#### 3.2 Objetivos específicos

Avaliar o(a):

Impacto da remoção do plasma seminal durante a criopreservação de sêmen ovino na cinética espermática pós descongelamento;

Efeito da remoção do plasma seminal durante a criopreservação de sêmen ovino na morfologia espermática pós descongelamento;

Eficácia da remoção no plasma seminal durante a criopreservação no estresse oxidativo e defesas antioxidantes de espermatozoides;

Importância da remoção do plasma seminal durante a criopreservação de sêmen ovino na integridade das membranas dos espermatozoides;

Influência da remoção do plasma seminal durante a criopreservação de sêmen ovino na capacidade fecundante *in vitro*.

#### 4 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. As seções *Material e Métodos*, *Resultados*, *Discussão* e *Referências Bibliográficas* encontram-se no próprio manuscrito, que está apresentado da mesma forma que será submetido ao periódico *Cryobiology*.

## 1. ABSTRACT

The scope of this study was to investigate the influence of seminal plasma of ram semen on sperm quality during cryopreservation of ram semen. Fresh ejaculates from 4 rams were collected by artificial vagina, evaluated individually, diluted 1:1 (v:v) in extender and mixed in equal quantities and split into three groups. One group (CG) was diluted by the traditional method. The CC and WSP groups were centrifuged at 4000 x g for 10 min. The CC group had the pellet resuspended in its own the seminal plasma and the WSP group had the seminal plasma removed and the volume replaced with PBS. Samples from all groups were filled in 0.25mL straws at a concentration of  $400 \times 10^6$  sperm/mL in OptiXcell extender. The straws were refrigerated at 5°C for 2 hours, frozen in liquid nitrogen vapor for 15 minutes and immersed in liquid nitrogen. After thawing, sperm kinetics were evaluated by CASA, plasma and acrosomal membrane integrity, mitochondrial activity and DNA fragmentation were determined by flow cytometry, sperm morphology using the wet slide method, biochemistry through ROS, FRAP and TBARS and fertilization rate by staining under fluorescence microscopy (mean  $\pm$  SD). Our studies showed that the removal of seminal plasma preserved the acrosomal membrane ( $P < 0.05$ ), the other parameters were not influenced by the treatment. However, removal of seminal plasma did not improve semen quality and did not justify the use of sperm separation in sheep.

Keywords: Sheep, seminal plasma, cryopreservation, acrosomal integrity, CASA, flow cytometry.

## **2. INTRODUCTION**

Semen cryopreservation for long periods is a great tool among reproductive biotechniques, being an efficient method of maximizing the use of genetic material, aiming to preserve the fecundating capacity of thawed sperm. However, manipulation of ram semen, collection, dilution, cooling and freezing results in irreversible injury to post-thawed sperm [1]. Physical and chemical changes eventually disrupt sperm membrane organization, causing damage at the cellular level. Membrane damage associated with cryocapacitation significantly impair sperm, making it unviable for cervical insemination [2,3].

The spermatozoa mixes with the seminal plasma at the time of ejaculation and forms the ejaculate, which has the function of protecting and nourishing sperm. Seminal plasma components are incorporated into the sperm membrane and form an external shield, promoting sperm decapacitation [4], that prevents the fertilization but protect them from reproductive tract injuries. In the female reproductive tract, plasma does not follow sperm along the pathway toward the oocyte, which allows for physiological empowerment by conferring fecundating capacity on the sperm [5,6].

However, in some species the seminal plasma has a negative effect during cryopreservation, as already reported in boar [7,8], stallion [9] and goats [10] and is separated of sperm for storage. In small wild ruminants, epididymal semen cryopreservation was superior than whole ejaculates [11,12]. Paul et al. [13] showed that storage of ram semen at 5°C for 72 hours after removing seminal plasma preserved acrosomal integrity and capacitated less sperm., This study aimed to analyze the effect of seminal plasma withdrawal before freezing ram semen, to verify the role of seminal plasma on cryopreservation.

## **3. MATERIALS AND METHODS**

### **3.1. Semen collection and processing**

This project was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals of the Federal University of Pampa (protocol number: 038/2018). All chemicals used in this study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) except for the OptiXcell™ extender (IMV Technologies, L'Aigle, France).

The experiment was carried out in Uruguaiiana, Rio Grande do Sul, Brazil (S: 29° 44 ' 58", W: 57° 5' 18") during the spring. After general physical and breeding soundness examination, one Merino and three Ideal rams with proven fertility were used. The semen was collected twice a week with artificial vagina (four collections). After collection, the ejaculates were evaluated for aspect, volume and gross motility and diluted in extender 1:1(v.v). A sample of 500µL of each ejaculate was used to form a pool and shared into three groups; Control Group (CG), Centrifuged Control (CC) and Without Seminal Plasma (WSP).

The CC and WSP were centrifuged in a mini centrifuge (Cientec 14000, Brazil) at 4000 x g for 10 minutes at room temperature. The pellet formed in the CC was resuspended in itself supernatant. The WSP's supernatant was carefully removed and the volume thereof replaced with PBS. The CG group did not undergo any treatment.

All groups had the concentration adjusted to  $400 \times 10^6$  sperm/mL by adding commercial extender OptiXcell™ (IMV Technologies, L'Aigle, France). The samples were filled in 0.25 mL straws (IMV Technologies, L'Aigle, France). All samples were cooled to 5° C for 2 hours and then frozen in liquid nitrogen vapor for 15 minutes, 5 cm above the nitrogen level and after being immersed in liquid nitrogen [14].

### **3.2. Sperm Evaluation**

To evaluate the frozen / thawed semen, two straws from each group were thawed in a water bath by electronic thaw at 37°C for 20 seconds.

#### **3.2.1. Sperm Kinetics**

The sperm kinetics was evaluated by the Computer Assisted Semen Analysis (CASA) system fitted with the Sperm Class Analyzer (SCA) software (Version 5.1; Microptic, Barcelona, Spain). The software configurations were adjusted for ram sperm. The settings used for the sperm image analyses were as follow: the spermatic head dimensions between 18 and 60 µm<sup>2</sup>, slow sperm between 10 and 45 µm/s, average sperm between 45 and 75 µm/s and rapid sperm above 75 µm/s. Spermatozoa presenting straightness (STR) above 80% were considered progressive [15,16]. Between the following parameters were analyzed: Rapid, medium and slow sperm, total motility (TM; %), progressive motility (PM; %), straight-line velocity (VSL;



$\mu\text{m/s}$ ), curvilinear velocity (VCL;  $\mu\text{m/s}$ ), average path velocity (VAP;  $\mu\text{m/s}$ ), straightness (STR; %), linearity (LIN; %), amplitude of lateral head displacement (ALH;  $\mu\text{m}$ ), tail beat frequency (BCF; Hz), and percentage of sperm with rapid movement (Hyperactivity; %).

### **3.2.2. Morphology and Sperm Concentration**

An aliquot of semen was fixed (1:20) in formaldehyde 4%. The sperm morphology was analyzed at  $1000\times$  magnification in a stained glass slide with Bengal Rose coating a total of 200 cells/group/replicate and was assessed the proportion of abnormal forms in each sample based on a method described by Barth and Oko [17]. The sperm concentration was determined by Neubauer chamber under a 400x magnification optical microscope. Spermatozoa in 10 of the 25 squares ( $0.04\text{mm}^2$ ) and the results were converted to a concentration in sperm per mL by multiplying the number of sperm counted by  $0.5\times 10^6$ .

### **3.2.3. Flow Cytometry**

Plasma membrane integrity, acrosomal reaction, mitochondrial activity, and DNA integrity analyzes were performed on 10.000 cells from all samples using a flow cytometer BD Accuri<sup>TM</sup>C6 (Becton & Dickson, Santiago, Chile) coupled to an excitation source (488 nm) and three light filters (FL-1:  $3533\pm 30$  nm; FL-2:  $585\pm 40$  nm; FL-3:  $675\pm 25$  nm). Plasma membrane damage (PMD) was determined using propidium iodide staining (PI; Sigma,  $10\ \mu\text{g/mL}$ ). Acrosome damage rate (AD) was evaluated using FITC – PSA (FITC-conjugated lectin from *Pisum sativum*, Sigma  $1.25\ \mu\text{g/mL}$ ). The mitochondrial activity was analyzed using rhodamine 123 as a probe (Rhodamine; Sigma  $1\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Sperm chromatin integrity DNA assay was carried out using acridine orange (Sigma; [18]).

### **3.2.4. Production of ROS**

ROS levels were measured by a spectrofluorimetric method [19] where the sperm are incubated in Tris–HCl in the presence of 2',7'-dichloro dihydrofluorescein diacetate (DCHF-DA) for 60 min at  $37^\circ\text{C}$ . This dye is a fluorogenic probe commonly used to detect cellular ROS production. DCHF-DA is a stable, cell-permeable nonfluorescent probe. It is de-esterified

intracellularly and becomes the highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) upon oxidation. The oxidation of DCHF-DA to fluorescent dichlorofluorescein was used to detect and measure the intracellular ROS. The DCF fluorescence intensity emission was recorded at 520 nm (with 480 nm excitation) using a Shimadzu spectrofluorometer (model RF5301PC, Japan). ROS levels were expressed as arbitrary units of fluorescence (UF).

### **3.2.5. Lipid Peroxidation**

Lipid peroxidation was performed by the formation of thiobarbituric acid reactive substances during an acid-heating reaction as previously described by Ohkawa et al [20]. An aliquot of sperm cells was incubated at 95°C for 2h. The absorbance was read at 532nm (HidexPlate Chameleon VMultitechnology Platereader, model425–156). The data were expressed as nmol malondialdehyde (MDA)/mg protein

### **3.2.6. Total Antioxidant Potential**

The total antioxidant potential (FRAP) was determined by the semen and tissue antioxidant potential. In this assay, the antioxidants present in the sample are evaluated as reducers from Fe<sup>+3</sup> to Fe<sup>+2</sup>, which is chelated by 2,4,6-Tri (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) to form the Fe<sup>+2</sup> -TPTZ with maximum absorption at 593 nm [21].

## **3.3. Oocyte recovery and in vitro maturation (IVM)**

Ovine ovaries were obtained at the slaughterhouse and transported to the laboratory in physiological saline (0.9%) with antibiotics (100IU/mL penicillin and 100mg/mL streptomycin) at 30°C. Cumulus oocyte complexes (COCs) from 3 to 5mm diameter follicles were aspirated with a vacuum pump (vacuum rate of 20mL of water/min). The COCs were recovered and only oocytes with homogenous ooplasm and intact cumulus layers were selected for further processing. Groups of COCs were transferred to 3 well plates containing 400 µL of modified TCM-199 media with 20% of inactivated serum of sheep in estrous (Biotech, Uruguaiana, RS, Brazil) to IVM. This medium was supplemented with 5µg/mL of porcine follicle stimulating hormone, NIH-FSH-P1 (Folltropin-V®, Bioniche Animal Health, Ontario, Canada), 5µg/mL of porcine pituitary luteinizing hormone, LH-P (Lutropin-V®, Bioniche

Animal Health), and 22 µg/mL of pyruvate and gentamicin. For IVM, the COCs were cultured for 24 h at 39°C in a gaseous atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> and saturated humidity.

### **3.4. In Vitro Fertilization (IVF)**

After sperm processing and analyses, the semen was used for IVF. Droplets containing 80µL of SOF [22] with no amino acids 2% of inactivated serum of sheep in estrous and 10 µg/mL pyruvate were prepared in 30×10 mm dishes (Corning Incorporated Life Sciences), under mineral oil, for COCs fertilization with 2×10<sup>6</sup> sperm/mL. The sperm and oocyte co-culture was performed at 39°C with saturated humidity and a gaseous atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air.

#### **3.4.1. Fertilization rate**

Fertilization rate was evaluated after 18 h of co-incubation of the oocytes and spermatozoa. For the evaluation, potential zygotes were stripped and stained with 15 µg/mL bisbenzimidazole (Hoechst 33342; Life Technologies, Japan) in PBS. Images of the potential zygotes were examined under an epifluorescence microscope at 400x magnification with the excitation wavelength at 365 nm and the emission wavelength at 410 nm. As described by Guimaraes et al (2014), we considered the normal fertilization rate when the oocytes with only two pro nuclei or fused nuclei, penetration rate when the oocyte has one sperm head or descondensation head inside, polyspermy was considered when the oocyte had more than two pro nuclei or two pro nuclei more a penetration sperm.

### **3.5. Statistical analysis**

SPSS software version 20 (IBM, Armonk, NY, USA) was used for performing the statistical analyses. The normality of the tests was analyzed with the Shapiro-Wilk tests. The effects on sperm characteristics, spermatic concentration, membrane integrity, acrosome integrity, mitochondrial membrane potential, DNA integrity, ROS production, lipid peroxidation, total antioxidant potential and fertilization rate were evaluated by means of the

test non-parametric Friedman followed by Wilcoxon-related test samples. Results are reported as means  $\pm$  standard deviation (SD). Values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

#### **4. RESULTS**

Results the post-thaw sperm kinetics are shown in Table 1. Removal of seminal plasma (WSP) did not influence progressive motility when compared to the Control group (CG), however the centrifuged control (CC) was lower than WSP and CC. The same was repeated for progressive motility and slow sperm. In the other parameters evaluated (Rapid and medium sperm, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, BCF and Hyperactivity) no difference was observed among the groups.

In the sperm morphology and biochemical tests, ROS production, FRAP and TBARS not differ between groups ( $P > 0.05$ ; Table 2). The acrosomal integrity in the WSP group was higher than others, but the CG and CC had no statistical difference (Table 3). Fertilization rates were similar in all groups ( $P > 0.05$ ; Table 4).

#### **5. DISCUSSION**

Freezing semen storage is a positive alternative for long periods. The main changes are related to motility and integrity of plasma and acrosomal membrane. Even sperm suffering from cold damage during the time they are kept frozen, no structural and physiological changes occur and may suffer less significant damage than when refrigerated at 4°C, as shown by Falchi [24]. Motility is the first evaluation in semen collection and post-thawing and is associated with sperm velocity to determine the progressive number of sperm [13]. According to our study, there were no difference in total motility and progressive motility, fast and slow sperm between CG and WSP. However, when looking at only CC and WSP groups, the statistical difference may be justified by centrifugation associated with seminal plasma, because, EROs and antioxidants were removed together from seminal plasma in the WSP and the same antioxidant concentration was added in both groups by the diluent. This finding can be explained by oxidative stress resulting from centrifugation providing increased ROS concentration impairing motility and velocity sperm [25,26]. Different from that reported for Souza [15], in these

experiment, the Optixcell™ extender satisfactory preserved the sperm kinetics, showing a higher number of fast sperm compared to medium and slow sperm, even in the non-centrifuged group and can be used in sheep without causing damage to sperm. The percentage of hyperactive spermatozoon and VCL do not differ between groups, but the values demonstrate the effect of cryocapacitation as also shown by Gogol [27].

Plasma membrane integrity was not different among groups. Similar data were reported using different extenders during semen cooling and freezing [13,24,28,29]. Our finding showed in the membrane evaluation that the acrosome was less sensitive in WSP, preserving the largest number of intact cells ( $P < 0.05$ ). Similar result with the removal of seminal plasma was found by Tabarez et al and Palomo et al [14,16] and with the addition of antioxidants [30]. Up to fifty percent cells exposed to freezing can suffer acrosome damage [29]. Centrifugation cannot completely remove seminal plasma from the sperm surface [31], but the total volume of seminal plasma in CG and WSP groups may not be beneficial and needs to be modulated as cited by Paul et al [13]. The percentages of intact acrosomes in all groups were higher than in other studies and may be related to the extensor [32,33].

This study was the first to test frozen semen without seminal plasma for *in vitro* fertilization rates of oocytes. The treatment did not impair *in vitro* fertilization capacity. The same fertilization rate was obtained by Ariu [34], using frozen semen with seminal plasma and a similar maturation and *in vitro* fertilization protocol with frozen semen.

## 6. CONCLUSION

This study shows that the quality of ram semen was not influenced by seminal plasma, which does not justify its removal. Although motility was not affected in the WSP group, and a higher number of sperm had intact acrosome, it did not provide increase in *in vitro* fertilization capacity.

### Conflicts of interest

The authors have no conflict to report.

## **Acknowledgements**

The authors thank Federal Pampa University, PROPPI and CAPES for funding the project.

## REFERENCES

- [1] S. Salamon, W.M. Maxwell, Storage of ram semen, *Anim. Reprod. Sci.* 62 (2000) 77–111. doi:10.1016/S0378-4320(00)00155-X.
- [2] S. Salamon, W.M.C. Maxwell, Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement, *Anim. Reprod. Sci.* 38 (1995) 1–36. doi:10.1016/0378-4320(94)01328-J.
- [3] B. Leboeuf, B. Restall, S. Salamon, Production and storage of goat semen for artificial insemination, *Anim. Reprod. Sci.* 62 (2000) 113–141. doi:10.1016/S0378-4320(00)00156-1.
- [4] B.M. Gadella, A. Boerke, An update on post-ejaculatory remodeling of the sperm surface before mammalian fertilization, *Theriogenology*. 85 (2016) 113–124. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.07.018.
- [5] L.J. Pérez, A. Valcárcel, M.A. De Las Heras, D. Moses, H. Baldassarre, Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay, *Theriogenology*. 46 (1996) 131–140. doi:10.1016/0093-691X(96)00148-3.
- [6] A. Abou-Haila, D.R.P. Tulsiani, Mammalian sperm acrosome: Formation, contents, and function, *Arch. Biochem. Biophys.* 379 (2000) 173–182. doi:10.1006/abbi.2000.1880.
- [7] V.G. Pursel, L.A. Johnson, Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure., *J. Anim. Sci.* 40 (1975) 99–102. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1110222> (accessed May 7, 2018).
- [8] H.D. Moore, K.G. Hibbitt, Fertility of boar spermatozoa after freezing in the absence of seminal vesicular proteins., *J. Reprod. Fertil.* 50 (1977) 349–52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/881673> (accessed May 7, 2018).
- [9] E.M. Al-Essawe, M. Wallgren, M. Wulf, C. Aurich, B. Macías-García, Y. Sjunnesson, J.M. Morrell, Seminal plasma influences the fertilizing potential of cryopreserved stallion sperm, *Theriogenology*. 115 (2018) 99–107. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2018.04.021.
- [10] B. Premrov Bajuk, T. Pihlar, N. Pogačnik, P. Klinc, Dialysis of the goat semen and its effect on the quality of frozen/thawed spermatozoa processed in the presence of egg yolk, *Anim. Reprod. Sci.* 198 (2018) 65–73. doi:10.1016/j.anireprosci.2018.09.001.
- [11] O. García-Alvarez, A. Maroto-Morales, F. Martínez-Pastor, J.J. Garde, M. Ramón, M.R. Fernández-Santos, M.C. Esteso, M.D. Pérez-Guzmán, A.J. Soler, Sperm characteristics and in vitro fertilization ability of thawed spermatozoa from Black Manchega ram: electroejaculation and postmortem collection., *Theriogenology*. 72 (2009) 160–8. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.02.002.
- [12] J. Pradiee, M.C. Esteso, C. Castaño, A. Toledano-Díaz, A. López-Sebastián, J. Santiago-Moreno, Cryopreservation of epididymal sperm from ibexes (*Capra pyrenaica*) using short equilibration time with glycerol, *Theriogenology*. 82 (2014) 525–528. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2014.05.012.
- [13] R.K. Paul, K. Balaganur, D. Kumar, S.M.K. Naqvi, Modulation of seminal plasma content in extended semen improves the quality attributes of ram spermatozoa following liquid preservation at 3-5°C, *Reprod. Domest. Anim.* (2018). doi:10.1111/rda.13227.
- [14] A. Tabarez, W. García, M.J. Palomo, Effect of the type of egg yolk, removal of seminal plasma and donor age on buck sperm cryopreservation, *Small Rumin. Res.* 149 (2017) 91–98. doi:10.1016/j.smallrumres.2017.01.007.
- [15] C.V. de Souza, F.Z. Brandão, J.D.R. Santos, V.A.P. Alfradique, V.M.B. dos Santos,

- M.C. da C. Morais, P.S.C. Rangel, A.A. da Silva, J.M.G. Souza-Fabjan, Effect of different concentrations of L-carnitine in extender for semen cryopreservation in sheep, *Cryobiology*. (2019). doi:10.1016/j.cryobiol.2019.05.009.
- [16] M.J. Palomo, W. García, A. Tabarez, Effect of seminal plasma and butylated hydroxytoluene (BHT) concentration on ram sperm freezability, *Small Rumin. Res.* 153 (2017) 66–70. doi:10.1016/j.smallrumres.2017.05.010.
- [17] A.D. Barth, R.J. Oko, Abnormal morphology of bovine spermatozoa., *Abnorm. Morphol. Bov. Spermatozoa.* (1989).
- [18] G.B. Boe-Hansen, I.D. Morris, A.K. Ersbøll, T. Greve, P. Christensen, DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay, *Theriogenology*. 63 (2005) 1789–1802. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2004.08.004.
- [19] C. Loetchutinat, S. Kothan, S. Dechsupa, J. Meesungnoen, J.-P. Jay-Gerin, S. Mankhetkorn, Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay, *Radiat. Phys. Chem.* 72 (2005) 323–331. doi:10.1016/J.RADPHYSHEM.2004.06.011.
- [20] H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.* 95 (1979) 351–358. doi:10.1016/0003-2697(79)90738-3.
- [21] I.F.F. Benzie, J.J. Strain, The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay, *Anal. Biochem.* 239 (1996) 70–76. doi:10.1006/ABIO.1996.0292.
- [22] P. Holm, P.J. Booth, M.H. Schmidt, T. Greve, H. Callesen, High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins, *Theriogenology*. 52 (1999) 683–700. doi:10.1016/S0093-691X(99)00162-4.
- [23] A.B. Giotto, D.D.S. Brum, F.W. Santos, A.C.G. Guimarães, C.G.M. Gonçalves, C.U.M. Pavin, N.P. Folchini, A.B. Moyses, D. Missio, F.G. Leivas, Oxygen tension and oocyte density during in vitro maturation affect the in vitro fertilization of bovine oocytes, *Semin. Ciências Agrárias*. 36 (2015) 4277. doi:10.5433/1679-0359.2015v36n6Sup2p4277.
- [24] L. Falchi, G. Galleri, M.T. Zedda, S. Pau, L. Bogliolo, F. Ariu, S. Ledda, Liquid storage of ram semen for 96 h: Effects on kinematic parameters, membranes and DNA integrity, and ROS production, *Livest. Sci.* 207 (2018) 1–6. doi:10.1016/j.livsci.2017.11.001.
- [25] H. Rodríguez-Martínez, Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia?, *Reprod. Domest. Anim.* 38 (2003) 312–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12887570> (accessed August 26, 2019).
- [26] L.H.A. Morris, W.H. Johnson, S.P. Leibo, B.C. Buckrell, Relationship between the characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa and in vitro embryo production, *Reprod. Fertil. Dev.* 13 (2001) 193. doi:10.1071/RD00114.
- [27] P. Gogol, M. Bryła, M. Trzcińska, M. Bochenek, Quality parameters and fertility of ram semen cryopreserved in egg yolk and soybean lecithin supplemented extenders., *Pol. J. Vet. Sci.* 22 (2019) 177–179. doi:10.24425/pjvs.2019.127084.
- [28] J. Pradiee, M.C. Estes, C. Castaño, A. Toledano-Díaz, A. López-Sebastián, J. Santiago-Moreno, Cryopreservation of epididymal sperm from ibexes (*Capra pyrenaica*) using short equilibration time with glycerol., *Theriogenology*. 82 (2014) 525–8. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.05.012.
- [29] I.W. dos Santos, J.E. da Nóbrega Junior, M.P. de Cesaro, G.F. Ilha, M.T. Rovani, P.B.D. Gonçalves, Ram semen cryoprotector based on egg yolk plasma maintain the viability



- of acrosomal membrane, *Cienc. Rural.* 45 (2015). doi:10.1590/0103-8478cr20131451.
- [30] S. Alcay, M. Berk Toker, E. Gokce, B. Ustuner, N. Tekin Onder, H. Sagirkaya, Z. Nur, M. Kemal Soylu, Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-based extender, *Cryobiology.* 71 (2015) 329–333. doi:10.1016/J.CRYOBIOL.2015.08.008.
- [31] R. Kruse, P.C. Dutta, J.M. Morrell, Colloid centrifugation removes seminal plasma and cholesterol from boar spermatozoa, *Reprod. Fertil. Dev.* 23 (2011) 858. doi:10.1071/RD10260.
- [32] M.S. Ansari, B.A. Rakha, S. Akhter, M. Ashiq, OPTIXcell improves the postthaw quality and fertility of buffalo bull sperm, *Theriogenology.* 85 (2016) 528–532. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.09.035.
- [33] A. Singh, A. Kumar, M. Honparkhe, S. Kaur, H. Kaur, S. Ghuman, P. Brar, Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of buffalo bull semen frozen in egg yolk-, soya bean lecithin- and liposome-based extenders, *Reprod. Domest. Anim.* 53 (2018) 195–202. doi:10.1111/rda.13092.
- [34] F. Ariu, L. Bogliolo, A. Pinna, L. Malfatti, P. Innocenzi, L. Falchi, D. Bebbere, S. Ledda, Cerium oxide nanoparticles (CeO<sub>2</sub> NPs) improve the developmental competence of in vitro-matured prepubertal ovine oocytes, *Reprod. Fertil. Dev.* 29 (2017) 1046–1056. doi:10.1071/RD15521.

**Table 1.** Sperm kinetics (mean  $\pm$  SD) of ram semen by Sperm Class Analyzer system immediately after thawed sperm of semen cryopreserved with seminal plasma (CG), centrifuged control (CC) and without seminal plasma (WSP).

Parameters	Treatments		
	CG	CC	WSP
TM (%)	48.2 $\pm$ 16.4 <sup>b</sup>	22.6 $\pm$ 14.3 <sup>a</sup>	41.9 $\pm$ 16.5 <sup>b</sup>
Rapid sperm (%)	33.5 $\pm$ 12.5 <sup>b</sup>	18.1 $\pm$ 14.5 <sup>a</sup>	33.1 $\pm$ 16.9 <sup>b</sup>
Medium sperm (%)	5.8 $\pm$ 2.9	2.7 $\pm$ 1.1	5.2 $\pm$ 0.6
Slow sperm (%)	9.0 $\pm$ 10.8 <sup>b</sup>	1.7 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	3.6 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>
PM (%)	37.1 $\pm$ 10.4 <sup>b</sup>	19.5 $\pm$ 14.3 <sup>a</sup>	37.0 $\pm$ 17.2 <sup>b</sup>
VCL ( $\mu$ m/s)	109.8 $\pm$ 23.1	118.0 $\pm$ 24.1	119.9 $\pm$ 24.7
VSL ( $\mu$ m/s)	81.7 $\pm$ 21.8	83.6 $\pm$ 17.3	88.4 $\pm$ 23.7
VAP ( $\mu$ m/s)	95.4 $\pm$ 24.5	101.1 $\pm$ 21.4	103.5 $\pm$ 27.0
LIN (%)	73.8 $\pm$ 5.1	71.4 $\pm$ 10.2	73.1 $\pm$ 5.5
STR (%)	85.5 $\pm$ 0.9	83.4 $\pm$ 10.1	85.5 $\pm$ 1.1
ALH ( $\mu$ m)	2.4 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.1
BCF (Hz)	8.4 $\pm$ 0.3	8.7 $\pm$ 0.5	8.6 $\pm$ 0.5
Hyperactivity (%)	14.4 $\pm$ 5.3	7.5 $\pm$ 7.3	14.1 $\pm$ 9.1

Within a column, values with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ).

TM: total motility; PM: progressive motility; VCL: curvilinear velocity; VSL: straight line velocity; VAP: average path velocity; LIN: linearity; STR: straightness index; ALH: amplitude of lateral head displacement; BCF: beat cross frequency.

**Table 2.** Parameters (mean  $\pm$  SD) of the reactive oxygen species (ROS), ferric reducing antioxidant power (FRAP) and thiobarbituric acid reactive species (TBARS).

	CG	CC	WSP
ROS	44.50 $\pm$ 9.65	38.10 $\pm$ 6.78	35.40 $\pm$ 7.45
FRAP	717.90 $\pm$ 133.29	762.90 $\pm$ 271.41	514.60 $\pm$ 74.69
TBARS	10.49 $\pm$ 2.31	8.25 $\pm$ 1.77	8.71 $\pm$ 1.03

Different superscripts indicate differences ( $P < 0.05$ ).

ROS data are expressed as Fluorescence Units (UF), FRAP in  $\mu\text{g}$  ascorbic acid equivalents and TBARS in nmol MDA/mL.

Ram semen cryopreserved with seminal plasma (CG), centrifuged control (CC) and without seminal plasma (WSP).

**Table 3.** Plasma membrane integrity (mean  $\pm$  SD), acrosome integrity, DNA integrity and mitochondrial activity from cryopreserved ram semen (CG), centrifuged control (CC) and without seminal plasma (WSP).

	CG	CC	WSP
PM integrity (%)	70.35 $\pm$ 2.99	72.07 $\pm$ 4.38	76.49 $\pm$ 3.24
Acrossome integrity (%)	88.66 $\pm$ 3.07 <sup>a</sup>	92.94 $\pm$ 3.67 <sup>a</sup>	97.03 $\pm$ 1.50 <sup>b</sup>
DNA integrity (%)	95.74 $\pm$ 1.77	97.33 $\pm$ 0.67	97.12 $\pm$ 0.68
Mitochondrial activity (%)	37.00 $\pm$ 21.9	38.40 $\pm$ 16.9	26.00 $\pm$ 9.50

Different superscripts indicate differences ( $P < 0.05$ ).

**Table 4.** Percentages (mean  $\pm$  SD) of normal fertilization (NF), normal penetration (NP), polyspermic penetration (PP), penetration and fertilization normal (PF) for in vitro matured oocytes.

	Oocytes	NF	NP	PP	PF
	n	%	%	%	%
CG	243	30.49 $\pm$ 3.64	18.11 $\pm$ 4.09	0.60 $\pm$ 0.59	48.60 $\pm$ 5.36
CC	219	24.68 $\pm$ 3.57	16.41 $\pm$ 5.27	1.14 $\pm$ 1.13	41.10 $\pm$ 3.26
WSP	239	31.38 $\pm$ 3.77	16.27 $\pm$ 4.58	0.66 $\pm$ 0.66	47.65 $\pm$ 6.42

Different superscripts indicate differences ( $P < 0.05$ ).

Ram semen cryopreserved with seminal plasma (CG), centrifuged control (CC) and without seminal plasma (WSP).

## 5 CONCLUSÃO

Considerando o uso do diluente OptiXcell™ e utilizando carneiros de boa fertilidade, concluímos que:

- A remoção do plasma seminal não influenciou na qualidade do sêmen ovino criopreservado;
- Na avaliação de cinética espermática a remoção do plasma seminal apresentou diferença quando associada ao efeito da centrifugação;
- O grupo criopreservado sem plasma seminal (SPS) apresentou maior porcentagem de espermatozoides com acrossoma íntegro;
- A remoção do plasma seminal não alterou as taxas de fecundação *in vitro*.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-HAILA, A.; TULSIANI, D. R. P. Mammalian sperm acrosome: Formation, contents, and function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 379, n. 2, p. 173–182, 15 jul. 2000.

AGARWAL, A.; HAMADA, A.; ESTEVES, S. C. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 1. **Nature reviews. Urology**, v. 9, n. 12, p. 678–90, dez. 2012.

AITKEN, R. J. **The Amoroso Lecture: The human spermatozoon - A cell in crisis?** **Journal of Reproduction and Fertility** Journals of Reproduction and Fertility Ltd, , 1999.

AL-ESSAWE, E. M. et al. Seminal plasma influences the fertilizing potential of cryopreserved stallion sperm. **Theriogenology**, v. 115, p. 99–107, 15 jul. 2018.

ALI, A. A.; BILODEAU, J. F.; SIRARD, M. A. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. **Theriogenology**, v. 59, n. 3–4, p. 939–949, 2003.

BAILEY, J. L.; BILODEAU, J. F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 1, p. 1–7, jan. 2000.

BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary medicine international**, v. 2010, 7 set. 2010.

BARRIOS, B. et al. Seminal Plasma Proteins Revert the Cold-Shock Damage on Ram Sperm Membrane1. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 5, p. 1531–1537, 1 nov. 2000.

BAUMBER, J. et al. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 6, p. 895–902, 2000.

BILODEAU, J. F. et al. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular reproduction and development**, v. 55, n. 3, p. 282–8, mar. 2000.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; SIRARD, M. A. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. **Journal of Andrology**, v. 18, n. 4, p. 454–460, jul. 1997.

BRINSKO, S. P.; CROCKETT, E. C.; SQUIRES, E. L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v. 54, n. 1, p. 129–136, 1 jul. 2000.

BUCAK, M. N. et al. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**, v. 67, n. 5, p. 1060–7, 15 mar. 2007.

BUCAK, M. N.; ATEŞŞAHİN, A.; YÜCE, A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. **Small Ruminant Research**, v. 75, n. 2–3, p. 128–134, 2008.



DE GRAAF, S. P. et al. Application of seminal plasma in sex-sorting and sperm cryopreservation. **Theriogenology**, v. 70, n. 8, p. 1360–1363, 1 nov. 2008.

DONNELLY, E. T.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. **Fertility and sterility**, v. 72, n. 3, p. 484–95, set. 1999.

**FAOSTAT**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA/visualize>>. Acesso em: 16 nov. 2019.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. **Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization** *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*, 10 nov. 2000.

FUNAHASHI, H.; SANO, T. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 degrees C. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1605–16, 1 abr. 2005.

GADELLA, B. M. et al. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 3–4, p. 249–265, 3 dez. 2001.

GADELLA, B. M.; BOERKE, A. An update on post-ejaculatory remodeling of the sperm surface before mammalian fertilization. **Theriogenology**, v. 85, n. 1, p. 113–124, 1 jan. 2016.

GARCÍA-ALVAREZ, O. et al. Sperm characteristics and in vitro fertilization ability of thawed spermatozoa from Black Manchega ram: electroejaculation and postmortem collection. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 160–8, 15 jul. 2009.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozoides e Plasma Seminal. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7.ed. Barueri: Manole, 2004. p.97-140.

GONÇALVES, F. S. et al. Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 1, p. 129–135, fev. 2010.

GRAHAM, J. K. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. **Theriogenology**, v. 41, n. 5, p. 1151–1162, 1 jan. 1994.

GREEN, C. E.; WATSON, P. F. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 889–898, 2001.

HICKS-GÓMEZ, J. J. **Bioquímica. México, McGraw-Hill**. 2001. 900p.

HOLT, W. V.; NORTH, R. D. The role of membrane-active lipids in the protection of ram spermatozoa during cooling and storage. **Gamete Research**, v. 19, n. 1, p. 77–89, 1988.

ISHII, T. et al. Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1-knockout mice under heat stress. **Free radical research**, v. 39, n. 7, p. 697–705, jul. 2005.

IWASAKI, A.; GAGNON, C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. **Fertility and Sterility**, v. 57, n. 2, p. 409–416, 1992.

JOBIM, M. I. M. et al. Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, n. 1, p. 21–30, 2003.

KATILA, T.; KARESKOSKI, M. Components of stallion seminal plasma and their influence on spermatozoa. **Pferdeheilkunde Equine Medicine**, v. 22, n. 2, p. 193–200, 2006.

KRUSE, R.; DUTTA, P. C.; MORRELL, J. M. Colloid centrifugation removes seminal plasma and cholesterol from boar spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 7, p. 858, 16 set. 2011.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1–3, p. 113–141, 18 ago. 2000.

LOPES ALMEIDA, J. Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen eqüino UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA. 2006.

MATA-CAMPUZANO, M. et al. Motility of liquid stored ram spermatozoa is altered by dilution rate independent of seminal plasma concentration. **Animal Reproduction Science**, v. 162, p. 31–36, 1 nov. 2015.

MAXWELL, W. et al. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. **Reproduction in Domestic Ruminants**, v. 6, n. 1, p. 13–38, 2007.

MAXWELL, W. M. C.; JOHNSON, L. A. **Physiology of spermatozoa at high dilution rates:**

**The influence of seminal plasma.** Theriogenology. **Anais...dez.** 1999

MAXWELL, W. M. C.; SALOMON, S. Liquid storage of ram semen: A review. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, n. 6, p. 613–638, 1993.

MAXWELL, W. M. C.; WATSON, P. F. **Recent progress in the preservation of ram semen.** Animal Reproduction Science. **Anais...Elsevier B.V.**, 1996

MOORE, H. D.; HIBBITT, K. G. Fertility of boar spermatozoa after freezing in the absence of seminal vesicular proteins. **Journal of reproduction and fertility**, v. 50, n. 2, p. 349–52, jul. 1977.

MOURA, P. P. et al. Characterization of seminal plasma proteins and its relationship with quality parameters of frozen semen in ram. **Ciencia Rural**, v. 40, n. 5, p. 1154–1159, 2010.

OLLERO, M. et al. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 16, n. 9, p. 1912–21, set. 2001.

PAUL, C.; TENG, S.; SAUNDERS, P. T. K. A Single, Mild, Transient Scrotal Heat Stress Causes Hypoxia and Oxidative Stress in Mouse Testes, Which Induces Germ Cell Death<sup>1</sup>. **Biology of Reproduction**, v. 80, n. 5, p. 913–919, 1 maio 2009.

PAUL, R. K. et al. Modulation of seminal plasma content in extended semen improves the quality attributes of ram spermatozoa following liquid preservation at 3-5°C. **Reproduction in Domestic Animals**, 28 jun. 2018.

PÉREZ, L. J. et al. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. **Theriogenology**, v. 46, n. 1, p. 131–140, 1996.

PRADIEE, J. et al. Cryopreservation of epididymal sperm from ibexes (*Capra pyrenaica*) using short equilibration time with glycerol. **Theriogenology**, v. 82, n. 3, p. 525–8, ago. 2014.

PURSEL, V. G.; JOHNSON, L. A. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. **Journal of animal science**, v. 40, n. 1, p. 99–102, jan. 1975.

ROBERTSON, S. A. Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: Lessons from rodents and pigs1. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. suppl\_13, p. E36–E44, 1 mar. 2007.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. **Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement** **Animal Reproduction Science**, 1995.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 48, n. 6, p. 835–50, dez. 1996.

SHEKARRIZ, M. et al. A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. **European urology**, v. 28, n. 1, p. 31–5, 1995.

SHIRAIISHI, K.; MATSUYAMA, H.; TAKIHARA, H. Pathophysiology of varicocele in male infertility in the era of assisted reproductive technology. **International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association**, v. 19, n. 6, p. 538–50, jun. 2012.

SIKKA, S. Relative Impact of Oxidative Stress on Male Reproductive Function. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 7, p. 851–862, 30 out. 2001.

SIKKA, S. C. **Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function.** *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 1996.

SIKKA, S. C.; RAJASEKARAN, M.; HELLSTROM, W. J. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. **Journal of andrology**, v. 16, n. 6, p. 464–8, 1995.

TÖPFER-PETERSEN, E.; PETROUNKINA, A. M.; EKHLASI-HUNDRIESER, M. **Oocyte-sperm interactions.** *Animal Reproduction Science. Anais...* 2 jul. 2000

TREMELLEN, K. Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. **Human reproduction update**, v. 14, n. 3, p. 243–58, 2008.

TULSIANI, D. R.; YOSHIDA-KOMIYA, H.; ARAKI, Y. Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. **Biology of reproduction**, v. 57, n. 3, p. 487–94, set. 1997.

TVRDÁ, E. et al. Impact of oxidative stress on male fertility - a review. **Acta veterinaria Hungarica**, v. 59, n. 4, p. 465–84, dez. 2011.

VALCÁRCEL, A. et al. Assessment of the acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. **Animal reproduction science**, v. 45, n. 4, p. 299–309, jan. 1997a.

VALCÁRCEL, A. et al. Assessment of the acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. **Animal Reproduction Science**, v. 45, n. 4, p. 299–309, 1 jan. 1997b.

WATSON, P. F. **The causes of reduced fertility with cryopreserved semen.** Animal Reproduction Science. **Anais...**2 jul. 2000

YANAGIMACHI, R. **Sperm capacitation and gamete interaction.****Journal of reproduction and fertility. Supplement**, 1989.

YANAGIMACHI, R. Fertility of mammalian spermatozoa: Its development and relativity. **Zygote**, v. 2, n. 4, p. 371–372, 1994.