

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

Efeito da gelatina na refrigeração à 5° C do sêmen ovino

Stela Mari Meneghello Gheller

Pelotas, 2015

Stela Mari Meneghello Gheller

Efeito da gelatina na refrigeração à 5° C do sêmen ovino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Dr. Antonio Sergio Varela Junior

Coorientadora: Dra. Fabiana Moreira

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G111e Gheller, Stela Mari Meneghello Gheller

Efeito da gelatina na refrigeração à 5° c do sêmen ovino /
Stela Mari Meneghello Gheller Gheller; Antonio Sergio Varela
Junior, orientador ; Fabiana Moreira, coorientadora. — Pelotas,
2015.

38 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em
Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de
Pelotas, 2015.

1. Qualidade seminal. 2. Refrigeração 5°c. 3. Sedimentação
de células espermáticas. I. Varela Junior, Antonio Sergio, orient.
II. Moreira, Fabiana, coorient. III. Título.

CDD: 636.3

Stela Mari Meneghello Gheller

Efeito da gelatina na refrigeração à 5° C do sêmen ovino

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa:12/02/2015

Banca examinadora:

Prof. Dr. Antonio Sergio Varela Junior (Orientador), Doutor em Aquicultura, pela Universidade Federal de Rio Grande (Furg)

Prof^a. Dra. Fabiane Borelli Grecco, Doutora em Ciência Animal, pela Universidade Federal de Pelotas (UFPeI)

Dra. Ligia Margareth Pegoraro, Doutora em Ciências, pela Universidade Federal de Pelotas (UFPeI)

Dra. Fabiana Moreira, Doutora em Ciência Animal, pela Universidade Federal de Pelotas (UFPeI)

**Dedico essa dissertação:
Aos meus pais, Ivanor e Maristela
Meu esposo, Claudionor Bitello
Meus Filhos, Lorenzo e Bernardo**

Agradecimentos

A minha família por ter me apoiado ao longo desta caminhada, sempre me incentivando e acreditando em meus objetivos, com certeza este são os que mais estão compartilhando desta minha conquista.

Aos meus filhos Lorenzo e Bernardo, a vocês a minha eterna gratidão, pois ao lado de vocês é que encontro forças para todos os dias seguir em frente sempre lutando por meus sonhos, pois são vocês que me mostram o quanto vale a pena a nossa vida. Amo vocês.

A meu esposo, pelos anos de convivência, pela dedicação, conselhos, amizade e pelas nossas conquistas ao longo desta jornada. Obrigada por compartilhar seu amor comigo e pela família maravilhosa que construímos juntos. Essa com certeza é nossa maior conquista.

As minhas amigas queridas, Alessandra, Geórgia, Vitória, Yara, Estela e Luzia, pelos momentos alegres que passamos juntas, horas de trabalho, incentivo e por estarem ao meu lado sempre que precisei de vocês.

Ao grupo ReproPel, pela oportunidade de fazer parte desta equipe, onde juntos dividimos conhecimentos, trabalhos, e nas diferenças conseguimos alcançar nossas metas.

Aos colegas de pós-graduação e PhD Karina, pela convivência durante este período e pelo aprendizado construído juntos.

Ao seu Paulo, pela companhia no laboratório, pelas nossas conversas e por estar sempre disposto a me ajudar.

Aos professores, Rafael, Bernardo, Arnaldo, Thomaz e Carine, por estarem sempre dispostos a contribuir para a execução dos trabalhos, e trabalharem juntos em busca do conhecimento e crescimento do grupo ReproPel.

A Dra. Ligia Pegoraro e Janaína pela oportunidade de convivência e pelos ensinamentos.

A minha Coorientadora, Fabiana, meu muito obrigada pela dedicação na construção deste trabalho, pela amizade e por estar sempre disposta e contribuir para meu aprendizado, não medindo esforços para se fazer presente ao longo deste período.

A Profª. Carine, por estar sempre presente durante todas as etapas da construção de meu conhecimento e crescimento profissional, pela amizade, carinho, dedicação e momentos alegres.

Ao meu orientador, o meu mais sincero agradecimento e admiração, pela oportunidade de crescimento, pois um verdadeiro professor não apenas aponta o caminho, mas sim ajuda a construir e alcançá-lo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

E para finalizar agradeço a Deus pela vida, família e por me permitir que continue seguindo minha caminhada.

Muito Obrigada!

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

Resumo

GHELLER, Stela Mari Meneghello Gheller. **Efeito da gelatina na refrigeração à 5°C do sêmen ovino**. 2015. 38f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Na refrigeração a sobrevivência da célula espermática é dependente da sua orientação espacial no meio diluidor não devendo essas se aglutinarem e nem sedimentarem. Em diluentes mais sólidos como os suplementados com gelatina, essa disposição pode ser beneficiada, além de ocorrer uma redução na demanda metabólica celular devido a redução da motilidade quando refrigerado. Em decorrência disto, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da adição de gelatina ao diluente para sêmen ovino acondicionado a 5^o, através de parâmetros de qualidade seminal realizados por teste *in vitro* durante um período de até 72hs. Foram utilizados 8 carneiros, realizando-se 4 coletas de sêmen para cada macho, totalizando 32 ejaculados. Dois diluentes foram utilizados neste estudo, E1 (leite integral 10%, 0,2 g de D-glicose, 50 mg de estreptomicina e 100 ml de água mili Q), e a E2 (E1 acrescido de 1,5% de gelatina). Foram avaliados os parâmetros de motilidade, morfologia espermática, integridade de membrana, DNA e acrossoma durante os períodos de 0, 24, 48 e 72h de armazenado a 5°C. Durante as primeiras 48 horas de armazenamento, não houve diferença estatística na motilidade entre E1 e E2, no entanto, a E2 nas 72 horas (51,9%) foi mais eficaz ($P < 0,05$) na manutenção dos parâmetros de motilidade do que o E1 (31,1%). A integridade do acrossoma foi semelhante em ambos os extensores a 0, 24 e 48 horas, mas às 72h a E2 foi maior ($P < 0,05$) da qualidade neste parâmetro (E1= 42,9 e E2 = 66,9). As variáveis, integridade de membrana, DNA, e morfologia espermática, não apresentaram diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$). Com os resultados encontrados pode-se concluir que a adição de gelatina na concentração de 1,5% ao diluente melhorou a motilidade e integridade do acrossoma em sêmen ovino armazenado por até 72hs, a 5°C aumentando assim o período de armazenamento das doses em 24 horas, sem perda de qualidade do espermática em testes realizado *in vitro*.

Palavras-chave: qualidade seminal; refrigeração 5°C; sedimentação de células espermáticas

Abstract

GHELLER, Stela Mari Meneghello Gheller. **Gelatin in the extender of the ram semen cooled at 5°C**. 2015. 38f. Dissertation (Master degree in Sciences) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Under refrigeration, the spermatic cell survivability depends upon its spatial orientation in the extender medium and the agglutination or sedimentation of these cells should not occur. In more solid extenders like the one supplemented with gelatin, the spatial disposition can be improved, and also the metabolic demand is lower by the reduced motility provoked by more solid medium. The main aim of this work was evaluate the qualitative effect provoked by addition of gelatina to the ram semen extender stored at 5°C. There were used 8 rams being accomplished 4 semen collections for each, totalizing 32 ejaculates. Two extenders were used in this study, E1 (whole milk 10%, 0.2g D-Glucose, 50 mg streptomycin and 100 ml of mili Q water), and the E2 (E1 plus 1.5% of gelatin). There were evaluated motility, cell morphology, DNA, membrane and acrosome integrity, during the period of 0h, 24hs, 48hs, and 72 hours of storage under refrigeration at 5°C. During the first 48hs of storage the spermatic motility remained the same in the E1 and E2, however, at 72hs the E2 (51,9%) was more efficient in the maintenance of the motility parameters ($P < 0.05$) than the E1 (31,1%). The acrosome integrity was similar in both extenders at 0h, 24hs and 48h of storages, but at 72hs the E2 showed the best result ($P < 0.05$) in this parameter (E1=42,9% and E2=66,9%). The viability, morphology and membrane and DNA integrity had not shown statistical difference comparing the treatments ($P > 0.05$). With the results there is possible to conclude that the addition of gelatin to the extender increased the motility and acrosome integrity in ram semen stored at 5°C, increasing through this the possibility of extending the storage time under refrigeration of the semen doses to more than 24hs.

Key-words: seminal quality; refrigeration at 5°C; spermatic cell sedimentation

Lista de Figuras

Figura1	Sperm motility (means \pm standard deviation) for distinct storage periods for E1= as a control treatment composed by whole milk, and the E2, with the same composition of the E1 plus 1.5% of gelatin during the storage period at 5°C (Four ejaculates x Eight rams).....	30
---------	---	----

Lista de Tabelas

- Tabela 1 DNA Integrity and acrosome integrity (means \pm standard deviation) for distinct storage periods for E1= as a control treatment composed by whole milk, and the E2, with the same composition of the E1 plus 1.5% of gelatin during the storage period at 5°C (Four ejaculates x Eight rams)..... 31
- Tabela 2 Membrane Integrity and normal spermatic morphology (mean \pm standard deviation) in semen extenders E1 as a control treatment composed by whole milk and E2 with the same composition of the E1 plus 1.5% of gelatin during the storage period at 5°C (Four ejaculates x Eight rams)..... 32

Sumário

1 Introdução.....	12
2 Objetivos.....	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3 Artigo.....	19
4 Considerações Finais.....	33
Referências	34

1 Introdução

Nas últimas décadas a ovinocultura passou por grandes mudanças nos diversos elos de suas cadeias produtivas, devido à expansão dos mercados interno e externo. De acordo com Resende et al. (2008), não somente o rebanho tem aumentado, mas a capacidade produtiva dessa espécie também tem evoluído devido a vários fatores, dentre eles o melhoramento genético visando a produção de carne e leite, o nutricional, o sanitário, entre outros. Nos últimos dez anos, ocorreram mudanças significativas para a consolidação da cadeia produtiva da ovinocultura no Brasil. De modo geral, a ovinocultura tem aumentado sua participação no agronegócio brasileiro, e pela forma que ela está crescendo a tendência é que esse quadro se mantenha em expansão. (EMBRAPA, 2010).

Com o crescimento dos rebanhos, algumas biotecnologias reprodutivas têm sido desenvolvidas objetivando o aumento dos índices produtivos e reprodutivos da espécie ovina, e conseqüentemente a sua rentabilidade. Dentre estas pode-se citar a preservação de sêmen, e a inseminação artificial (SIMPLICIO et al., 2007).

A inseminação artificial (IA) tem contribuído amplamente para aceleração de ganho genético em rebanhos ovinos (EVANS & MAXWELL, 1987). No entanto, IA apresenta atualmente algumas limitações quando se trabalha com sêmen congelado, pela baixa fertilidade alcançada após uso deste na inseminação cervical. A IA por via laparoscópica melhora esses índices de concepção, porém é mais cara, requer um período de tempo maior para sua realização, além de equipamento especializado (KING et al., 2004).

Na ovinocultura a IA cervical, com o uso de sêmen resfriado vem se mostrando como uma biotécnica reprodutiva a ser aplicada nos rebanhos comerciais, por ser mais vantajosa economicamente e ter maior praticidade, (YÁNIZ et al., 2005). Porém a preservação seminal ainda é um fator limitante para a aplicação extensiva desta biotecnologia (CURRY, 2000), devido ao uso resfriado reduzir a viabilidade seminal, com queda gradativa na sua qualidade, em vista que a viabilidade das doses refrigeradas depende da capacidade do diluente em promover

um ambiente apropriado ao espermatozoide durante sua conservação (ROCA et al., 2000).

Para que o sêmen possa ser conservado, ele deve ser devidamente diluído, desta maneira, terá sua durabilidade estendida e poderá ser transportado. O diluidor tem como função proteger a membrana do espermatozoide contra o choque térmico e as injúrias mecânicas causadas pelo transporte, além de fornecer nutrientes e estabilizar o pH do meio (VERSTEGEN et al., 2005). Segundo PICKET & AMANN (1987), um diluidor apropriado, em geral deve apresentar as seguintes características: ser atóxico para os espermatozoides, ser de baixo custo e preparo fácil, pressão osmótica compatível, balanço mineral apropriado, combinação ajustada de nutrientes, capacidade de neutralizar produtos tóxicos originados do metabolismo espermático, proteção contra os danos causados por ação das mudanças de temperatura, bem como proporcionar a estabilidade dos sistemas enzimáticos e a integridade da membrana plasmática. AISEN et al. (2005) afirma que os diluentes devem proporcionar nutrientes como fonte de energia, tamponamento de pH e também aumento do volume do ejaculado, a fim de obter múltiplas doses para inseminar.

Segundo SQUIRES et al., (1999), na temperatura corporal, o metabolismo espermático é alto e quando os espermatozoides são mantidos a 5°C, apenas 10% de seu metabolismo é necessário para sua sobrevivência quando comparado à preservação a temperatura ambiente. Desta forma, a refrigeração reduz o catabolismo espermático, o que é necessário para a preservação do ejaculado por longos períodos. Dentre as possibilidades de conservação do sêmen, segundo EVANS & MAXWELL (1990), o período máximo de conservação do ejaculado a 5°C, para obtenção de um grau aceitável de fertilidade através da inseminação artificial, é de 24 horas para ovinos. Já em temperaturas de 15°C, deve ser utilizado dentro de seis a 12 horas após a conservação, em diluidores à base de leite desnatado.

No processo de resfriamento do sêmen ovino, a célula espermática está vulnerável ao choque térmico entre 15 e 5°C, faixa em que um ritmo muito rápido de refrigeração induz a danos irreversíveis a sua motilidade, integridade estrutural e capacidade fertilizante (WATSON, 2000). Estes danos podem ser minimizados através do controle da taxa de refrigeração do sêmen ou pela adição de componentes protetores ao diluente. Isso ocorre, pois envolvendo toda a célula espermática, existe a membrana plasmática que é composta por uma dupla camada de lipídios, contendo

em sua estrutura proteínas e carboidratos. As membranas espermáticas são as estruturas mais afetadas pelo choque térmico (AMANN & GRAHAM, 1993). Os danos causados pelo estresse térmico são decorrentes de danos estruturais diretos, como a ruptura das membranas ou, indiretos, por alterações das funções celulares (SQUIRES et al., 1999).

As proteínas intracelulares também são afetadas pela refrigeração, ou seja, quando a temperatura é reduzida, as funções enzimáticas, assim como as proteínas envolvidas no transporte de substâncias através da membrana, também têm redução de sua atividade sob baixas temperaturas (AMANN & GRAHAM, 1993).

Com a redução da temperatura os lipídios da membrana passam de um estado de fluidez, no qual as cadeias de ácidos graxos são relativamente desorganizadas, para um estado de gel, em que as cadeias dos ácidos graxos são rígidas e paralelas, onde ocorre uma reorganização das cadeias hidrocarbonadas da membrana plasmática, com uma organização mais acentuada, tendo início uma agregação lipídica, tornando as membranas susceptíveis a rupturas (STRYPER, 1992), e redução a fluidez de membrana (HOLT, 2000). Essa etapa é conhecida como fase de transição. A susceptibilidade da membrana plasmática ao choque térmico durante o resfriamento é inversamente proporcional a quantidade de colesterol presente na membrana (DROBNIS et al., 1993). A presença de uma elevada taxa de ácidos graxos insaturados na membrana plasmática não apenas predispõe os espermatozoides de mamíferos ao choque térmico, como também aumenta a sua susceptibilidade aos danos oxidativos causados pelas reações oxigênio-espécie específicas, além de serem altamente predispostos ao ataque dos radicais livres e conseqüentemente, lipídio - peroxidação. O acúmulo de peróxidos de lipídios na superfície do espermatozoide causa disfunção e morte celular (BILODEAU et al., 2002).

Os carboidratos encontrados na superfície da membrana plasmática têm importante papel na adesão entre as células, por exemplo, no reconhecimento do ovócito pelo espermatozoide (ALBERTS et al., 1999). A composição glicolipídica da membrana plasmática parece estar relacionada ao grau de suscetibilidade dos espermatozoides às taxas de refrigeração.

O resfriamento pode induzir a ruptura acrossomal (BEDFORD et al., 2000) acarretando uma redução da fertilidade. A redução da temperatura de 38°C para 30°C de uma amostra de sêmen contendo células com membranas instáveis, devido à capacitação, já é o suficiente para desencadear a reação acrossomal (GADELLA et

al., 2001). Desta forma, deve-se sempre estar atento aos danos que o diluente e a curva do resfriamento utilizada podem causar ao acrossoma. No sêmen ovino, alguns aspectos do processo de refrigeração levam a membrana plasmática espermática a apresentar maturação excessiva, o que aumenta a proporção de espermatozoides precocemente capacitados e com reação acrossomal (SALAMON & MAXWELL, 1995). Estes processos podem ser favorecidos pelo maior ingresso de cálcio no interior da célula espermática, durante a refrigeração (WATSON, 2000). O choque térmico reduz a permeabilidade seletiva da membrana ao íon cálcio (BAILEY e t al., 2000), podendo, ainda, diminuir, de forma irreversível, a motilidade e a atividade metabólica dos espermatozoides (WHITE, 1993).

Muitos diluentes foram desenvolvidos com o intuito de melhorar a viabilidade do sêmen refrigerado bem como aumentar a sua durabilidade durante um período mais prolongado de tempo. Dentre esses, podemos citar a gema de ovo e o leite integral ou desnatado como os mais comumente utilizados. A gema de ovo protege os espermatozoides contra o choque térmico na refrigeração, geralmente é utilizada nas concentrações de 20%, e evidências indicam que a fração de lipoproteína de baixa densidade (LDL), é quem conferem essa proteção a célula espermática (SALAMON & MAXWELL, 2000).

O leite integral, ou desnatado também tem sido utilizado por muito tempo como meio diluidor de sêmen ovino. Segundo SALAMON & MAXWELL, (2000), o sucesso deste diluente tem relação com a fração proteica, que atua como um tampão contra variações do pH, e como agente quelante. Além disso apresenta proteção parcial contra danos ocasionados na curva de resfriamento.

Pesquisa realizada sobre a diluição e conservação de sêmen ovino, mostrou que a fertilidade do sêmen em estado líquido declinava rapidamente quando o mesmo era armazenado por mais de 24 horas e utilizado para a I.A. (MAXWELL & WATSON, 1996). Esse fato pode ser atribuído à necessidade de homogeneização das amostras durante este período e sua distribuição no frasco de armazenamento. Uma alternativa está na forma de refrigeração e armazenamento sólido de amostras a serem destinadas a IA.

Sob refrigeração a sobrevivência da célula espermática e sua integridade funcional são dependentes da orientação espacial das mesmas no meio diluidor (HOLT, 2000), não devendo aglutinar e sedimentar, necessitando assim serem homogenizadas durante seu armazenamento. Em diluentes mais viscosos

como os suplementados com gelatina, essa disposição pode ser beneficiada, além de ocorrer uma redução na demanda metabólica dessas células devido a redução da sua motilidade no resfriamento (LÓPEZ-GATIUS et al., 2005). Outra vantagem atribuída as amostras acondicionadas em meio mais viscoso é que essas não requerem homogeneização, pois esse meio não permite a sedimentação celular, permitindo uma melhor ação de tampões adicionados para minimizar a variação do pH, além da proteção dos espermatozoide a exposição à luz e ao choque térmico por essa fazer uma espécie de encapsulamento na célula.

Estudos evidenciam que a utilização da gelatina favoreceu alguns parâmetros de qualidade do sêmen em diferentes espécies. A adição de gelatina em diluentes para armazenamento de sêmen de coelho evidenciou uma melhora na qualidade seminal e prolongamento da sua viabilidade (NAGY et al., 2000; LÓPEZ-GATIUS et al., 2005). Isso foi atribuído a viscosidade do diluente suplementado com gelatina que manteve os espermatozoides com reduzida motilidade e distribuídos no meio. Segundo, NAGY et al. (2002) a porcentagem de células que apresentaram acrossoma intacto foi maior no diluente acrescido de gelatina. YÁNIZ et al. (2005), utilizando meios diluidores a base de leite integral em uma concentração de 1,5% de gelatina a uma temperatura de refrigeração de 15⁰C evidenciou uma motilidade espermática superior no tratamento contendo gelatina. Já CORCINI et al. (2011), em suínos, avaliou o efeito da adição de gelatina em diluente para sêmen resfriado sobre a qualidade seminal e performance reprodutiva, observou que 1,5% da gelatina manteve a qualidade espermática até 96 horas e menor refluxo seminal após a IA, mantendo os mesmos índices reprodutivos de prenhez, do que o sêmen sem a adição de gelatina, passando a ser uma alternativa viável para manutenção de doses por períodos mais longos, pois diferente do que ocorre em diluentes na forma líquida onde se tem uma sedimentação celular esse meio mais sólido permite uma distribuição mais homogênea das células favorecendo com isso ação dos componentes presentes no diluente como: fonte energética, tampões e protetores. Em contrapartida, no diluente na forma líquida, pelo fato de ter ocorrer sedimentação nessa região o pH se torna mais elevado, devido à alta concentração de produtos tóxicos provenientes do metabolismo das células que se encontra aumentado pois não ocorre uma ação eficiente do diluente e esses efeitos não mantem as células viáveis por um período superior.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação de gelatina na concentração de 1,5% a um diluente de resfriamento de sêmen ovino a base de leite integral, sobre a qualidade seminal durante o armazenamento à 5⁰C por até 72 horas.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da suplementação de gelatina na concentração de 1,5% a um diluente de resfriamento de sêmen ovino a base de leite integral, sobre a qualidade seminal durante o armazenamento à 5⁰C por até 72 horas.

2.2 Objetivos Específicos

Através de testes *in vitro* avaliar os parâmetros de qualidade seminal, por um período de resfriamento de até 72hs armazenado a 5⁰C.

Determinar o percentual de células móveis, através de avaliação de motilidade espermática até as 72hs de resfriamento.

Avaliar a integridade de membrana, acrossoma, DNA, através de microscopia de epifluorescência nas amostras nas 0,24,48,72hs de resfriamento. Determinar a morfologia espermática com coloração de eosina – nigrosina nas 72hs de resfriamento.

3 Artigo

Sperm quality of ram semen stored at 5°C in an extender with gelatin.

**GHELLER, Stela Mari Meneghello^{1, 2}; CORCINI, Carine Dahl^{1,2}; PRADIEÉ,
Jorgea¹; RIZZOTO ,Guilherme^{1,2}; LUCIA JUNIOR, Thomaz¹; MOREIRA Fabiana¹;
VARELA JUNIOR, Antonio Sergio^{1,2}.**

Artigo submetido a revista Livestock Science

22 were used in this study, E1 (whole milk 10%, 0.2g D-glucose, 50 mg streptomycin and
23 100 ml of mili Q water), and the E2 (E1 plus 1.5% of gelatin.) The spermatic motility
24 remained the same in the E1 and E2 until 48hs of storage, however, at 72hs the E2
25 were more efficient in the maintenance of the motility parameters ($P<0.05$) than the
26 E1. During the storage time of 0h, 24hs and 48 hs, the acrosome integrity were similar
27 in both extenders, but at 72hs the E2 were capable to maintain more than 50% of the
28 cells with a healthy acrosome ($P< 0.05$). The viability, morphology and membrane and
29 DNA integrity had not shown statistical difference ($P> 0.05$). In conclusion, the addition
30 of gelatin does not reduce the sperm quality, and prevents the spermatic cells
31 sedimentation facilitating the maintenance of the doses and therefore can be used as
32 an alternative for cervical insemination.

33 **Keywords:** sperm quality, cooling, spermatic cells sedimentation

34 Introduction

35 In the sheep industry the cervical artificial insemination (AI) with cooled semen is
36 an important alternative to be used as a reproductive practice in the commercial sheep
37 flocks, due to its economic advantage and higher practicality, furthermore, this
38 technique can accelerate the animal genetic gain (Yániz et al. 2005). However, due
39 the cooling process the seminal preservation still is a limiting factor for the application
40 of this reproductive biotechnology (Curry 2000). Because the storage for periods
41 longer than 24hs provokes reduction in the seminal viability, gradually affecting its
42 quality (Evans & Maxwell, 1990). . Another important point is that the performance of
43 cooled doses depends upon the extender that promotes an appropriate environment
44 for spermatozoa during its storage (Roca et al.2000).

45 The store of cooled doses utilized for AI is still an obstacle due to the injuries
46 caused to the cells by temperature and storage time, so, many extenders were
47 developed for store semen at 5°-15°C. Under refrigeration the survivability of the
48 spermatic cell and its functional integrity depends upon its spatial orientation in the
49 extender (Holt, 2000).. Therefore, to obtain a longer period of maintenance, viability,
50 and also a longer survivability of the spermatozoa, extenders that can promote a higher
51 cell protection, exerting a fundamental role in the seminal conservation during the
52 cooling process are required (Figueirêdo et al. 2007).

53 The viscosity of the extender supplemented with gelatina promoted an
54 improvement in the parameters of acrosomal integrity, motility and also prolonged the
55 seminal viability with superior results in the fertility rates after artificial insemination in
56 rabbit semen (Nagy et al., 2000; López-Gatius et al., 2005).

57 Corcini et al. (2011), studying the effect of gelatin addition in extender for cooled
58 semen upon the seminal quality and reproductive performance in swine, observed that
59 the extender with 1.5% of gelatin maintained the spermatic quality under storage for
60 96hs and decreased the seminal reflux after AI without reduction in the reproductive
61 parameters.

62 In this context, the work aimed to evaluate the qualitative effect of addition of
63 gelatin (1.5%) in ovine semen extender for storage at 5°C.

64 **Material and Methods**

65 Eight rams with known fertility were housed in the stables of the Universidad
66 Federal de Pelotas. Each ram was submitted to 4 semen collections (n=32) during a
67 4-week period. The semen was collected with artificial vagina method in the presence
68 of a female, in an isothermal environment.

69 Parameters of spermatozoa motility, morphology, viability, and DNA, membrane
70 and acrosome integrity were evaluated, at 0, 24, 48 and 72 hours of storage under
71 refrigeration at 5°C. A trained laboratory technician performed all the analysis.

72 Two extenders were used in this study: E1 as a control treatment composed by
73 whole milk at a concentration of 10%, 0.2g D-glucose, 50mg streptomycin in the 100ml
74 of mili Q water (Evans and Maxwell, 1987) and the E2, with the same composition of
75 E1 plus 1.5 % of gelatin. All diluents were prepared in the laboratory ReproPel (UFPel),
76 using reagent-grade chemicals purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis,
77 Missouri, USA), excepting the powdered milk ((molico®). The final semen
78 concentration used in this work was 1×10^6 /ml, determined by the utilization of the
79 Neubauer chamber (CRBA, 2013). The cooling curve until 5°C followed the protocol
80 described by Evans and Maxwell, 1987).

81 All the samples were heated in a water bath (5 minutes at 37° C) prior to perform
82 each test. Only samples classified with motility $\geq 80\%$ and vigor ≥ 3 were used in this
83 experiment.

84 Spermatozoa motility analysis was performed in a binocular phase contrast
85 microscope 200X, using slide with cover slip heated at 37C° during the evaluation
86 (Bearden and Fuquay 1997).

87 The membrane integrity of the spermatozoa is an indicative of structural integrity
88 and cell function, and it was evaluated using carboxyfluorescein diacetate and
89 propidium iodide (Harrison and Vickers). The cells presenting green fluorescence were
90 considered healthy, while cells with red fluorescence were considered damaged.

91 The extent of DNA denaturation was evaluated by exposure to the stain Acridine
92 Orange, when exposed to the stain, the spermatic DNA double helix shows green color
93 and is considered intact (double-stranded), while the single-stranded DNA, due to

94 denaturation is considered damaged and shows red or yellow color, the technique
95 was realized as described by Evenson et al. (1999)

96 The evaluation of acrosome integrity was realized based in the technique with
97 propidium iodide and FITC-PNA (Lectin from *Arachis hypogaea*), (Kawamoto et al.
98 1999).

99 Membrane, DNA, and acrosome integrity were evaluated using an
100 epifluorescence microscope (Olympus BX 51; America INC, São Paulo, SP, Brazil), at
101 1000x with 450–490 nm filter wavelength and emission 520nm. Two hundred cells
102 were counted and classified in each slide.

103 The analysis of spermatic morphology and viability were performed following
104 the using the eosin nigrosin stain, 200 cells were evaluated in each slide using an optic
105 microscope at 1000x (Hancock and Hovell, 1959). By the analysis, the cells were
106 classified as normal or with defects in the tail, midpiece and head.

107 Statistical analysis were performed using the Shapiro-Wilk test for analysis of
108 normality and homogeneity of variance for all dependent variables. After, for the
109 dependent variables with normal distribution, it was performed analysis of variance by
110 ANOVA with subsequent comparison between means using Tukey's test. The not
111 normally distributed variables were analyzed by Wilcoxon variance averages. All
112 analysis were performed Statistix 9.0 software.

113 **Results**

114 Until 48hours of storage there was no difference in the cell motility between E1
115 and E2, however, at 72hs the E2 showed higher motility rate ($P < 0.05$) (Figure 1).
116 During the storage time of 0, 24 and 48hours, the acrosome integrity was similar in
117 both extenders, but at 72hours the E2 showed a better result when compared to E1
118 ($P < 0.05$) (Table 1). For the evaluated DNA seminal is parameters (Table 1),

119 membrane integrity and morphology, no difference was observed statistically during the
120 cooling period, in both treatments ($P < 0.05$) (Table 2).

121 **Discussion**

122 The extender with 1.5% of gelatin stored at 5°C used in this experiment
123 maintained the motility and acrosome integrity of the spermatozoa under low
124 temperatures for a higher storage time (72 h). Therefore, we suggest that the extender
125 can be utilized for a longer time period without losses in the reproductive rates.

126 The spermatic motility at 0 hour were higher than 70% in all the groups,
127 showing a posterior reduction at 24, 48 and 72hours. These results corroborates with
128 the data provided by Yániz et al. (2005), where the motility for both groups at 0 hour
129 were similar, showing a reduction at 24 and 48hours, but the group containing gelatin
130 showed a higher motility than the group without gelatin. Likewise for ram semen
131 (Salvador et al. 2006) and boar semen (Corcini et al. 2011) the higher spermatic
132 motility was identified in the groups containing gelatin, being the results very similar
133 with those found in this work in which no statistical difference were identified in the first
134 48h. In the present study, the spermatic motility in the group containing gelatin at 72
135 hours of storage at 5° C showed higher value (51.9%) than the control group (31%).
136 The result described in this work was assigned to the fact that at 5°C the spermatic cell
137 needs to utilize just 10% of its metabolism for maintenance (Squires et al. (1999),
138 therefore the gelatin, that is a more viscous medium, immobilized the cells reducing
139 the energetic demand and decreasing the spermatic catabolism needed for the
140 preservation of the viability for longer periods after ejaculation.

141 The results obtained by Salvador et al. (2006), for acrosome integrity using
142 goat semen with an extender containing gelatin in similar periods of storage (0, 24, 48
143 and 72hours) which where 89%, 69%, 60% and 50% respectively, showed better

144 extender performance than the results obtained in this work, once statistically
145 meaningful difference was showed for acrosome integrity at 72hours of storage
146 comparing with 0, 24 and 48hours and the higher result obtained for E2 was $66.25 \pm$
147 17.51% . This result indicates that gelatin have a positive effect in the spermatic cell
148 refrigeration process, because the acrosome is a fundamental structure in the
149 fertilization process (Kawakami et al. 1993), and also is responsible for the physical
150 and chemical reactions between the spermatozoa and the oocyte triggering the
151 fecundation.

152 Many studies have described a positive correlation between the percentage of
153 intact acrosome spermatozoa and fertility (Correa et al. 1997; Silva and Gadella,
154 2006). Cooling process can induce acrosome rupture and reaction (Bedford et al.
155 2000), due to the possibility of temperature shock that the cell is exposed during the
156 refrigeration process, and in this work we suggest that the gelatin could be the
157 responsible for the reduction in this negative effect through the maintenance of the
158 cells in a solid media reducing the direct effects of the temperature changes in the
159 spermatic cell.

160 In this work the results for membrane integrity (Table 2) have not shown
161 statistical difference ($P>0.05$) during the storage time. The same results showed
162 inferior values when compared with the data provided by Yániz et al. (2005), that found
163 63.15% in the membrane integrity evaluation but in the control group the results were
164 similar to those found in this work.

165 The absence of statistical difference in membrane and DNA integrity between
166 the tested groups demonstrates that the addition of gelatin in an extender can be a
167 viable alternative to avoid the need of doses homogenization. Yániz et al. (2005) and
168 López-Gatius et al. (2005), had observed that during the storage time with liquid

169 extender sperm cells sedimentation occurs, causing fluctuation in pH, metabolites
170 production and acceleration in cellular death due to membrane lesions, and these
171 effects does not maintain viable the doses utilization after 48hourss under refrigeration,
172 due to the risk of compromise the AI success and cause economic losses related to
173 the low herd reproductive rates.

174 There was no statistical difference between the groups for morphology
175 analyzed through the eosin nigrosin stain technique (Table 2), demonstrating that
176 gelatin can be added to the semen without causing cell damage or compromising the
177 IA success as demonstrated for swine, (Corcini et al. 2011). In the Table 2 the absence
178 of statistical difference presented in the analysis reinforces that the addition of gelatin
179 can be an alternative for extender when a reduction of seminal reflux is expected during
180 the cervical insemination, because the gelatinization process reduce the semen reflux
181 after the AI (Paulenz et.al. 2002) improving the utilization of this extender in the AI
182 procedures.

183 After the cooled process, the extender with gelatin maintains the capability to
184 return to the liquid state in temperatures close to the physiological for the ovine specie,
185 being this an indicator that spermatozoa migration in the female reproductive tract is
186 not compromised. Furthermore, a reduction in the final concentration of spermatic cells
187 is possible, improving the male utilization

188 **Conclusion**

189 The addition of gelatin to the extender media improved the motility and
190 acrosome integrity of ovine semen stored (72 h) at 5°C in the 1,5% concentration
191 group, thereby increasing the doses of storage period in 24 hours, without loss of
192 sperm quality.

193 **References**

- 194 Bearden, H.J., and Fuquay, J.W. (1997). Semen collection. In 'Applied Animal
195 Reproduction'. 4 th end. (Eds H.J. Bearden and J. W. Fuquay.) pp. 159 - 170. (Prentice
196 Hall: New Jersey).
- 197 Corcini, C.D., Moreira, F., Pigozzo, R., Varela, JR.A.S., Torres, N.U., Lucia, J.R.T.
198 (2011). Semen quality and reproductive performance after artificial insemination with
199 boar sperm stored in a gelatin-supplemented extender. *Livest Sci* 38, 289-292.
- 200 Correa, J.R., Pace, M.M., Zavos, P.M. (1998). Relationships among frozen-thawed
201 sperm characteristics accessed via the routine semen analysis, sperm functional tests
202 and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology* 48, 721-731.
- 203 Curry, M.R. (2000).Cryopreservation of semen from domestic. *Rev Reprod* 5, 46–52.
- 204 Esbenshade, K.L. and Nebel, R.L. (1990). Encapsulation of porcine spermatozoa n
205 poly – lysine microspheres. *Theriogenology* 33, 499 – 508.
- 206 Evenson, D.P., Jost, L.K., Marshall, D., Zinaman, M.J., Clegg, E., Purvis, K., Angelis,
207 P., Claussen, O.P. (1999). Utility of the sperm chromatin structure as a diagnostic and
208 prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 14 1039-1049.
- 209 Figueirêdo, E.L., Nunes, J.F., Cordeiro, M.A., Souza, P.T., Diógenes Filho, R.N.,
210 Vieira, V.E., Silva Filho, A.H.S., Mesquita, F.L.T., Salgueiro, C.C.M., Feitosa, J.V.
211 (2007). Inseminação artificial de ovelhas da raça Santa Inês com sêmen diluído em
212 água de coco in natura e em pó. *Ver Bras Ciênc Vet* 14, 95-97.
- 213 Garner, D.L., Pinkel, D., Johnson, L.A. (1986). Assessment of spermatozoa function
214 using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis. *Biol Reprod* 34, 127-38.
- 215 Hancock, J.L. and Hovell, G.J.R. (1959). The collection of boar semen. *Vet Rec* 71,
216 664-665.
- 217 Harrison, R.A.P. Vickers, S.E. (1990) Use of fluorescent probes to assess membrane
218 integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil* 88, 343-352.
- 219 Kawakami, E., Vandervoort, C.A., Mahi-Brown, C.A., Overstreet, J.W. (1987).
220 Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science* 7, 143-173.
- 221 Kawamoto, A., Kazutomo, O., Kishikawa, H., Zhu, L., Azuma, C., Murata, Y. (1999).
222 Two-color fluorescence staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrosomal
223 status. *Fertil Steril* 71, 497 – 501.
- 224 López, G.F., Sanches, G., Sancho, M. (2005). Effect of solid storage at 15°C on
225 subsequent motility and fertility of rabbit semen. *Theriogenology* 64, 252-260.
- 226 Meque, L.C., Gil, L., Mualuzanga, D., González, N., Akourki, A., Cano, R., Espinosa,
227 E., Josa, A. (2005). Effect of different concentrations of two types of gelatine in soya

228 milk extender for storage of liquid ram semen. ESDAR, September 3–5, Murcia, Spain,
229 Abstract P 137, *Reprod Domest Anim* 40, 353.

230 Paulenz, H., Adnoy, T., Fossen, O.H., Söderquist, L. (2010). Effect on field fertility of
231 addition of gelatine, different dilution rates and storage times of cooled ram semen
232 after vaginal insemination. *Reprod Domest Anim* 45, 706-710.

233 Paulenz, H., Soderquist, L., Pérez-Pe, R., Andersen, B.K. (2002). Effect of different
234 extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen.
235 *Theriogenology* 57, 823–36.

236 Roca, J., Martínez, S., Vázquez, J.M., Lucas, X., Parrilla, I., Martínez, E.A. (2000).
237 Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored
238 at 15°C. *Anim Reprod Sci* 64, 103-112.

239 Salvador, I., Yániz, J., Viudes-de-Castro, M.P., Gómez, E.A., Silvestre, M.A. (2006).
240 Effect of solid storage on caprine semen conservation at 5°C. *Theriogenology* 66, 974–
241 981.

242 Silva, P.F.N. and Gadella, B.M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm
243 cells. Sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology* 53, 1691-1703.

244 Yániz, J., Martí, J.I., Silvestre, M.A., Folch, J., Santolaria, P., Alabart, J.L, López, G.F.
245 (2005). Effects of solid storage of sheep spermatozoa at 15°C on their survival and
246 penetrating capacity. *Theriogenology* 64, 1844-1851.

Graphic 1. Sperm motility (means \pm standard deviation) for distinct storage periods for E1= as a control treatment composed by whole milk, and the E2, with the same composition of the E1 plus 1.5% of gelatin during the storage period at 5°C (Four ejaculates x Eight rams).

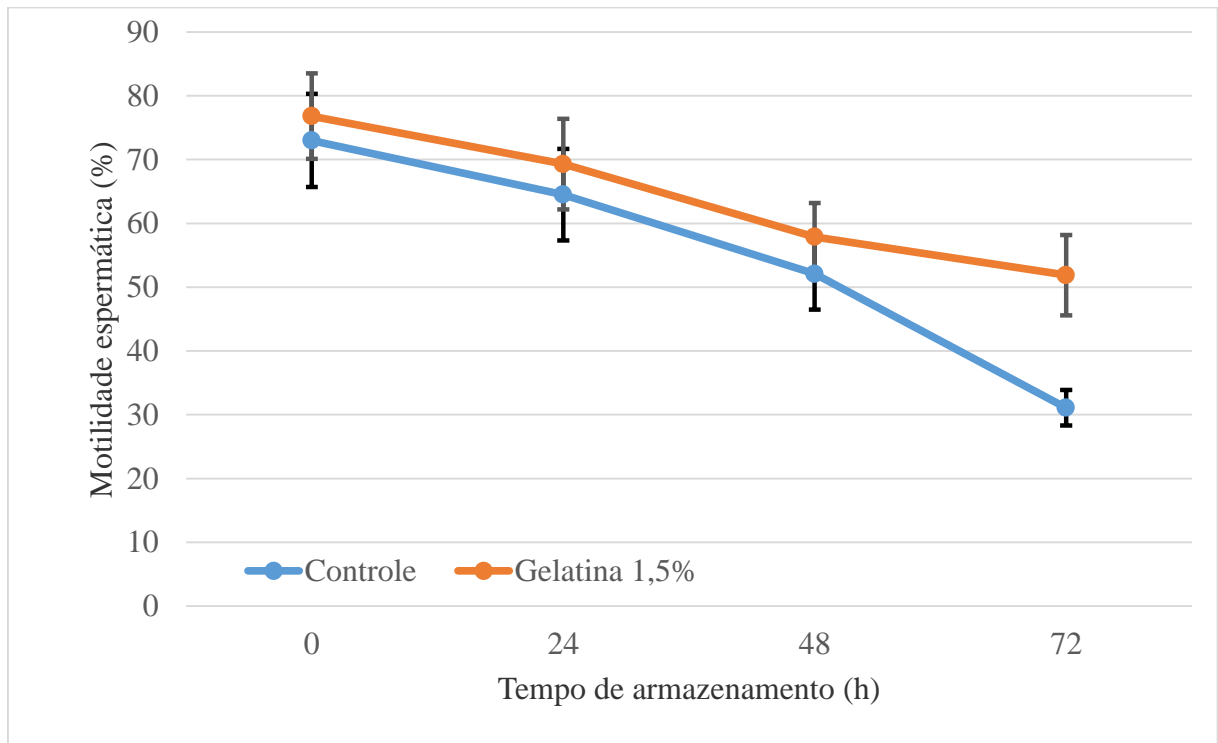


Table 1. DNA integrity and acrosome integrity (Means \pm standard deviation) for distinct storage periods for E1= as a control treatment composed by whole milk, and the E2, with the same composition of the E1 plus 1.5% of gelatin during the storage period at 5°C (Four ejaculates x Eight rams).

Storage Time (h)	DNA Integrity (%)		Acrosome Integrity (%)	
	E1	E2	E1	E2
0	94.5 \pm 8.4	96.4 \pm 5.5	28.5 \pm 9.4 ^A	45.8 \pm 15.2 ^A
24	68.4 \pm 27.4	78.4 \pm 26.2	68.1 \pm 18.9 ^A	64.8 \pm 20.6 ^A
48	64.3 \pm 21.4	65.2 \pm 24.8	54.3 \pm 25.4 ^A	68.7 \pm 18.3 ^A
72	64.3 \pm 21.4	63.5 \pm 18.7	42.9 \pm 23.1 ^B	66.3 \pm 17.5 ^A

^{A,B} Different exponents in only characteristic *in vitro* indicate statistical difference (P<0.05).

Table 2. Membrane Integrity and normal spermatic morphology (mean \pm standard deviation) in semen extenders E1 as a control treatment composed by whole milk and E2 with the same composition of the E1 plus 1.5% of gelatin during the storage period at 5°C (Four ejaculates x Eight rams).

Time (h)	Membrane Integrity (%)		Morphology (%)	
	E1	E2	E1	E2
0	68.7 \pm 14.2	72.0 \pm 12.4	82.7 \pm 7.8	94.4 \pm 4.1
24	65.9 \pm 8.4	68.0 \pm 17.2	83.3 \pm 7.8	86.6 \pm 18.2
48	57.5 \pm 19.7	57.7 \pm 21.3	53.4 \pm 11.9	78.5 \pm 21.6
72	55.7 \pm 11.7	68.0 \pm 17.2	74 \pm 14.9	77.8 \pm 25.2

The results did not differ statistically ($P>0.05$).

4 Considerações Finais

A motilidade espermática se manteve nos dois diluentes até às 48h de armazenamento (5° C), no entanto o diluente contendo gelatina foi mais eficiente ($P < 0,05$) em manter a motilidade do que o diluente sem adição de gelatina quando armazenado por 72h.

Durante os períodos de armazenamento de 0h, 24h e 48h, a integridade de acrossoma foi semelhante para os dois diluentes, porém o diluente contendo gelatina foi capaz de manter melhor ($P < 0,05$) a integridade do acrossoma das células após 72 h a 5° C.

Com os resultados encontrados neste trabalho, pode-se conservar amostras seminais por períodos mais longos, e com isso permitindo o transporte de doses a distâncias maiores, aumentando assim a possibilidade de disseminação de material genético entre rebanhos. Porém, ainda são necessários dados *in vivo* para isso se concretizar.

Referências

AISEN, E. M.; QUINTANA, V.; MEDINA, H.; MORELLO & A VENTURINO. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. **Cryobiology**, v. 50, p. 239-249, 2005.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Estrutura da membrana. In: ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, p.354-378, 1999.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: MCKINNON AO, VOSS JL. **Equine reproduction**, Philadelphia: Lea & Febiger, p.715-745, 1993.

AMANN RP, PICKETT BW. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p. 145-173, 1987.

BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen criopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v.21, p.1-7, 2000.

BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Semen collection. In: BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. **Applied Animal Reproduction**. 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall. p. 147-157, 1997.

BEDFORD, S.; VARNER, D.; MEYERS, S. Effects of cryopreservation on the acrossosomal status of stallion spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility Supplement*, v.56, p.133-140, 2000.

BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C.; SIRARD, M.A. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v.56, p.275-286, 2001.

CBRA: COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte: **CBRA**, p.49, 2013.

CORCINI, C.D.; MOREIRA, F.; PIGOZZO, R.; VAREJA JR., A.S.; TORRES, N.U.; LUCIA JR. T. Semen quality and reproductive performance after artificial insemination with boar sperm stored in a gelatin-supplemented extender. **Livestock Science**, v.138, p. 289 – 292, 2011.

CORREA, J.R.; PACE, M.M.; ZAVOS, P.M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, v.48, p.721-731, 1998.

CURRY, M.R. Cryopreservation of semen from domestic. **Reviews of Reproduction**, v.5, p.46–52, 2000.

DROBNIS, E.Z.; CROWE, L.M.; BERGER, T.; ANCHORDOGUY, T.J.; OVERSTREET, J.W.; CROWE, J.H. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. **Journal of Experimental Zoology**, v. 265, p. 432–437, 1993.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **A evolução da caprino-ovinocultura brasileira**. Disponível em: <<http://www.cnpc.embrapa.br/artigo8.htm>> Acesso em: 24/2/2015.

ESBENSHADE, K.L; NEBEL, R.L. Encapsulation of porcine spermatozoa in poly-lysine microspheres. **Theriogenology**, v. 33, p. 499 – 508, 1990.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats**. Australia: Star Printery Pty Ltd, p.194, 1987.

EVENSON, D.P.; JOST, L.K.; MARSHALL, D.; ZINAMAN, M.J.; CLEGG, E.; PURVIS, K.; ANGELIS, P.; CLAUSSEN, O.P. Utility of the sperm chromatin structure as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Human Reproduction**, v.14, p.1039-1049, 1999.

FIGUEIRÊDO, E.L.; NUNES, J.F.; CORDEIRO, M.A.; SOUZA, P.T.; DIÓGENES FILHO, R.N.; VIEIRA, V.E.; SILVA FILHO, A.H.S.; MESQUITA, F.L.T.; SALGUEIRO, C.C.M.; FEITOSA, J.V. Inseminação artificial de ovelhas da raça Santa Inês com sêmen diluído em água de coco in natura e em pó. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.14, n. 2, p.95-97, 2007.

GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, J.F.H.M.; STOUT, T.A.E.; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine semen. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.249-265, 2001.

HANCOCK, J.L.; HOVELL, G.J.R. The collection of boar semen. **Veterinary Record**, v.71, p.664-665, 1959.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.343-352, 1990.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, 53, 47-58, 2000.

KAWAKAMI, E.; VANDEVOORT, C.A.; MAHI-BROWN, C.A.; OVERSTREET, J.W. cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v.7, p.143-173, 1987.

KAWAMOTO, A.; KAZUTOMO, O.; KISHIKAWA, H.; ZHU, L.; AZUMA, C.; MURATA, Y. Two-color fluorescence staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrosomal status. **Fertility and Sterility**, v.71, p.497-501, 1999.

KING, M.E.; MCKELVEY, W.A.C.; DINGWALL, W.S.; MATTHEWS, K.P.; GEBBIE, F.E.; MYLNE, M.J.A.; STEWART, E.; ROBINSON, J.J. Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen/thawed semen with or without oxytocin administration. **Theriogenology**, v.62, p.1236-1244, 2004.

LÓPEZ, G.F.; SANCHES, G.; SANCHO, M. Effect of solid storage at 15°C on subsequent motility and fertility of rabbit semen. **Theriogenology**, p.64, v. 252-260, 2005.

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

MEQUE, L.C.; GIL, L.; MUALUZANGA, D.; GONZÁLEZ, N.; AKOURKI, A.; CANO, R.; ESPINOSA, E.; JOSA, A. Effect of different concentrations of two types of gelatine in soya milk extender for storage of liquid ram semen. ESDAR, September 3-5, Murcia, Spain, Abstract P 137, **Reproduction Domestic Animal**, v.40, p. 353 - 371, 2005.

PAULENZ, H.; ADNOY, .; FOSSEN, O.H.; SÖDERQUIST, L. Effect on field fertility of addition of gelatine, different dilution rates and storage times of cooled ram semen after vaginal insemination. **Reproduction Domestic Animal**, v.45, p.706-710, 2010.

PAULENZ, H.; SODERQUIST, L.; PÉREZ-PE, R.; ANDERSEN, B.K. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. **Theriogenology**, v.57, p. 823–36, 2002.

PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. **Equine Veterinary Science**, v.7, p.289-302, 1987.

RESENDE, K.T.; SILVA, H.G.O.; LIMA, L.D. Avaliação das exigências nutricionais de pequenos ruminantes pelos sistemas de alimentação recentemente publicados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.161-177, 2008.

ROCA, J.; MARTÍNEZ, S.; VÁZQUEZ, J.M.; LUCAS, X.; PARRILLA, I.; MARTÍNEZ, E.A. Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15°C. **Animal Reproduction Science**, v.64, p. 103-112, 2000.

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**, v.38, p.1-36, 1995.

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

SALVADOR, I.; YÁNIZ, J.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; GÓMEZ, E.A.; SILVESTRE, M.A. Effect of solid storage on caprine semen conservation at 5°C. **Theriogenology**, v.66, p.974–981, 2006.

SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. Sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v.53, p.1691-1703, 2006.

SIMPLÍCIO, A.A.; VICENTE, J. F.F.; JEFERSON, F. F. Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.234-246, 2007.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; MCCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, (Bulletin, 9) p.1-38, 1999.

STRYPER, L. **Introdução ao estudo das membranas biológicas**. Bioquímica, 3^o Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 230 – 256, 1992.

VERSTEGEN, J.P.; ONCLIN, K.; IGUER-OUADA, M. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris–glucose extender: in vitro and in vivo studies. **Theriogenology**, v.64, p.720-733, 2005.

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

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

YÁNIZ, J.; MARTÍ, J.I.; SILVESTRE, M.A.; FOLCH, J.; SANTOLARIA, P.; ALABART, J.L.; LÓPEZ, G.F. Effects of solid storage os sheep spermatozoa at 15°C on their survival and penetrating capacity. **Theriogenology**, v.64, p.1844-1851, 2005.