

INFLUÊNCIA DA QUALIDADE DO SÊMEN NOS RESULTADOS DE PREENHEZ EM PROGRAMAS DE IATF E TETF

Rubens Paes de Arruda¹; Eneiva Carla Carvalho Celeghini¹; André Furugen Cesar de Andrade¹; Cláudia Fernandes Raphael¹; Karen Regina Peres¹; Luciano Castellar das Neves¹

INTRODUÇÃO

Diversos trabalhos vêm sendo realizados tendo como base o controle hormonal do ciclo estral das fêmeas bovinas e o emprego da inseminação artificial (IA) com o uso do sêmen congelado na forma convencional ou sexado e transferência de embriões (TE) em tempo fixo (IATF e TETF), desobrigando a detecção do estro. Para isso, diferentes fármacos, protocolos e momentos de inseminação são usados com relatos de variação nas taxas de fertilidade (ARRUDA et al., 1997; GARCIA et al., 1999; BARROS; ERENO, 2004; BÓ et al., 2004; MADUREIRA et al., 2004; BARUSELLI et al., 2006; NOGUEIRA; BARROS, 2006).

Após a IA, os espermatozóides depositados no trato genital da fêmea devem atravessar o útero, passar para o oviduto, pela junção útero-tubárica, interagir com o epitélio do oviduto e fertilizar o ovócito (SARTORI, 2004). Para que o espermatozóide seja considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil é necessário que possua morfologia, atividade metabólica e membranas normais. A presença de membranas íntegras é pré-requisito para que os eventos relacionados ao processo de fertilização, como a capacitação espermática, penetração nos revestimentos do ovócito, ligação à zona pelúcida e fusão com o oolema possam ocorrer (YANAGIMACHI, 1994; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1997).

Quando sistemas de IATF e TETF são adotados, há a necessidade do uso do sêmen congelado de vários reprodutores e ainda de várias partidas de sêmen. Deste modo, a não avaliação ou mesmo a falta de critérios na avaliação das partidas poderá afetar sobremaneira a fertilidade de todo o lote de fêmeas, trazendo prejuízos econômicos, visto os gastos com fármacos para a sincronização dos estros, bem como para a indução da ovulação destas fêmeas, além do dispêndio em material, sêmen e tempo.

A redução da fertilidade, associada à inseminação com sêmen congelado, vem sendo atribuída aos processos ocorridos durante a congelação do sêmen, a qual ocasiona danos aos espermatozóides, os quais podem ser ultra-estruturais, físicos, bioquímicos e funcionais, e que levam as membranas espermáticas a apresentarem alteração da assimetria bilipídica (WATSON, 1995; CELEGHINI et al., 2005). Podendo-se ainda incluir a estes danos, a perda de motilidade, alterações na cromatina e na morfologia do espermatozóide, permeabilização e desestabilização das membranas e geração de espécies reativas de oxigênio (WATSON, 2000). O desenvolvimento de técnicas de associação de sondas fluorescentes, que permitam a avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal e da função mitocondrial em sêmen bovino (ARRUDA; CELEGHINI, 2003; CELEGHINI, 2005) tem servido como ferramenta para avaliar os efeitos da criopreservação sobre o sêmen bovino. Forero-Gonzalez (2004) verificou que somente 15% dos espermatozóides permaneceram intactos após o processo de criopreservação. Resultado semelhante foi obtido por Celeghini (2005) com percentuais variando de 18 a 28% após a criopreservação com dois diluidores diferentes.

¹Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal – VRA/FMVZ/USP - 13630-090, Pirassununga-SP, Brasil. (arrudarp@usp.br)

Somando-se a isso, o espermatozóide, como qualquer outra célula, produz espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo originadas do metabolismo normal da célula. Apesar da existência de agentes antioxidantes no sêmen, o balanço entre a produção e a degradação de EROs pode ser alterado, aumentando a produção de EROs, que induz a peroxidação lipídica, uma vez que o espermatozóide contém uma alta concentração de ácidos graxos em sua membrana, principalmente o ácido decosaheptaenóico, que possui seis duplas ligações insaturadas por molécula. Assim, o processo de peroxidação lipídica inicia-se na presença de EROs, que ao ter contato com a membrana espermática, retiram um hidrogênio de uma dupla ligação do ácido decosaheptaenóico, transformando-o em radical livre, extremamente reativo, que por sua vez irá agir em outro ácido decosaheptaenóico. Este processo desencadeia a cascata de peroxidação, causando lesões na membrana plasmática, com perda de fluidez e de sua capacidade de regular a concentração intracelular de íons envolvidos no controle do movimento espermático e, por fim, perda da sua função de fertilização (AITKEN; KRAUSZ, 2001; MARQUES et al., 2002). A geração de radicais livres também pode atingir o DNA no núcleo espermático, promovendo fragmentação. Esta fragmentação é comumente observada nos espermatozoides de indivíduos inférteis e há fortes evidências que estes danos mediados pela ação dos radicais livres sejam induzidos por estresse oxidativo (JANUSKAUSKAS et al., 2003).

BIOTÉCNICAS UTILIZADAS PARA A AVALIAÇÃO DO SÊMEN

Normalmente as avaliações laboratoriais realizadas com o objetivo de estimar o potencial de fertilidade de uma partida de sêmen são: motilidade espermática (%); vigor (1-5); concentração espermática (milhões/dose); anormalidades espermáticas (%) e o teste de termo-resistência (lento ou rápido). Estas avaliações vêm sendo, desde a década de 80, baseadas nas técnicas e padrões mínimos sugeridos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), como apresentado no quadro abaixo:

Motilidade progressiva (%)	30
Vigor (1-5)	3
Espermatozoides com motilidade progressiva ($\times 10^6$ /dose)	10
Motilidade e vigor após TTR (%)	20/2
Defeitos maiores individuais (%)	5
Defeitos menores individuais (%)	10
Defeitos maiores totais (%)	20
Defeitos menores totais (%)	30
Defeitos totais (%)	30

Usualmente, a motilidade espermática é estimada de forma subjetiva, sendo analisada sob microscopia óptica, com uma gota do sêmen entre lâmina e lamínula, estimando-se sua porcentagem visualmente. Enquanto, as anormalidades espermáticas são avaliadas em esfregaços corados ou câmara úmida, em uma avaliação que depende da habilidade do técnico. Entretanto, estudos reportam que este tipo de análise manual é impreciso, mesmo quando executado por técnicos experientes. Esta imprecisão deriva, em parte, da natureza subjetiva dos testes usados, da variabilidade entre técnicos e das diferenças na implementação de padrões para a avaliação (ARRUDA, 2000).

Na tentativa de diminuir esta imprecisão, uma grande diversidade de biotécnicas vem sendo desenvolvidas para a avaliação seminal, das quais podemos citar sistemas de avaliação computadorizada das características seminais (CASA), uso de sondas

fluorescentes para a avaliação das estruturas espermáticas por microscopia de epifluorescência ou sistema de citometria de fluxo, técnicas de sexagem espermática, avaliação de proteínas do plasma seminal, produção de EROs, entre outras.

Com o propósito de obter uma técnica que demonstre maior repetibilidade tanto para motilidade quanto para morfometria espermáticas, diversos sistemas que utilizam a análise computadorizada de imagens têm sido desenvolvidos e empregados. Programas computadorizados para a avaliação espermática podem ser mais objetivos e imprimir maior repetibilidade às avaliações do que a habilidade humana em identificar padrões de motilidade ou de normalidade espermáticas (ARRUDA et al., 2003). O poder de análise deste tipo de teste é dado pela avaliação precisa e acurada dos espermatozóides com alto grau de objetividade, podendo assim aperfeiçoar o processo de avaliação seminal em animais (ARRUDA, 2000; VERSTEGEN et al., 2002). Todavia, ainda não está bem claro qual característica do movimento espermático, determinada pelo CASA, é capaz de prever a fertilidade ou a taxa de fertilização (AMANN, 1989; FERREIRA et al., 1997).

Mais adiante, avanços recentes na tecnologia de coloração têm fornecido novos meios de se avaliar a capacidade funcional de espermatozóides em várias espécies (GARNER; JOHNSON, 1995; ARRUDA et al., 2002a; ARRUDA; CELEGHINI, 2003; CELEGHINI et al., 2004; CELEGHINI, 2005). Dessa forma, a funcionalidade ou integridade das estruturas dos espermatozóides é monitorada por sondas fluorescentes, as quais possuem a capacidade de se ligar a pontos específicos das células, permitindo um diagnóstico mais fácil e direto, na dependência de suas características físicas (CELEGHINI, 2005). A combinação de vários corantes fluorescentes possibilita a avaliação de diversas estruturas celulares simultaneamente. A associação das sondas PI, FITC-PSA e MitoTracker Green FM, tem sido utilizada para avaliar simultaneamente a integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial em bovinos (ARRUDA; CELEGHINI, 2003) e eqüinos (ARRUDA et al., 2002b; CELEGHINI et al., 2004). Os mesmos parâmetros são avaliados nas associações de PI, H342, FITC-PSA e CMXRos; e PI, H342, FITC-PSA e JC-1 (CELEGHINI, 2005).

Embora o uso de sondas fluorescentes por microscopia venha sendo um método eficaz para a avaliação espermática, o número de espermatozóides normalmente examinados por análise não excede 200. A citometria de fluxo surge como uma técnica vantajosa sobre as outras clássicas para a avaliação da célula espermática, uma vez que este sistema automatizado tem a capacidade de examinar 10.000 espermatozóides em menos de um minuto, permitindo maior exatidão nos resultados (ARRUDA, 2000). Por todas estas razões, o método de citometria de fluxo tem sido cada vez mais empregado na avaliação das características espermáticas de diversas espécies de mamíferos (EVENSON, 1980; GARNER; JOHNSON, 1995).

A produção de EROs leva a ocorrência da peroxidação lipídica no espermatozóide, que causa o acúmulo de hidroperóxidos lipídicos na membrana espermática, que posteriormente formam o malondialdeído (MDA), que permanece nos fluidos corporais, podendo ser usado como marcador de peroxidação lipídica. Dentre os diferentes métodos analíticos, a reação com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) é o mais utilizado, onde a reação do MDA com o TBA forma um composto que pode ser mensurado através de absorvância e fluorescência, sendo estes produtos chamados de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (JANERO, 1990). Um outro método utilizado é o emprego de sondas fluorescentes como a C11-BODIPY^{581/591} (4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1, 3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid) que é um análogo de ácidos graxos polissaturados, se incorporando na membrana celular. Enquanto, este fluoróforo está na forma não oxidada, é observada uma fluorescência vermelha, com

comprimento de onda de 580 a 620 nm. Já na presença de EROS, há mudança da fluorescência para verde, cujo comprimento de onda é 495 a 545 nm (BALL; VO, 2002). Quanto à avaliação das proteínas do plasma seminal, Killian et al. (1993) detectaram quatro delas associadas à fertilidade de touros, sendo duas proteínas (26 kDa e 55 kDa) predominantes em touros de alta fertilidade e duas proteínas (16 kDa cada) predominantes em touros de baixa fertilidade. Posteriormente, Cancel et al. (1997) identificaram a proteína de 55 kDa, mais prevalente no sêmen de touros de mais alta fertilidade, como sendo a osteopontina (OPN). Da mesma forma, Gerena et al. (1998) identificaram a proteína de 26 kDa como sendo a lipocalina tipo prostaglandina D sintetase (L-PGDS). Todavia, Roncolletta et al. (1999) encontraram alta incidência de uma proteína com aproximadamente 61,8 kDa em touros da raça Gir cujo sêmen foi considerado de alta congelabilidade, enquanto, Jobim et al. (2002) encontraram a presença das proteínas albumina (66 kDa) e OPN (55 kDa) em sêmen bovino de alta congelabilidade. Apesar de muitos estudos indicarem as proteínas do plasma seminal como marcadores da fertilidade, ainda muitas pesquisas devem ser realizadas para realmente poder responder se tais marcadores são “mito ou realidade?” (SULLIVAN, 2004).

NÚMERO DE INSEMINAÇÕES E CONTROLE DO SÊMEN

O esquema mais utilizado para inseminar doadoras em programas de TETF é o de duas inseminações, 12 e 24 horas após a indução da ovulação (NOGUEIRA; BARROS, 2006; BÓ et al., 2006). No entanto, há uma tendência para redução do custo relacionado ao sêmen utilizado para a TETF. Neste sentido, vários grupos de pesquisa vêm trabalhando no intuito de desenvolver protocolos que utilize apenas uma palheta de sêmen por doadora superestimulada (D’OCCHIO et al., 1998; BARUSELLI et al., 2006).

A redução da quantidade de duas para uma única palheta de sêmen quando as IATFs ocorreram 12 e 24hs após a aplicação do pLH, não reduziu a taxa de viabilidade (número de estruturas recuperadas/embriões viáveis) quando a IATF foi realizada 16hs após o pLH (58,3% e 52,4%, respectivamente; BARUSELLI et al., 2006) ou 24hs após o pLH (66,2% e 52,7%, respectivamente; dados não publicados), segundo citação de Nogueira e Barros, (2006).

No entanto, é importante lembrar que um controle rigoroso do sêmen, antes do início dos trabalhos de TETF, deverá ser seguido, uma vez que, alterações nas características seminais, tais como, concentração, motilidade, morfologia, entre outras, afetam a taxa de fertilização e desenvolvimento embrionário.

USO DO SÊMEN SEXADO

O interesse pela determinação do sexo de animais de produção remonta a época de Hipócrates (460 -370 A.C.). Porém, somente nos últimos trinta anos que ocorreram avanços nessa área.

A técnica de produção *in vitro* de embriões associada ao sêmen sexado apresenta-se, atualmente, como a associação de biotecnologias mais aconselhável para geração de descendentes com o sexo pré-determinado. Devido ao limitado número de espermatozóides contido nas doses comerciais de sêmen sexado, esta técnica maximiza seu aproveitamento em relação à quantidade de embriões produzidos,

podendo até uma dose ser compartilhada entre mais de um animal doador de oócitos (DELL'AQUA Jr et al., 2006).

Além das doses comerciais de sêmen sexado apresentarem concentrações espermáticas inferiores ao convencional, o padrão alterado de movimentação espermática resulta em dificuldade de sedimentação dos espermatozóides após a seleção de *Percoll*, portanto, o número de células recuperadas é menor, resultando em uma concentração inadequada e conseqüentemente, restringindo a quantidade de oócitos que poderiam ser fecundados. A baixa concentração espermática obtida após seleção em gradiente *Percoll* está relacionada com taxas mais baixas de clivagem e conseqüentemente, taxas inferiores de produção de blastocistos, comparando a produção com sêmen convencional ou não sexado (DELL'AQUA Jr et al., 2006).

Nos dias de hoje, a sexagem espermática pela técnica de citometria de fluxo é uma tecnologia valiosa que terá futuramente grande impacto nas criações comerciais. Porém, os efeitos oriundos desta "viagem" pela qual os espermatozóides são submetidos são ainda pouco conhecidos (SUH et al., 2005). Acredita-se que a baixa fertilidade apresentada por algumas partidas de sêmen sexado seja devido ao comprometimento de estruturas espermáticas durante o procedimento de separação ("sorting") das populações de células X e Y.

Para o sucesso da sexagem é preciso levar em conta a susceptibilidade dos gametas quanto à adição da sonda fluorescente, a exposição ao laser, a alta diluição, a elevada pressão, e a resistência às severas mudanças na composição dos meios que ocorre durante o processo de sexagem (MAXWELL et al., 1998).

Têm que se ter em mente que para a produção comercial de doses de sêmen sexado em taxas aceitáveis, os espermatozóides são conduzidos através do aparelho em velocidades que se aproximam aos 90 km/h e a pressão de 50 psi ao deixar o "nozzle". Esta alta pressão e suas seqüelas comprometeriam a viabilidade e a motilidade do espermatozóide, deste modo, reduzindo a fertilidade (SUH et al., 2005). A diminuição da pressão durante o processo de separação de 50 para próximo dos 40 psi aumentou a sobrevivência dos gametas após o "sorting" mantendo a precisão na separação dos espermatozóides carreadores do cromossomo X ou Y (SUH; SCHENK, 2003; CAMPOS-CHILLON; DE LA TORRE, 2003).

Segundo Hossepian de Lima (2006), a aplicabilidade comercial da sexagem dos espermatozóides depende do estabelecimento de uma metodologia que além de ser compatível com o processo de congelamento, minimize a perda de espermatozóides durante o processo e não reduza o poder fecundante dos mesmos. Considerando estes aspectos, é necessário avaliar a qualidade não somente em relação à acuidade de sexagem, mas também no que diz respeito à viabilidade dos espermatozóides portadores do cromossomo X ou Y.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da busca intensa do desenvolvimento de técnicas laboratoriais que predizem com exatidão a fertilidade do sêmen, nenhum teste laboratorial isolado pode, até o momento, estimar seu potencial de fertilização. Tal meta têm sido de difícil obtenção devido à necessidade dos espermatozóides em apresentar diferentes atributos para a fertilização do ovócito. Vale ressaltar a importância da qualidade do sêmen para se obter boas taxas de fertilidade, principalmente nos programas de IATF e TETF, seja com a utilização do sêmen congelado da forma convencional ou sexado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, R. J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*, v.122, p. 497-506, 2001.
- AMANN, R. P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *Journal of Andrology*, v. 10, p. 89-98, 1989.
- ARRUDA, R. P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso demicroscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). 2000. 121 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- ARRUDA, R. P.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; GARCIA, A. R.; LIU, I. K. M. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. *Theriogenology*, v. 58, n. 2, p.253-256, 2002a.
- ARRUDA, R. P.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; LIU, I. K. M. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomal de espermatozoides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 31 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 226-227, 2003.
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos, *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 31 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 230-231, 2003.
- ARRUDA, R. P.; MADUREIRA, E. H.; MIZUTA, K.; GUSMÕES, P. P.; VON ZUBEN, C.; VISINTIN, J. A.; RODRIGUEZ, P. H. M. Sincronização do estro em fêmeas bovinas com o uso de acetato de melengestrol (MGA) – prostaglandina F₂ α e CIDR-B. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.21, n.2, p.97-9, 1997.
- ARRUDA, R. P.; SOUZA, N. L.; MARQUES, A.; CELEGHINI, E. C. C.; GOBESSO, A. A. O.; MEIRELLES, F. V.; BINELLI, M.; BLASQUES, F. J. H. Evaluation of techniques using CFDA/PI, H258/FITC-PSA and Trypan Blue/Giemsa for assessment of the viability and acrosomal integrity of cryopreserved equine spermatozoa. *In: ANNUAL CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY*, 2002, Foz do Iguassu, Brasil, Elsevier, 2002b, v. 57, p. 477.
- BALL, B. A.; VO, A. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY581/591. *Journal of Andrology*, v. 23, p. 259-269, 2002.
- BARROS, C. M.; ERENO, R. L. Avanços em tratamentos hormonais para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em bovinos de corte. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 32 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 23-34, 2004.
- BARUSELLI, P. S.; MARTINS, C. M.; SÁ FILHO, M. F.; GIMENES, L. U.; DE SOUZA, A. L. AYRES, H.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; BÓ, G. A. Protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em *Bos Indicus*. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.34 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 31-38, 2006.
- BÓ, G. A.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L. Manipulação hormonal do ciclo estral em doadoras e receptoras de embrião bovino. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 32 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 1-22, 2004.
- BÓ, G. A.; PICINATO, D.; PERES, L.; CUTAIA, L.; NASSER, L. F.; BARUSELLI, P. S. Protocolos de transferência de embriões em tempo fixo para receptoras de embriões bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.34 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 17-23, 2006.
- CAMPOS-CHILLON L. F.; DE LA TORRE, J. F. Effect of concentration of sexed bovine sperm sorted at 40 and 50 psi on developmental capacity of in vitro produced embryos. *Theriogenology*, v.59, p. 506, 2003.
- CANCEL, A. M.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holdtein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction*, v. 57, n. 6, p. 1293-1301, 1997.
- CBRA: MANUAL PARA EXAME ANDROLÓGICO E AVALIAÇÃO DO SÊMEN ANIMAL. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2. ed. 1998. 49 p.
- CELEGHINI, E. C. C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. 186 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

- CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; BIANCONI, L. L.; RODRIGUES, P. H. M.; ARRUDA, R. P. Efeitos da criopreservação e do diluidor sobre o sêmen bovino quanto às membranas plasmática, acrossomal e função mitocondrial. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 33 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 327, 2005.
- CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J. Simultaneous evaluation of the plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in equine spermatozoa. In: *INTERNACIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION*, 15, 2004, p.511. Porto Seguro. Abstracts... Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004.
- DELL'AQUA JR., J. A.; PAPA, F. O.; ARAÚJO JR., J. P.; FREITAS, C. P.; PONCHIROLI, C. B.; FIGUEIREDO, A. S.; MELO, C. M.; ALBERTI, K.; CRESPILO, A. M.; SIQUEIRA FILHO, E. R.; ORLANDI, C. Aplicação do sêmen sexado na produção de embriões. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 205-212, 2006.
- D'OCCHIO, M. J.; JILLELLA, D.; WHYTE, T.; TRIGG, T. E.; MILLER, D. Tight synchrony of ovulation in superstimulated heifers induced to ovulate with LH: embryo recovery after a single insemination. *Theriogenology*; v. 49: p. 376, 1998.
- EVENSON, D. P. Flow cytometry evaluation of male germ cells. In: YEN, A. (Ed.) *Flow Cytometry: advanced research and clinical applications*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1980, p. 217-46.
- FERREIRA, J. C. P.; NEVES NETO, J. R.; PAPA, F. O. Avaliação computadorizada das características espermáticas de garanhões com fertilidade comprovada. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 21, n. 3, p. 131-32, 1997.
- FORERO-GONZALEZ, R. A. Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino. Tese (doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Pirassununga, 2004. 92 p.
- GARCIA, A. R.; ARRUDA, R. P.; MADUREIRA, E. H.; RODRIGUES, P. H. M.; MARQUES, A. Influência do uso de sêmen resfriado e da aplicação de GnRH sobre a taxa de prenhez de novilhas Nelore inseminadas em tempo fixo. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.23, n. 3, p. 342-4, 1999.
- GARNER, D. L.; JOHNSON, L. A. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide, *Biology of Reproduction*, v. 53, p. 276-284. 1995.
- GERENA, R. L.; IRIKURA, D.; URADE, Y.; EGUCHI, N.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Identification of a fertility associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biology of Reproduction*, v. 58, p. 826-833, 1998.
- HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. Espermatozóide sexado bovino: quando utilizá-lo? *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 213-224, 2006.
- JANERO, D. J. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 9, p. 515-540, 1990.
- JANUSKASKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*, v. 60, p. 743-758, 2003.
- JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBERGO, C. G.; SOUZA, D. O.; CIMAROSTI, H. I.; MATTOS, R. C. Albumina e osteopontina – Proteínas do plasma seminal bovino relacionada com a congelabilidade do sêmen. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 26, n. 3, p. 136-141, 2002.
- KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction*, v. 49, n. 6, p. 1202-1207, 1993.
- MADUREIRA, E. H.; PIMENTEL, J. R. V.; ALMEIDA, A. B.; ROSSA, L. A. Sincronização com progestágenos. *Biotechnology da Reprodução em Bovinos. SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA. 1. Anais...* p. 117-128. 2004.
- MARQUES, A.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; GOBESSO, A. A. O.; NEVES NETO, J. R. Effects of ascorbic acid and pentoxifylline on equine cryopreserved semen submitted to in vitro incubation. *Theriogenology*, v. 58, p. 257-260, 2002.
- MAXWELL, W. M. C.; LONG, C. R.; JOHNSON, L. A.; DOBRINSKY, J. R.; WELCH, G. R. The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in

- the presence or absence of seminal plasma. *Reproduction Fertility and Development*, v. 10, p. 433-440, 1998.
- NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M. Aspectos práticos e perspectivas futuras do modelo P-36 de superovulação em doadoras da raça nelore. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 25-29, 2006.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ZHANG, B. R.; LARSSON, B. Bovine semen quality and the ability to produce embryos *in vivo* and *in vitro*. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, v.25 (Suplemento), n. 1, p. 108-126, 1997.
- RONCOLLETTA, M.; FRANCESCHINI, P. H.; LIMA, V. F. M. H.; RODRIGUES, L. H.; OLIVEIRA, M. A.; SILVA, C. Perfil em SPS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça Gir. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 36, n. 2, 1999.
- SARTORI, R. Fertilização e morte embrionária em bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 32 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 35-50, 2004.
- SUH, T. K.; SCHENK, J. K. Pressure during flow sorting of bull sperm affects post-thaw motility characteristics. *Theriogenology*, v. 59, p. 516, 2003.
- SUH, T. K.; SCHENK, J. L.; SEIDEL, G. E. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. *Theriogenology*, v. 64, p. 1035-1048, 2005.
- SULLIVAN, R. Male fertility markers, myth or reality. *Animal Reproduction Science*, v. 82-83, p. 341-347, 2004.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v. 57, p. 149-179, 2002.
- WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 7, p. 871-891, 1995.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with Cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v. 60-1, p. 481-492, 2000.
- YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. *In*: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1994, p. 189-317.