

Diferentes diluentes sobre a motilidade e integridade de membrana plasmática após o congelamento e descongelamento de sêmen ovino

Different extenders on sperm motility and plasmatic membrane integrity after ovine semen freezing and thawing

CARVALHO, Fausto Paes de^{1*}; SILVA, José Frederico Straggiotti²; SOUZA, Guilherme Valente de^{3*}; QUIRINO, Célia Raquel⁴; CARVALHO, Carla Sobrinho Paes de¹

¹Mestre em Produção Animal, UENF/LRMGA, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

²Doutor em Medicina Veterinária, UENF/LRMGA, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

³Doutor em Produção Animal, UENF/LRMGA, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

⁴Doutor em Melhoramento Genético Animal, UENF/LRMGA, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

*Endereço para correspondência: valente@uenf.br

RESUMO

Foi estudada a influência do leite em pó desnatado, usando-se a técnica de subdivisões da amostragem, sobre a motilidade progressiva e integridade de membrana plasmática, após o congelamento/descongelamento de sêmen ovino. O sêmen foi obtido de quatro carneiros da raça Santa Inês, localizados no distrito de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. Um total de 8 coletas de sêmen por carneiro possibilitou 672 observações, i.e., 32 coletas de sêmen/ 3 diluidores de sêmen / 7 repetições. As observações da motilidade progressiva foram avaliadas no sêmen fresco (Mpi), após a diluição com a fração A do diluente (Mp1), o período de equilíbrio de 2 horas (Mp2), a diluição com a fração B (Mp3), o período de equilíbrio de 14 horas (Mp4), a exposição do sêmen ao vapor de N₂-líquido (Mp5) e o descongelamento (Mp6). A integridade de membrana plasmática foi avaliada por meio dos fluorocromos, diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio no pós-descongelamento (Mp6). Os diluentes utilizados para o congelamento do sêmen foram Tris-Gema, Tris-Gema-Leite e Leite. O diluente Tris-Gema mostrou desempenho superior aos diluentes Tris-Gema-Leite e Leite no que se refere à recuperação da motilidade progressiva após o descongelamento. Os carneiros da raça Santa Inês apresentaram maior integridade de membrana espermática pós-descongelamento quando o sêmen foi congelado no diluente Leite, em relação ao sêmen congelado nos diluentes Tris-Gema e Tris-Gema-Leite. Pode-se concluir que

existe a necessidade de se elucidar o mecanismo de proteção, conferido pelos diluentes estudados, sobre os parâmetros espermáticos, dada a constatação de diferentes especificidades dos diluentes na proteção da motilidade e integridade espermática.

Palavras-chave: carneiros, espermatozóide, reprodução

SUMMARY

The influence at the progressive motility and post-thawing plasmatic membrane integrity of different extenders (Tris-Yolk-based, Tris-Yolk/Skim Milk-based and Skim Milk-based) was studied in rams frozen semen, using a split-sample technique. The semen was obtained from four Santa Inês located in the district Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil. A total of 8 semen collections per ram made possible 672 observations, i.e. 32 semen collections/ 3 semen extenders / 7 observations steps. The progressive motility was determined in the cool semen (Mpi) and after dilution with fraction A of extender (Mp1), a 2-hour balance period (Mp2), dilution in fraction B (Mp3), a 14-hour balance period (Mp4), semen exposure to N₂-liquid vapor (Mp5) and post-thawing (Mp6). The sperm plasmatic membrane integrity was determined by employing fluorochromes carboxyfluorescein diacetate and propidium iodide at post-thawing (Mp6). Tris-Yolk-extender showed a Tris-Yolk/Skim Milk- and Skim Milk-extenders superior performance on recovering the post-thawing progressive motility. The rams presented

the highest post-thawing sperm membrane integrity when the semen was frozen in Skim Milk-extender, in comparison to the Tris-Yolk and Tris-Yolk/Skim Milk-extenders. Concluding, it is necessary to elucidate the protection underlying mechanism conferred by the extenders studied over the investigated sperm parameters, given the finding of different extenders specificities on protecting motility and sperm integrity.

Keywords : reproduction, sheep, sperm

INTRODUÇÃO

O uso da técnica de inseminação artificial com sêmen congelado de ovinos, apesar de permitir a utilização intensiva de reprodutores geneticamente superiores e, conseqüentemente, servir a significativo número de fêmeas por ano, não alcançou, ainda, padrões satisfatórios, na prática. Entre alguns fatores limitantes para seu êxito, encontram-se: a anatomia particular da cérvix uterina da ovelha, o deficiente transporte espermático, as alterações bioquímicas e moleculares dos espermatozoides e a baixa qualidade obtida nas doses de sêmen congelado (MAXWELL et al., 1995; WATSON, 1995; HOLT, 2000; SALAMON & MAXWELL, 2000).

O significado dos componentes macromoleculares em diluentes para a criopreservação de células espermáticas tem sido reconhecido desde Phillips & Lardy (1940), que descreveram o efeito protetor da gema de ovo no congelamento de espermatozoides bovinos. Estudos adicionais com espermatozoides de bovinos (AIRES et al., 2003; DE LEEUW et al., 1993) mostraram que as proteínas e lipídeos presentes na gema de ovo e leite mantêm a sobrevivência espermática durante a criopreservação, porém, em ovinos, a criopreservação de células espermáticas tem recebido pouca atenção por parte dos pesquisadores.

Os diluentes utilizados neste trabalho foram Tris-Gema (TG); Leite-Gema (LG) e Tris-Gema-Leite (TGL).

O leite é um meio isotônico, contendo muitos componentes favoráveis à manutenção da viabilidade do espermatozóide. O sucesso desse diluente tem sido atribuído à sua fração protéica, que pode atuar, como tampão, contra mudanças do pH e, como agente quelante, contra a presença de metais pesados no meio (SALAMON & MAXWELL, 2000). O Tris hidroxymethyl aminomethane (Tris) é usado como principal componente nos diluentes para congelamento de sêmen de bovinos (DAVIS et al., 1963; STEINBACH & FOOTE, 1967), por possuir boa capacidade tampão, atividade osmótica e baixa toxicidade em altas concentrações (NAHAS, 1961). Seu uso como diluente para sêmen de carneiro também tem sido relatado por diversos pesquisadores, desde a primeira metade dos anos 70 (HAHN 1972; ANDERSEN et al. 1973).

Por sua vez, o diluente Tris-glicose, elaborado por Salamon & Visser (1972), é amplamente usado e recomendado para estocagem de sêmen congelado de carneiro (SALAMON, 1976; EVANS & MAXWELL, 1987).

Samper (1992) observou que o diluente Tris-Gema manteve a motilidade espermática por mais tempo do que a Lactose-Gema, em comparação ao diluente de Kenney (KENNEY et al., 1975). No entanto, a recuperação espermática, particularmente, através do filtro contendo Sephadex, que retém espermatozoides lesados, foi significativamente menor para as amostras diluídas em Tris-Gema, em relação à Lactose-Gema e ao diluente de Kenney (KENNEY et al., et al., 1975).

Considerando-se esses aspectos, é de vital importância que sejam incentivadas novas pesquisas, não só sobre as características fisiológicas e físico-químicas da membrana plasmática espermática e sua susceptibilidade às diferentes condições de criopreservação, mas, também, sobre diluentes e crioprotetores, com o propósito de se obter melhores índices de fertilidade nos ovinos.

O objetivo do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa foi contribuir para o estudo da criopreservação de espermatozoides de ovinos, analisando-se o efeito de três diferentes diluentes, sobre a motilidade progressiva e a integridade de membrana plasmática pós-descongelamento.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi executado na região Norte Fluminense (Campos dos Goytacazes –RJ; latitude: 21°45'15'' e longitude: 41°19'28''). Foram utilizados 4 carneiros sexualmente maduros, com idade aproximada de 3 anos, da raça Santa Inês. Foi feita uma coleta/carneiro/semana, através de vagina artificial, modelo IMV Technologies, aquecida à temperatura entre 41°C e 44 °C, utilizando-se uma ovelha contida em tronco tipo guilhotina. Antes da coleta, fez-se a higienização da porção externa do prepúcio e adjacências com água e sabão neutro e, da porção interna do prepúcio, com solução fisiológica 0,9%.

Foram obtidos um total de 32 ejaculados. O volume seminal (Vol.) foi determinado logo após a colheita, mediante a leitura direta no tubo coletor graduado em mililitros, e conservado em banho-maria a 37°C. Por meio da diluição de 5µl de sêmen fresco em 8mL de formol citrato (1:1600), foi feita a contagem para determinar a concentração espermática (Conc.), através de microscópio óptico com aumento de 400 vezes, em câmara hematimétrica de Neubauer. O número total de espermatozoides no ejaculado (NTE) foi obtido, multiplicando-se o volume inicial do sêmen pela sua concentração, e o número de espermatozoides com movimento progressivo (NEMP), mediante multiplicação do NTE pela porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva. Conhecida a dose inseminante que foi pré-estabelecida, o volume do

ejaculado, o NTE e o NEMP, calculou-se o volume do sêmen (µl), que foi adicionado a 5 mL da fração A de cada diluente, correspondendo à concentração de 100×10^6 espermatozoides/mL. Após a adição da fração A, verificou-se a motilidade progressiva (Mp1). Imediatamente após, iniciou-se o processo de resfriamento do sêmen por duas horas até atingir a temperatura de 5°C. Ao final desse tempo, verificou-se a motilidade (Mp2). A fração A foi adicionada a 5mL da fração B (com glicerol) e, passando pela homogeneização, atingiu, na concentração final, 50×10^6 espermatozoides/mL. Após essa adição, antes do envase em palhetas médias, verificou-se novamente a motilidade (Mp3). De acordo com a metodologia utilizada por El Alamy & Foote (2001), o sêmen diluído permaneceu em equilíbrio durante 14 horas a uma temperatura de 5°C.

Decorridas as 14 horas, coletou-se amostra do sêmen e verificou-se a motilidade (Mp4). A análise da motilidade também foi feita após 15 minutos de exposição do sêmen ao vapor de nitrogênio imediatamente antes da imersão das palhetas no nitrogênio líquido (Mp5) e finalmente após seu congelamento/descongelamento (Mp6).

A motilidade progressiva no sêmen fresco (Mpi) foi avaliada por meio da observação em microscópio óptico com aumento de 400x entre lâmina e lamínula, após a diluição com a fração A do diluente (Mp1), o período de equilíbrio de 2 horas (Mp2), a diluição com a fração B (Mp3), o período de equilíbrio de 14 horas (Mp4) e após a exposição do sêmen ao vapor de nitrogênio líquido (Mp5). Decorridos 15 minutos, as palhetas foram imersas no nitrogênio líquido. Passados 30 dias, descongelou-se parte do sêmen, avaliando-se a motilidade (Mp6) por meio da análise computadorizada, utilizando-se o equipamento Hamilton Thorn Research versão 10.8, HTM – CEROS. As avaliações das motilidades (MP1; MP2; MP3; MP4; MP5) foram feitas por meio de microscopia óptica, pelo fato de o local de

coleta do sêmen ser afastado do laboratório, não sendo permitida, assim, a avaliação pelo analisador computadorizado, que se encontrava instalado no laboratório.

A integridade da membrana plasmática foi avaliada, empregando-se a técnica descrita por Harrison & Vickers (1990), na qual dois fluorocromos são utilizados. São eles o diacetato de carboxifluoresceína (FDA) e o iodeto de propídio (IP). Foram consideradas três categorias para a interpretação dos achados: 1) Íntegros – espermatozóides com membrana plasmática íntegra (células coradas pelo FDA, coloração verde fluorescente); 2) Lesados – espermatozóides com membrana plasmática e acrossomal lesadas (células coradas pelo IP, coloração vermelha); 3) Semi-lesadas – espermatozóides com membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra (células coradas pelo FDA na região do acrossoma e núcleo corado pelo IP).

A composição do diluente Tris-Gema (TG) foi: Tris, 40mL (fração A) e 32,5mL (Fração B); Gema, 10mL (A) e 10mL (B); penicilina sódica, 10UI/mL (A) e 10UI/mL (B); sulfato de estreptomicina, 0,01mg/mL (A) e 0,01mg/mL (B); glicerol, 7mL (B); OEP, 0,5 mL (B). O diluente Tris-Gema-Leite (TGL) foi composto de: Tris, 20mL (A) e 16,25mL (B); leite desnatado 9%, 20mL (A) e 16,25mL (B); Gema, 10mL (A) e 10mL (B); penicilina sódica, 10UI/mL (A) e 10UI/mL (B); sulfato de estreptomicina, 0,01 mg/ mL (A) e 0,01mg/mL (B); glicerol, 7mL (B); OEP, 0,5mL (B). A composição do diluente Leite-Gema (LG) foi: leite desnatado 9%, 40mL (A) e 32,5mL (B); Gema, 10mL (A) e 10 mL (B); penicilina sódica, 10UI/ mL (A) e 10UI/mL (B); sulfato de estreptomicina, 0,01mg/ml (A) e 0,01mg/ml (B); glicerol, 7mL (B); OEP, 0,5mL (B). O procedimento para o congelamento e análise dos parâmetros motilidade e integridade de membrana plasmática

espermática foi igual na utilização dos três diluentes.

Os dados experimentais foram processados, utilizando-se o programa Excell®, e analisados pelo SAS (Statistical Analysis System, 1996), em que foram realizadas as análises de consistência dos dados e a estatística descritiva das características estudadas (PROC UNIVARIATE, PROC FREQ., PROC MEANS, SAS, 1996). O modelo para a análise de variância para as características motilidade e integridade de membrana plasmática espermática inclui os efeitos fixos de carneiro e diluente e a interação entre esses efeitos. Como a interação não foi significativa, foi excluída do modelo final da análise. Portanto, o modelo em estudo foi o seguinte:

$$y_{ijk} = \mu + NC_i + D_j + e_{ijk},$$

Em que: y_{ijk} = característica estudada (VOL, CONC, VI, MPI, IMP), μ = média geral, NC_i = efeito fixo do $i^{\text{ésimo}}$ número do carneiro ($i = 1,2,3,4$), D_j = efeito fixo do $j^{\text{ésimo}}$ diluente ($j = 1,2,3$), e_{ijk} = erro aleatório

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A porcentagem de motilidade progressiva inicial do sêmen (M_{pi}) foi igual na análise de cada carneiro para os três diluentes, já que foi avaliada no sêmen nativo, antes mesmo de ter sido fracionado em três porções para a adição dos diferentes diluentes.

Verificou-se, durante o processo de congelamento, redução gradual da motilidade progressiva dos espermatozóides para os tratamentos (Tris-Gema, Leite-Gema e Tris-Gema-Leite), como demonstrado na Tabela 1 e Figura 1.

Essa queda constatou-se após 14 horas da diluição com a fração B (M_{p4}) e após a exposição ao vapor de N_2 -líquido (M_{p5}).

Tabela 1. Motilidade progressiva média do sêmen de carneiros (n=32) no estado nativo (Mpi), após diluição com a fração A (Mp1), após 2 horas da diluição com a fração A (Mp2), após diluição com a fração B (Mp3), após 14 horas da diluição com a fração B (Mp4), após a exposição ao vapor de N₂ líquido (Mp5) e 30 dias após o congelamento (Mp6), submetidos a três diluentes (Dil.): Tris-Gema (TG), Leite-Gema (LG) e Tris-Gema-Leite (TGL)

Dil.	Mpi	Mp1	Mp2	Mp3	Mp4	Mp5	Mp6
TG	68,4±9,5 ^a	65,6±11,0 ^a	63,1±12,3 ^a	60,3±11,2 ^a	52,5±12,7 ^a	29,1±13,6 ^a	46,5±21,7 ^a
LG	68,4±9,5 ^a	61,1±10,4 ^a	56,6±11,5 ^a	50,3±10,2 ^a	41,4±12,8 ^b	18,8±10,7 ^b	26,1±17,1 ^b
TGL	68,4±9,5 ^a	63,7±12,1 ^a	60,3±12,3 ^a	56,9±12,6 ^a	49,1±12,3 ^a	22,8±9,9 ^b	32,1±17,5 ^b

^{a,b}Médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem entre si (P<0,05).

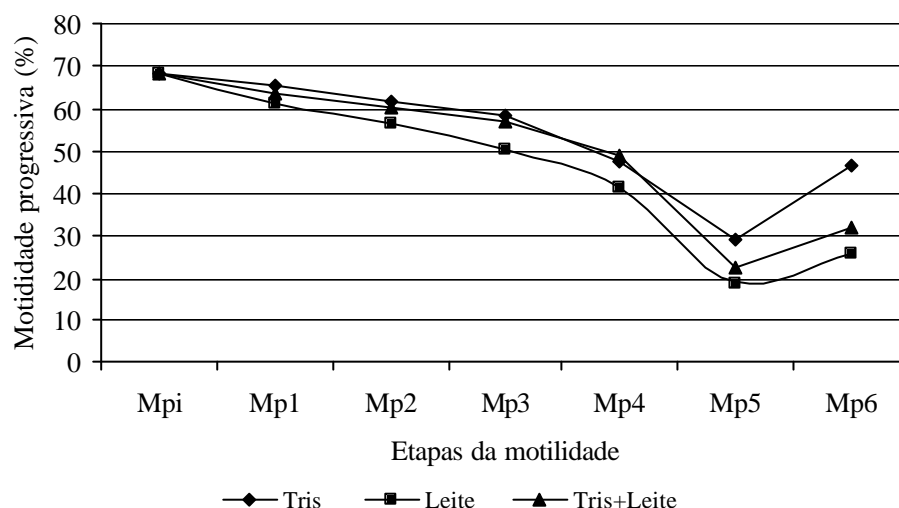


Figura 1. Motilidade progressiva média do sêmen de carneiros (n=32) no estado nativo (Mpi), após diluição com a fração A (Mp1), após 2 horas da diluição com a fração A (Mp2), após diluição com a fração B (Mp3), após 14 horas da diluição com a fração B (Mp4), após a exposição ao vapor de N₂ líquido (Mp5) e 30 dias após o congelamento (Mp6) submetidos à três diluentes (Tris-Gema, Leite e Tris-Gema

As duas primeiras reduções da motilidade espermática (Mp3 e Mp4), muito provavelmente, se devem, em parte, à presença do glicerol, na fração B de todos os diluentes testados, já que alguns pesquisadores (COLAS, 1975; FISER & FAIRFULL, 1984) sugeriram que o glicerol poderia ser tóxico para a célula espermática, causando danos estruturais durante o processo de pré-congelamento e, também, talvez, aos efeitos da transição da fase lipídica em resposta ao resfriamento/reaquecimento (DROBNIS et

al., 1993). Já a redução observada da motilidade progressiva, após a exposição ao vapor de N₂ líquido, decorre, provavelmente, do estresse resultante da interação entre a água e o soluto que acontece por meio da cristalização do gelo, expondo a célula à solução hiper-osmótica e ao intenso afluxo de água e íons através de sua membrana (MAZUR, 1985) que, provavelmente, ainda não se estabilizou decorridos os 15 minutos da exposição ao vapor de N₂-líquido, sendo então

submetida imediatamente ao processo, não menos violento, de reaquecimento.

O aumento da motilidade das células espermáticas aferida após um mês do congelamento (Mp6), em relação a análise da motilidade obtida após a exposição ao vapor de N₂-líquido (Mp5), poderia ser explicado pelo pouco tempo de exposição à temperatura intermediária (-140°C) em relação à temperatura de -196°C (temperatura convencional de armazenamento de espermatozoides criopreservados). Esse fato, portanto, não permitiu que as importantes modificações sofridas pelas células, devido ao congelamento, viessem a se estabilizar, para que, após esse período de estabilização, fossem submetidas novamente a estresse de descongelamento. O sêmen dos carneiros que foi processado com o diluente Tris-Gema (52,5±12,7) apresentou motilidade superior ao processado com Leite-Gema (41,4±12,8), a partir da etapa Mp4, isto é, quando a análise da motilidade foi feita no sêmen em refrigeração após 14 horas da diluição com a fração B, não apresentando diferença em relação ao Tris-Gema-Leite (49,1±12,3) (Tabela 1). A motilidade após a exposição ao vapor de nitrogênio líquido (Mp5) do sêmen processado com Tris-Gema

(29,1±13,6) também foi superior aos processados no Leite-Gema (18,8±10,7) e Tris-Gema-Leite (22,8±9,9). No pós-descongelamento, a motilidade do sêmen processado em Tris-Gema (46,5±21,7) manteve-se superior em relação ao processamento com os diluentes Tris-Gema-Leite (32,1±17,5) e Leite-Gema (26,1±17,1). Esses resultados levaram à constatação de que o diluente Tris-Gema inicia seu efeito benéfico sobre a motilidade antes das células espermáticas serem submetidas ao vapor de N₂ líquido, mantendo-se até o pós-descongelamento. Esses resultados corroboram os achados observados por Samper (1992), que demonstrou que o diluente Tris-Gema manteve maior motilidade em células espermáticas após o descongelamento, quando comparado com os diluentes Lactose-Gema e Kenney (KENNEY et al., 1975), diluente este baseado em leite desnatado.

Na análise comparativa da integridade de membrana das células espermáticas em relação aos três tratamentos (Tris-Gema, Tris-Gema-Leite e Leite-Gema), verificou-se maior porcentagem de células íntegras pós-descongelamento nas porções de sêmen processadas no diluente Leite-Gema (63,17±2,83%), Tabela 2 e Figura 2.

Tabela 2. Integridade de membranas (Íntegro = espermatozoides com membrana plasmática íntegra; Semi-Lesado = espermatozoides com membrana plasmática lesada e membrana acrossomal íntegra; Lesado = espermatozoides com membrana plasmática e membrana acrossomal lesadas) no pós-descongelamento do sêmen de carneiros (n=32) submetidos a três diluentes (Tris-Gema, Leite-Gema, Tris-Gema-Leite)

Diluente	Íntegro	Semi-Lesado	Lesado
TG	47,53±7,87 ^b	23,45±3,10 ^a	29,88±4,18 ^a
LG	63,17±2,83 ^a	13,27±3,93 ^a	24,32±3,94 ^a
TGL	50,20±7,68 ^b	19,65±2,29 ^a	30,10±7,49 ^a

^{a,b}Médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem entre si (P<0,05).

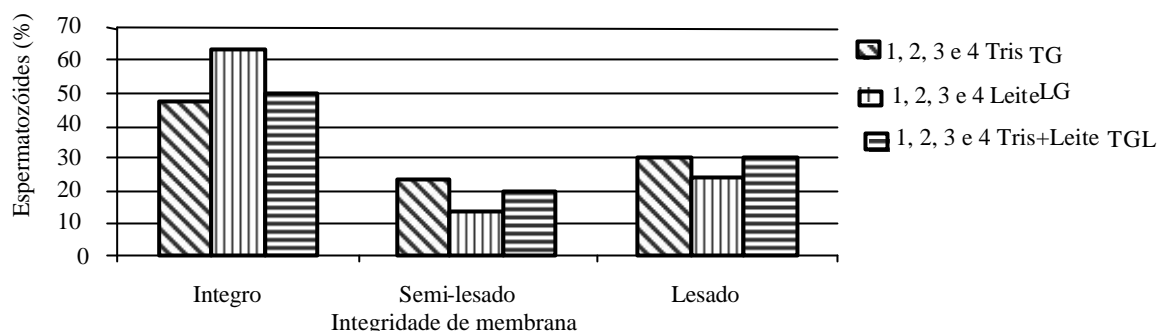


Figura 2. Integridade de membranas (I = espermatozoides com membrana plasmática íntegra, células coradas em verde fluorescente pelo FDA; L = espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal lesadas, células coradas em vermelho pelo IP; SL = espermatozoides com membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra, células coradas pelo FDA na região do acrossoma e núcleo corado pelo IP) no pós-descongelamento do sêmen de carneiros (n=32) submetidos a três diluentes (Tris-Gema, Leite, Tris-Gema-Leite)

Esses resultados concordam com as observações feitas por Samper et al. (1992) e Loseth et al. (1992), os quais afirmam que o diluente Tris-Gema reduz a fertilidade devido à indução de alterações da membrana espermática. Além disso, os resultados obtidos concordam parcialmente com os achados obtidos por Braun et al. (1995), que verificaram melhora significativa na integridade de membrana de células espermáticas congeladas/descongeladas após a adição de Leite desnatado no diluente de Martin et al (1979). O diluente de Martin et al (1979) é um diluente à base de Lactose-EDTA-Gema, muito utilizado na Alemanha para congelamento de sêmen de eqüinos.

O sêmen processado com o diluente Tris-Gema-Leite ($50,20 \pm 7,68\%$) não diferiu estatisticamente do sêmen processado com o Tris-Gema ($47,53 \pm 7,87$) em relação à porcentagem de células íntegras, semi-lesadas e lesadas (Tabela 2 e Figura 2).

Segundo Samper (1992), é sabido que a fertilidade das células espermáticas quando processadas no Tris-Gema é reduzida, em comparação a outros diluentes. Os resultados deste trabalho de pesquisa

corroboram os resultados obtidos por Samper (1992), que verificou o efeito nocivo do Tris-Gema pela provável indução a mudanças da membrana plasmática dos espermatozoides, o que resulta em maior quantidade de células semi-lesadas e lesadas observadas com uso desse diluente, quando feita comparação com o sêmen processado no diluente Leite-Gema.

O diluente convencional Tris-Gema mostrou um desempenho superior aos diluentes Tris-Gema-Leite e Leite-Gema, no que se refere à preservação da motilidade espermática no pós-descongelamento. Com relação à preservação da integridade da membrana plasmática, no pós-descongelamento, o diluente Leite-Gema foi superior aos diluentes Tris-Gema e Tris-Gema-Leite.

Existe a necessidade de se elucidar o mecanismo de proteção conferido pelos diversos diluentes sobre os vários parâmetros espermáticos, devido à constatação de diferentes especificidades dos diluentes na proteção da motilidade espermática e integridade da membrana plasmática.

REFERÊNCIAS

- AIRES, V.A.; HINSCH, K.D.; SCHLOESSER, F.M.; BOGNER, K., SCHLOESSER, S. M.; HINSCH, E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology**, v.60, p.269-279, 2003.
- ANDERSEN, K.; AAMDAL, J.; FOUIGNER, J.A. Intra-uterine and deep cervical insemination with frozen semen in sheep. **Zuchthygiene**, v.8, p.113-118, 1973.
- BRAUN, J.; HOCHI, S.; OGURI, N.; SATO, K.; TORRES-BOGGINO, F. Effect of different protein supplements on motility and plasma membrane integrity of frozen-thawed stallion spermatozoa. **Cryobiology**, v.32, p.487-492, 1995.
- COLAS, G. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.42: p.277-285, 1975.
- DAVIS, I.S.; BRATTON, R.W.; FOOTE, R.H. Livability of bovine spermatozoa at 5, -25 and -85°C in Tris-buffered and citrate-buffered yolk-glycerol. **Journal of Dairy Science**, v.46, p.333, 1963.
- DE LEEUW, F.E.; DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.; VERKLEIJ, A.J.; COLENBRANDER, B. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. **Cryobiology**, v.30, p.32-44, 1993.
- DROBNIS, E.Z.; CROWE, L.M.; BERGER, T.; ANCHORDOGUY, T.J.; CROWE, J.H. Cold shock damage 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.
- EL-ALAMY, M.A.; FOOTE, R.H. Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. **Animal Reproduction Science**, v.65, p.245-254, 2001.
- EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Salomon's artificial insemination of sheep and goats**. Sidney: Butterworths, 1987. 194 p.
- FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W. The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. **Cryobiology**, v.21, p.542-551, 1984.
- HAHN, R. Contribution to the deep freezing-preservation of goat-back and ram semen. **World Review of Animal Production**, v.8, p.80, 1972.
- 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. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3-22, 2000.
- KENNEY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L.; MORSE, G.W. Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. In: ANNUAL CONVENTION AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS, 1975, Boston. **Proceedings...** Boston, 1975. v.21, p. 327.
- LOSETH, K.J.; WOLF, L.; HAMILTON, D.W.; CRABO, B.G. Trapping of *in vitro* capacitated boar spermatozoa in Sephadex and Glass wool filters. INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL

REPRODUCTION A.I, 12., 1992, The Hague. **Proceeding**... The Hague, 1992. v.3, p.1575-1577.

MAZUR, P. Basic concepts in freezing cells. In: JOHNSON L.A.; LARSSON K. (Eds). **Proc first int conf deep freezing boar semen**. Sweden: Univer Agric Sci., 1985. p.97-111.

MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GUNZEL, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volumen straws. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.27, p.47-51, 1979.

MAXWELL, W.M.C.; LANDERS, A.J.; EVANS, G. Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubs. **Theriogenology**, v.43, p.1201-1210, 1995.

PHILLIPS, P.H.; LARDY, H.A. A yolk-buffer pabulum for preservation of bull sperm. **Journal of Dairy Science**, v.23, p.399-404, 1940.

SALAMON, S. Fertility of ram and boar semen after long-term storage. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION A.I., 8., 1976, Cracaw. **Proceeding**...Cracaw, 1976. p.1069-1070.

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

SALAMON, S.; VISSER, D. Effect of composition of Tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.25, p.605-618, 1972.

SAMPER, J.C.; LOSETH, K.J.; CRABO, B.G. Effect of extender and concentration of sperm on motility and filtration recovery. **Theriogenology**, v.12: p.27-33, 1992.

SAMPER, J.C. Evaluation of cryopreserved semen: an alternative assay. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.88, p.59-65, 1992. Suppl

SAS. **Statistical Analysis System**, Care, 1996.

STEINBACH, J.; FOOTE, R.H. Osmotic pressure and pH effects on survival of frozen bovine spermatozoa. **Journal of Dairy Science**, v.50, p.205, 1967.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thaw function. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p. 871-891, 1995.

Data de recebimento: 27/08/2007

Data de aprovação: 02/07/2008