



Glicina Gema Leite para criopreservação de sêmen de carneiros sem raça definida

Glycine Yolk Milk for crossbred rams semen cryopreservation

Antonio Carlos Duenhas Monreal¹, Natali Nascimento Lima¹, Albert Schiaveto de Souza¹, Maria Inês Lenz Souza¹, Simone Marques Caramalac¹, Silvana Marques Caramalac¹, Mariana Adalgiza Gilberti Urt¹

¹ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Cidade Universitária, Laboratório BIOCAPRI, Avenida Senador Filinto Muller, 2430A, Campo Grande/MS, CEP: 79.070-900, E-mail: antonio.monreal@ufms.br

Recebido em: 18/04/2013

Aceito em: 03/10/2013

Resumo. A criopreservação de sêmen ovino é uma importante ferramenta tecnológica para o melhoramento genético nessa espécie. Entretanto, alguns obstáculos devem ser superados para que as características seminais essenciais a reprodução sejam mantidas. O presente trabalho buscou avaliar e comparar a eficiência dos diluidores TRIS e Glicina Gema Leite em busca de uma criopreservação que mantivesse os índices de mobilidade e vigor mais próximos possíveis a do sêmen fresco. Para o estudo foram utilizados seis carneiros nativos, obtendo-se dois ejaculados por semana de cada animal até atingir um total de 30 doses de sêmen por diluidor para todos os carneiros. O sêmen foi analisado em microscopia de campo claro. Comparando-se as médias obtidas, estatisticamente, foram observadas diferenças significativas entre os resultados dos diferentes diluidores quanto aos fatores analisados (motilidade e vigor) após o descongelamento. Os resultados permitem inferir que o meio diluidor Glicina Gema Leite apresenta melhor eficiência em criopreservar o sêmen ovino após o congelamento se comparado ao diluidor TRIS, quando os fatores motilidade e vigor foram analisados. Mais estudos são necessários para verificar a integridade de membrana do espermatozoide.

Palavras-chave. Diluidor, ovino, congelação

Abstract. Cryopreservation of ram semen is an important technological tool for genetic improvement of this species. However, some obstacles must be overcome for seminal characteristics essential to reproduction are maintained. This study aimed to assess and compare the efficiency of Glycine Yolk Milk and TRIS extenders in search of a cryopreservation that kept the indices of mobility and force as close as possible to the fresh semen. To study the native six sheep were used, yielding two ejaculates per week for each animal to reach a total of 30 doses of semen extender for each ram. Semen was analyzed in bright field microscopy. Comparing the averages, statistically significant differences were observed between the results of different extenders regarding factors analyzed (motility and vigor) after thawing. The results may imply that means thinner Glycine Yolk Milk has a better efficiency in sheep cryopreserve semen after freezing compared to TRIS, when the force and motility factors were analyzed. More studies are needed to verify the integrity of the sperm membrane.

Keywords. Diluter, ram, freezing

Introdução

A criopreservação de sêmen é uma importante técnica usada para o aprimoramento da reprodução em diferentes espécies. Crioprotetores são substâncias que oferecem energia, proteção e um ambiente favorável à sobrevivência das células armazenadas (Silva & Guerra, 2011). Entre as vantagens que ela oferece está a possibilidade de

armazenamento e transporte por longos períodos de tempo, permitindo assim o uso de combinações genéticas de animais localizados em propriedades distantes e a conservação de sêmen de um reprodutor para inseminação futura, além do controle de transmissão de doenças e contaminantes (Fernandes, 2012). Assim o congelamento do sêmen permite o melhoramento genético das espécies,



através da seleção de animais cada vez mais produtivos.

No mercado há diversos diluidores que buscam manter as características seminais essenciais à reprodução, os quais agem sob o ponto de congelação da solução, momento em que ocorre a formação dos cristais de gelo. A sua estrutura molecular possui afinidade pela água, favorecendo a ligação de pontes de hidrogênio alterando a orientação das moléculas de água dos cristais de gelo, criando um ambiente menos prejudicial à célula (Soares & Guerra, 2009). A motilidade e vigor dos espermatozoides devem ter seus valores próximos ao do sêmen fresco, para a possibilidade de elevados índices reprodutivos. Entretanto a taxa de fertilidade de sêmen pós-congelado é significativamente menor se comparada com o sêmen fresco (Watson, 2000). Entre as causas que contribuem para os baixos índices de fertilidade estão a depressão completa dos processos metabólicos, que, com o passar do tempo em essência esgotam os espermatozoides (Gillan et al., 2004), os sérios prejuízos causados às membranas plasmática e acrossomal durante o resfriamento, congelação e descongelação (Parks & Graham, 1992) e a redução da viabilidade destes no trato genital feminino (Barbas et al., 2005). Além disso, na espécie ovina, há particularidades de membrana do espermatozoide que levam à diminuição da atividade respiratória, criocapacitação em larga escala, modificação da interação com as células do oviduto e pequeno incremento nas taxas de mortalidade embrionária, (Bicudo et al., 2007) prejudicando ainda mais a taxa de fecundação.

O presente trabalho objetivou a análise do diluidor Glicina Gema Leite na manutenção das características de motilidade e vigor do sêmen fresco e congelado/descongelado em comparação ao TRIS, como um criopreservante alternativo visando maior taxa de fecundação.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no período de abril a junho de 2011 no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Pequenos Ruminantes (BIOCAPRI) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS na cidade de Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil (latitude 20° 30'38,59"S, longitude 54° 37'18,04"W).

Foram utilizados e condicionados à vagina artificial seis carneiros nascidos e criados em Mato Grosso do Sul com idade de 12 meses. Esses

carneiros foram previamente submetidos a exame clínico geral e específico para comprovação de higidez, sob o ponto de vista sanitário e reprodutivo. Mantiveram-se os animais em regime de confinamento, sob luminosidade natural, com manejo alimentar em silagem de milho fornecida duas vezes ao dia (início da manhã e final da tarde), suplementação protéica (18% PB), na quantidade de 400g dia⁻¹ animal⁻¹ e sal mineral e água *ad libidum*. O experimento foi conduzido em condições naturais de temperatura (média máxima de 30°C e mínima de 20°C), precipitação pluviométrica (168,75mm), umidade relativa e radiação solar. Foram utilizados dois diluidores: TRIS e Glicina Gema Leite na presente experimentação.

O diluidor TRIS (Vetec Química Fina LTDA – Cód 312) foi processado no BIOCAPRI conforme composição proposta por Evans e Maxwell (1990). A solução de TRIS foi composta por 700 mL de água milli-Q, 25, 235 g de TRIS, 14,168 g de ácido cítrico e 10,416 g de frutose. A partir dessa solução foi preparada a solução glicerolada para a congelação, composta por 343 mL de solução TRIS, 100 mL de gema de ovo, 32 mL de água milli-Q e 25 mL de glicerol, de modo a desenvolver o diluidor TRIS 5% glicerol e 10% gema.

O diluidor Glicina Gema Leite (Gonzalez, 1996) também foi processado no BIOCAPRI, sendo composto pelas soluções A (glicina 1,4 g, citrato de sódio 2,97 g e água destilada 100 mL) e B (frutose 3 g, água destilada 100 mL). Para a congelação, misturou-se as soluções A+B (54 mL), com 20 mL de gema de ovo; 0,40 mL de *Orvus es Paste*; 15,00 mL de leite desnatado(11%) e 10 mL de glicerol, formando o diluidor Glicina Gema Leite 10% glicerol e 20% gema.

Obtiveram-se os ejaculados semanalmente, sendo duas colheitas semanais por carneiro durante o período de fevereiro a abril de 2012, pelo método da vagina artificial de modelo curto (Mies Filho, 1987), usando uma fêmea como manequim. Desse modo, foram realizadas 32 coletas por animal, tendo cada amostra volume entre 0,5 ml a 1 ml. A vagina artificial foi aquecida em temperatura média de 40°C e teve como revestimento uma mucosa de borracha. Encaixou-se um funil de silicone na vagina e na sua extremidade mais fina foi acoplado um tubo de *falcon* de plástico. Esse mesmo tubo foi revestido externamente com papel alumínio, para evitar a incidência de raios solares. Em seguida, após a colheita do sêmen encaminhou-se o tubo ao laboratório, para a realização da análise das amostras.



Após cada colheita, os ejaculados foram mantidos em banho-maria a 36°C e em seguida submetidos às avaliações macroscópicas de volume em mL, aspecto (aquoso, leitoso e cremoso) e cor, e microscópicas de motilidade (0-100%), vigor (0-5) e concentração ($\times 10^6$), de acordo com a metodologia empregada por Chemineau et al. (1991). Apenas um pesquisador avaliou todas as amostras de sêmen para motilidade e vigor em microscopia de campo claro seguindo as recomendações do CBRA(1998).

- Motilidade Progressiva: avaliação subjetiva de uma alíquota (20 μ L) de sêmen colocado entre lâmina e lamínula previamente aquecida a 37°C e visualizada em microscopia óptica de campo claro.
- Vigor: avaliação subjetiva, sendo uma expressão da velocidade com que os espermatozóides se movimentam no campo. O resultado foi expresso em uma escala de 0 a 5, sendo 0 ausência de movimento e 5 movimento intenso (Pacheco et al, 2009)

Após a determinação da concentração espermática realizou-se o cálculo do rendimento do número de doses do ejaculado assim como os volumes totais, necessários para proceder-se à diluição, levando-se em consideração que cada dose inseminante deveria possuir uma concentração de 100×10^6 espermatozóides envasados em palhetas francesas de 0,25 mL.

Cálculo foi feito com base na concentração encontrada, motilidade, volume do ejaculado, concentração desejada por dose de sêmen (100×10^6) e volume da palheta (0,25 ml). Chegando-se ao seguinte cálculo:

- Número de doses = [] do ejaculado x motilidade x volume ejaculado / 100×10^6
- Volume total = número de doses x 0,25 ml
- Volume de diluidor a ser adicionado = volume total – volume ejaculado

Após o cálculo do volume final, diluiu-se o sêmen *in natura* nos meios Glicina Gema Leite e TRIS totalizando 30 palhetas para cada carneiro. Em seguida, procedeu-se o envase mecânico em palhetas francesas de 0,25 mL, as quais foram lacradas com álcool polivinílico. Durante as etapas de diluição e envase do sêmen, as amostras e os meios diluentes foram mantidos em banho-maria a 36°C.

Ao término do envase as palhetas foram submetidas ao resfriamento em refrigerador sob temperatura de 5°C, onde permaneceram por três horas. Imediatamente após o resfriamento, iniciou-se curva de estabilização em vapor de nitrogênio

líquido mediante o acondicionamento das amostras em caixa de isopor convencional de 35L a uma distância fixa de cinco cm acima do nível do nitrogênio por 20 minutos. Decorrido o período de estabilização, procedeu-se o congelamento das amostras por imersão direta no nitrogênio líquido. Em seguida as palhetas foram raqueadas e armazenadas em botijão de nitrogênio a -196°C até a sua descongelação e análise após uma semana da congelação.

As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 36°C por 30 segundos sendo o sêmen acondicionado em *eppendorfs* de 1,5 mL previamente aquecidos e mantidos em banho-maria seco a 36°C. Em seguida o sêmen descongelado foi submetido às mesmas técnicas de avaliação seminais (motilidade e vigor) feitas anteriormente à congelação.

A comparação entre os momentos de análise, em relação à variável motilidade dos espermatozóides foi feita por meio do teste t-Student pareado. A comparação entre os diferentes meios utilizados para a crioproteção, em relação às variáveis motilidade e perda da motilidade, foi também realizada por meio do teste t-Student. A comparação entre os momentos de análise, em relação à variável vigor dos espermatozóides, foi realizada por meio do teste de Wilcoxon, enquanto a análise entre os diferentes meios utilizados para a crioproteção, em relação às variáveis vigor e perda do vigor, foi realizada por meio do teste de Mann-Whitney. Os demais resultados das variáveis avaliadas neste estudo apresentaram-se na forma de estatística descritiva ou na forma de tabelas e figuras. A análise estatística foi feita utilizando-se o “*Software*” *SigmaStat*, versão 2.0, considerando um nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

É controversa a eficácia da utilização do Tris-padrão (base de leite ou com citrato de sódio) como criopreservante. Segundo Aisen et al. (2002) o uso deste diluente apresenta vantagens na estocagem de sêmen de carneiros, por manter a motilidade por longos períodos de tempo e prolongar a viabilidade acrossômica até 30 horas quando comparado com outros diluentes (Paulenz et al., 2003). Entretanto, nesse experimento, apesar de ter usado como grupo controle, o meio Tris não apresentou superioridade em relação ao grupo do diluente Glicina Gema Leite (GGL).

A motilidade antes da congelação apresentou-se superior se comparada com a pós-



descongelamento para ambos os diluentes (Tabela 1). Uma queda na motilidade é sempre esperada, visto que durante o processo de congelação-descongelamento, os espermatozoides são submetidos às condições adversas como desidratação, mudanças da fase de transição dos fosfolípidios da membrana, efeito solução e a formação de gelo intracelular (Parks & Graham, 1992). Nur et al. (2010) avaliaram motilidade e defeitos acrossomais com o uso de diferentes criopreservantes (glicerol, 1,2-propanediol, sucrose e trealose) e concluíram que os processos de congelamento e descongelamento levaram ao decréscimo da motilidade e integridade acrossomal, independente do meio utilizado. Na pré-congelação o sêmen diluído no meio Tris apresentou melhor motilidade que o sêmen diluído no meio GGL (GGL = 74,00±5,48%; Tris = 76,77±2,96%). Essa diferença foi significativa (P=0,349). Isso pode ser devido ao processamento do sêmen e dia de colheita, uma vez que nem sempre foi possível a divisão da dose de sêmen para os dois diluentes,

devido ao baixo volume (amostras de 0,5ml).

Resultados semelhantes de diluentes com glicina com e sem glicerol também foram testados por Valente et al. (2010), conseguindo valores de motilidade semelhantes ao deste experimento para espermatozoides de carneiros, com 14 ejaculados e 168 palhetas testadas.

O Tris apresentou maior perda de motilidade se comparado com o meio GGL (Tris= 52,50±12,80%; GGL= 36,90±6,10%). Nota-se que, as amostras de sêmen congeladas no meio Tris apresentaram maior motilidade antes da congelação, entretanto na pós-descongelamento obtiveram-se médias inferiores as do GGL. Desse modo observa-se que houve maior queda de motilidade para o meio Tris em relação ao diluidor GGL. Segundo Bilodeau et al. (2002) é comum, ao se utilizar o Tris-gema de ovo na congelação de sêmen bovino, observar quedas de cerca de 50% da motilidade no sêmen descongelado em relação ao sêmen fresco.

Tabela 1. Motilidade e vigor dos espermatozoides nos meios GGL e TRIS, avaliados antes e após a crioproteção e a perda de motilidade e vigor entre os dois momentos, Campo Grande, 2012.

Variável	Meio	Momento		Perda
		Antes	Depois	
Motilidade	GGL	74,00±5,48Ba	37,10±4,51Ab	36,90±6,10B
	Tris	76,72±2,65Aa	24,28±12,48Bb	52,44±11,45a
Vigor	GGL	4 (4-4)Aa	4 (3-4)Aa	0 (0-1)B
	Tris	4 (3-4)Aa	1,5 (1-2)Bb	2,5 (1-3)A

Os dados de motilidade estão expressos em percentagem média ± desvio padrão da média, já os referentes ao vigor estão expressos em mediana (mínimo-máximo). Letras maiúsculas diferentes nas colunas, para a mesma variável, indicam diferença significativa entre os meios, enquanto letras minúsculas diferentes nas linhas, para o mesmo meio, indicam diferença significativa entre os momentos.

Verificou-se redução significativa da motilidade na pós-descongelamento para os dois meios (GGL= P<0,001; Tris= P<0,001), contudo o diluidor GGL foi mais eficiente na manutenção da motilidade do que o Tris (GGL= 37,10±4,51%; Tris= 24,27±13,96% / p=0,039). O Tris apresentou maior perda de motilidade que o GGL (Tris= 52,50 ± 12,80%; GGL= 36,90 ± 6,10%). Independentemente do diluidor utilizado, esta perda pode ser atribuída à interrupção da disponibilidade de energia produzida na peça intermediária ao axonema, e isso não apenas reduz o número de espermatozoides móveis, como também afeta o tipo de motilidade (Gillan et al., 2004).

O vigor antes do congelamento apresentou-se equivalente para os diluentes (P=1,00). O Tris apresentou diminuição significativa de vigor na pós-descongelamento em relação ao sêmen fresco (P<0,001), o que não ocorreu com o diluente GGL (P=0,008). Portanto, pode-se notar a superioridade significativa do vigor apresentado pelo grupo GGL na pós-descongelamento em comparação ao vigor apresentado pelo grupo Tris (P=0,008). Quando se compara a perda de vigor, mais uma vez o GGL demonstra-se superior ao Tris com uma perda significativamente inferior (P=0,008).

A perda do vigor dos espermatozoides ocorre devido a soma de danos sofridos por eles no

processo de criopreservação. Os gametas são submetidos a choque térmico durante o processo de congelamento, levando a transição de fase dos lipídios da membrana celular. Isso ocasiona alterações dos canais protéicos, aumentando a permeabilidade da membrana após a refrigeração (Cârama & Guerra, 2011). Menciona-se também a perda de várias enzimas que ocorre devido aos danos a membrana em decorrência do processo de congelamento (Gillan et al., 2004). O alto teor de gema no criopreservante Glicina Gema Leite pode interferir neste processo por fornecer substâncias que protegem a membrana celular do espermatozóide durante o procedimento.

Lesões oxidativas também levam ao decréscimo da eficácia de sêmen criopreservado. Com o aumento das moléculas pró-oxidativas produzidas, as chamadas espécies reativas do oxigênio, há o dano para a membrana lipídica e ao DNA, levando até a morte celular (Papa, 2013). Alterações físicas na membrana também ocorrem: a fluidez desta acaba diminuindo durante a queda de temperatura a qual os espermatozóides são submetidos.

Na Figura 1 observa-se que o meio GGL proporcionou menor perda de motilidade na pós - congelação além de menor variação em comparação ao meio Tris em seus resultados.

Na figura 2 observa-se que a perda de vigor do meio GGL sofreu variação menor que o meio Tris, porém o segundo mais uma vez teve menor aproveitamento, ou seja, maior perda de vigor.

A gema de ovo tem sido considerada para a composição de substâncias crioprotetoras. Estudos demonstram que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) preservam a integridade da membrana espermática e do DNA, tornando-o resistente ao choque térmico. Em sêmen de ovinos, o LDL se liga fortemente a membrana espermática. A gema, que é rica em LDL, doa lipídeos para a membrana do espermatozóide, protegendo-o e mantendo a razão colesterol / fosfolipídios, preservando a integridade dos gametas (Neves & Henry, 2012). Moussa et al. (2002) chegaram às mesmas conclusões em seu estudo, que utilizou várias concentrações de LDL purificado na congelação de sêmen de touros. A lecitina, outro componente da gema, também auxilia a proteção dos espermatozóides por recompor os fosfolipídios perdidos no choque térmico. Além disso, ela atua também como protetor osmótico, conferindo aos gametas maior tolerância às soluções hipo e hiperosmóticas (Rodello et al., 2011).

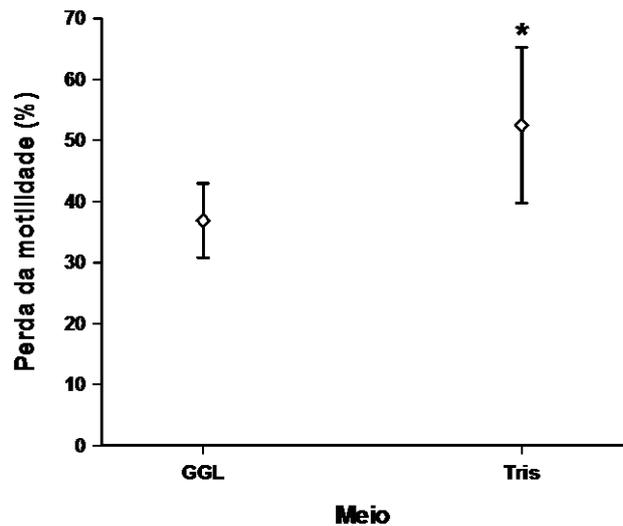


Figura 1. Perda de motilidade dos espermatozóides criopreservados em meio contendo GGL ou Tris. Cada símbolo representa a média e a barra o desvio padrão da média. * Diferença significativa entre o meio contendo GGL (teste t-student, $P=0,039$), Campo Grande, 2012.

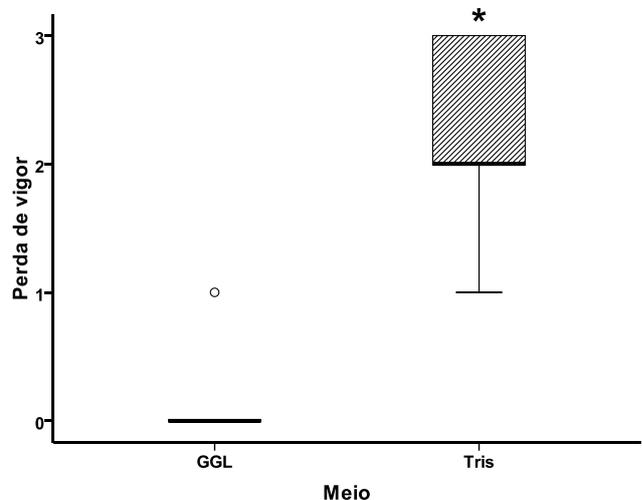


Figura 2. Box plot ilustrando a perda de vigor dos espermatozóides criopreservados em meio contendo GGL ou Tris. A linha horizontal representa a mediana, a caixa representa o intervalo interquartil (25 e 75%) e a barra representa a faixa de variação (mínimo ao máximo). * Diferença significativa em relação ao meio contendo GGL. O círculo representa valor discrepante (*outlier*) (teste de Mann-Whitney, $P=0,008$).

Baseado nos benefícios oferecidos pela gema de ovo na criopreservação, Gil et al. (2003) pesquisaram diferentes concentrações de gema em diluentes a base de leite, em busca do desenvolvimento de um crioprotetor mais eficaz.



Eles demonstraram em seu estudo que não houve melhora significativa das características espermáticas ao utilizarem-se concentrações de gema acima de 5%, exceto na porcentagem de membranas intactas, onde preparações contendo 10% de gema de ovo apresentaram resultados significativamente melhores. No presente estudo, o grupo GGL (gema de ovo 20%), apresentou melhores resultados de motilidade e vigor quando comparados com o grupo TRIS (10% gema), de modo que as diferentes concentrações de gema podem ter sido determinante para os resultados obtidos.

Entretanto, questões referentes ao uso de gema de ovo como crioprotetor tem sido levantada devido a sua composição variada e ao risco sanitário em veicular microorganismo em locais em que estes não são encontrados ou que possam diminuir a taxa de fertilização pelo espermatozóide (Rodello et al., 2011), a menos que se utilizem ovos livres de patógenos.

O leite desnatado, quando utilizado na composição dos diluentes, fornece aos espermatozoides um meio isotônico, protegendo-os da desidratação que um meio hipertônico ocasionaria (Merymann et al., 1977). Entretanto Jafaroghli et al. (2011) demonstraram que os espermatozoides de ovinos são capazes de tolerar bem diluentes hiperosmóticos, pois estes meios proporcionam uma remoção parcial da água dos gametas antes do congelamento. Esta “leve” desidratação diminui o volume do potencial gelo intracelular que se forma durante o resfriamento e congelamento. Além disso, sua composição protéica atua como tampão de solução contra as trocas de pH, e seus sais minerais possuem propriedades quelantes, quando associados com metais pesados (Gonzalez, 1996). Esses fatores resultam em maior taxa de sobrevivência espermática, em relação ao meio lactose-gema de ovo, como Colas (1975) demonstrou. Paulenz et al. (2002) demonstraram que o líquido seminal resfriado e mantido a 5°C em diluentes a base de leite leva a melhores índices de fertilidade se comparado com diluidores a base de TRIS.

Os resultados obtidos no presente experimento foram semelhantes aos apresentados por Souza et al. (2003) quando trabalharam com carneiros Ideal - Polwarth e sêmen congelado com glicina gema, sendo que o ejaculado de sêmen fresco foi superior em volume e motilidade e apresentou capacidade de congelamento o ano todo quando comparado a essa experimentação.

A adição de trealose (100mM) em sêmen congelado em palhetas utilizadas em inseminação artificial em ovelhas melhorou a taxa de concepção das fêmeas inseminadas, mostrando que os diluentes podem ser melhorados cada vez mais para aumentar a fertilidade em sêmen de ovinos (Jafaroghli et al., 2011), sendo que a motilidade esteve próxima aos valores obtidos ao desta experimentação para a congelação do sêmen. Toniato et al. (2010), ao compararem trealose (100mM) e LDL (8%) (adicionado ao diluente TRIS) aos diluentes gema de ovo e glicerol, obtiveram valores de motilidade e integridade de membrana semelhantes aos crioprotetores tradicionais, no pós-descongelamento. Desse modo, demonstrou-se que os espermatozoides de ovinos toleram diluentes hiperosmóticos, e que o açúcar pode ser incorporado de forma eficiente (Jafaroghli et al., 2011).

Yániz et al. (2011) apresentaram estudos em que o diluente Tris não é a melhor escolha para ser usado em sêmen de carneiros, bem como para congelação do sêmen, pois causa drástica modificação nos parâmetros cinéticos espermáticos durante a estocagem a 15°C, interferindo com o metabolismo do cálcio, respiração enzimática mitocondrial, porém sendo reversível. Em quantidades de 10 a 50 mM tem relatos de pouco efeito sobre a motilidade e metabolismo espermático e em altas concentrações melhora seus efeitos principalmente a do pH (Evans & Maxwell, 1990), entretanto, nesta experimentação apresentou-se inferior ao grupo GGL, porém ainda é alternativa para a congelação do sêmen de carneiros.

Conclusão

O diluidor Glicina Gema Leite apresentou maior eficiência que o diluidor Tris na congelação do sêmen de ovinos nativos de Mato Grosso do Sul, quando somente os parâmetros motilidade e vigor foram avaliados.

Projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de ética da CEUA/UFMS em experimentação animal, sob protocolo nº 271 de 19 de agosto de 2010 e com recursos da FUNDECT-MS.

Referências

- AISEN, E.G.; MEDINA, V. H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentration. *Theriogenology*, v. 57, p. 1801- 1808, 2002.
- BARBAS, J.P.; BAPTISTA, C.C.; HORTA,



- A.E.M. Comparação entre dois métodos de congelamento de sêmen de carneiros Merino Regional e Serra da Estrela ao longo do ano. Vale do Santarém – Portugal. Departamento de Reprodução Animal, Estação Zootécnica Nacional. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.104, p. 61-79, 2005.
- BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C.; MAIA, S. M.; GREEN, R. E.; RODELLO, L. on ram semen cryopreservation applied to artificial insemination programs and embryo technology. **Acta Scientiae Veterinariae**, p. 787-792, 2007.
- BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; CORMIER, N.; SIRARD, M. A. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine motility in egg yolk TRIS extender: protection by pyruvate, metal chelator and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, v.57, n.3, p.1105 - 1022, 2002.
- CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p. 33-40, 2011.
- CHEAMINEAU, P.; COGNIE, Y.; GUERIN, Y.; ORGEUR, P.; VALLET, J. C. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Rome, Italy, 223p., 1991.
- COLAS, G. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilization ability of deep-frozen ram semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.42, p.277-85, 1975.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.
- EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Inseminación Artificial de Ovejas y Cabras**. Zaragoza: Editorial Acribia, 4. ed., p.143-165, 1990.
- FERNANDES, G. O. **Efeito de antibacterianos na qualidade espermática e na microbiota do sêmen ovino**. 2012. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília. 2012.
- GIL, J.; LUNDEHEIM, H.; SÖDERQUIST, L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. **Theriogenology**, v. 59, p. 1241-55, 2003.
- GILLAN, L.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. **Reproduction, fertility, and development**, v. 16, n. 4, p. 447-54, 2004.
- GONZALEZ, C. I. M. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozoide bovino**. 1996. 135f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 1996.
- JAFAROGHLI, M.; KHALILI, B.; FARSHAD, A.; ZAMIRI, M. J. The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. **Small Ruminant Research**, v.96, p.58-63, 2011.
- MERYMAN, H. T.; WILLIAMS, R. J.; DOUGLAS, M. S. Freezing injury from “solution effects” and its prevention by natural or artificial cryopreservation. **Cryobiology**, v.14, p. 287 – 302, 1977.
- MIES FILHO, A. Inseminação artificial. 6ª Ed; Porto Alegre: Sulina, v.2., 1987.
- MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 57, p. 1695-706, 2002.
- NEVES, M. M.; HENRY, M. Gema de ovo de galinha e a ação protetora de suas lipoproteínas de baixa densidade na criopreservação do sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, n.4, 0.209-14, 2012
- NUR, Z., ZIK, B.; USTUNER, H.; SAGIRKAYA, H.; OZGUDEN, C. G. Effect of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and



- DNA integrity. **Theriogenology**, v.73, p. 1267-75, 2010.
- PACHECO, A.; MADELLA OLIVEIRA, A. F.; QUIRINO, C. R.; LANDIN, A. V. Características seminais de carneiros da raça Santa Inês na pré-puberdade, puberdade e na pós-puberdade. **Ars Veterinária**, v. 25, n. 2, 2009
- PAULENZ, E.; SÖDERQUIST, L.; ADNØY, T.; FOSSEN, O. H.; BERG, K. A. Effect of milk- and TRIS-based extenders on the fertility of sheep inseminated vaginally once or twice with liquid semen. **Theriogenology**, v. 60, p. 759-66, 2003.
- PAPA, F. O. Ação de antioxidantes no meio diluente na criopreservação de sêmen equino. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/pt/auxilios/45649/acao-antioxidantes-meio-diluente-criopreservacao/>> Acesso em: 25 de fev.2013
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.
- RODELLO, L.; BICUDO, D. S.; FALLEIROS, B. M.; MONTEIRO, C. D.; SAKASHITA, S. M. Implicações da redução na concentração de gema de ovo no meio glicina-gema-leite sobre a sinética, morfologia e integridade de membranas espermáticas em sêmen ovino criopreservado. **Revista Veterinária e Zootecnia**, p. 239-48, 2011.
- SILVA, S.; GUERRA, M. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p. 370-384, 2011.
- SOARES, A. T.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática Effects of the cryopreservation on the spermatocytic viability. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v. 3, p. 53-63, 2009.
- SOUZA, M. I. L.; BICUDO, S. D.; SOUSA, D. B.; RAMOS, A. A. Caracterização biológica e congelabilidade do sêmen de carneiros Ideal-Polwarth ao longo do ano. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zootécnicas**, UNIPAR, v.6, n.2, p.111-18,2003.
- TONIETO, R. A.; GOULARTE, K. L.; GASTAL, G. D. A.; SCHIAVON, R. S.; DESCHAMPS, J. C.; LUCIA JR. T. Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram sêmen. **Small Ruminant Research**, v. 93, p. 206-9, 2010.
- VALENTE S.S; PEREIRA R.M.; BAPTISTA M. C.; MARQUES C.C.; VASQUES M.I.; SILVA PEREIRA M.V.; HORTA A.E.M.; BARBAS J.P. In vitro and in vivo fertility of ram semen cryopreserved in different extenders. **Animal Reproduction Science**, v.117, p.74-77, 2010.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60/61, p.481-492, 2000.
- YÁNIZ, J. L.; MATEOS, J. A.; SANTOLARIA, P. Zwitterionic buffers preserve ram semen quakity more efficiently than TRIS during storage at 15°C. **Small Ruminant Research**, v.95, p.54-60, 2011.