



## **Diluentes para sêmen de carneiros nativos de Mato Grosso do Sul**

*Extenders for native ram semen in Mato Grosso do Sul*

**Antonio Carlos Duenhas Monreal<sup>1</sup>, Ricardo Freitas Schmid<sup>1</sup>, José Geraldo Souza de Paula<sup>1</sup>, Mariana Adalgiza Gilberti Urt<sup>1</sup>, Albert Schiaveto de Souza<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Centro de Ciências Biológicas da Saúde (CCBS), Laboratório BIOCAPRI, Avenida Senador Filinto Muller, 2430A, Campo Grande/MS, CEP: 79070-900. E-mail: antonio.monreal@ufms.br

Recebido em: 13/02/2012

Aceito em: 07/08/2012

**Resumo.** A preservação do sêmen é uma biotecnologia importante para o melhoramento genético animal. O presente trabalho teve como objetivo comparar os fatores motilidade e vigor da criopreservação manual de sêmen ovino nativo em dois diluidores diferentes: TRIS e Botu-Bov®. 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 cada carneiro. 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 Botu-Bov® apresenta melhor eficiência em criopreservar o sêmen ovino após o congelamento se comparado ao diluidor Tris, quando somente os fatores motilidade e vigor foram analisados. Mais estudos são necessários para verificar a integridade de membrana do espermatozóide.

**Palavras chave.** Criopreservação, sêmen, ovino.

**Abstract.** The preservation of semen is an important biotechnology for animal breeding. This study aimed to compare the effect of factors and motility of sperm cryopreservation manual native sheep in two different extenders: TRIS and Botu-Bov ®. Were used to study six sheep native, obtaining two ejaculates per week of each animal to reach a total of 30 doses of semen extender for each sheep. Semen was analyzed in bright field microscopy. Comparing the average values were statistically significant differences were observed between the results of different extenders and the analyzed factors (motility and vigor) after thawing. The results allow us to infer that the middle Botu-Bov ® has a better efficiency in the cryopreserved ram semen after freezing compared to TRIS, when only the motility and force factors was analyzed. More studies are needed to verify of the spermatozoa integrity.

**Keywords.** Cryopreservation, semen, sheep.

### **Introdução**

A preservação do sêmen é um dos fatores mais importantes para o avanço da reprodução animal nas diferentes espécies e pode ser conseguido pela aplicação de biotécnicas cada vez mais modernas (Papa et al., 2002). Atualmente, diversas pesquisas têm sido realizadas para aprimorar as técnicas de congelamento com o objetivo de preservar a integridade dos espermatozoides durante o processo (Gomes et al., 2009).

O congelamento de sêmen é uma tecnologia muito importante para o melhoramento genético

animal, possibilitando para o produtor rural várias vantagens, entre elas: maior número de descendentes de reprodutores de elevado valor genético; armazenamento de sêmen de carneiros incapacitados, por acidente ou mesmo morte; além de evitar doenças transmitidas durante a monta natural. Entretanto, o processo de congelamento e descongelamento dos espermatozoides geralmente leva a diminuição de motilidade espermática, em qualquer espécie, como resultado de possíveis danos às estruturas da membrana, sendo esse o maior obstáculo para a exploração de sêmen congelado (Nath, 1972).



Segundo Suarez (1998) há necessidade em se utilizar um número maior de espermatozóides para uma inseminação artificial com sêmen congelado quando comparado às amostras de sêmen fresco, devido aos 50% de espermatozóides perdidos durante os processos de criopreservação.

O uso de sêmen ovino congelado não tem alcançado padrões satisfatórios na técnica de inseminação artificial por vários fatores. Entre seus fatores limitantes encontram-se: a cérvix uterina da ovelha com sua particular anatomia, o transporte espermático deficiente, as alterações bioquímicas e moleculares dos espermatozóides durante o processo de congelamento e a baixa qualidade das doses de sêmen congelado (Holt, 2000; Salamon & Maxwell, 2000).

Segundo Salamon & Maxwell (2000) a faixa em que há maior susceptibilidade das células espermáticas ao choque térmico, causador de alterações irreversíveis aos espermatozóides, é entre 20 e 0° C.

A diluição do sêmen é essencial para o sucesso das técnicas de congelamento ou refrigeração, pois os componentes dos meios diluidores conseguem fornecer condições para a sobrevivência dos espermatozóides, o que vai auxiliar na preservação da integridade da membrana plasmática, durante as variações na temperatura. O diluente deve, entre outras funções, fornecer uma fonte energética para o espermatozóide, estabilizar o pH do meio (Linde-Forsberg, 1991; England, 1993) e prevenir alterações acrossômicas, preservando assim, a reação acrossômica (Sirivaidyanpong et al., 2000).

A utilização de sêmen criopreservado leva a diminuição da fertilidade quando comparada com o sêmen fresco. Esta queda é resultante da perda da viabilidade espermática ou por danos funcionais aos espermatozóides sobreviventes (Watson, 2000). Segundo Salamon e Maxwell (1995) apesar dos espermatozóides do sêmen de carneiros apresentarem motilidade de 40 a 60%, após o descongelamento, somente cerca de 20 a 30% deles estarão biologicamente preservados.

O teste de termo-resistência revela danos, que não são visíveis imediatamente após o descongelamento (Fiser et al., 1991) sendo, portanto, útil para avaliar a capacidade de fertilização dos espermatozóides descongelados. Fator importante a ser considerado na congelação, é que o processo de desidratação das células que ocorre no congelamento lento é essencialmente

benéfico para a sobrevivência da célula, enquanto nas taxas de congelamento rápido espera-se uma menor sobrevivência celular (WATSON, 1995).

Quanto à forma de coleta do sêmen, pode ser com vagina artificial ou eletroejaculação. A primeira necessita um período de treinamento preliminar (Wulster, 2001), enquanto que para a obtenção de sêmen de um grande número de carneiros, a segunda forma, pode ser um procedimento útil (Foote, 2002).

A ejaculação do carneiro tem como característica um baixo volume e uma alta concentração espermática, portanto a dose de inseminação em ovinos deve apresentar maior concentração de espermatozóides, comparado, por exemplo, aos bovinos. Além disso, essa concentração espermática necessária para o sucesso da técnica de inseminação artificial é dose depende, e correlaciona-se a fatores tais como: o local onde o sêmen é depositado (vaginal, cervical ou intra-uterino) e do tipo de sêmen utilizado (fresco, refrigerado ou congelado) (Maxwell & Evans, 1987). Faz-se ainda necessário relatar que o sêmen ovino não pode ser processado com altas taxas de diluição como, por exemplo, as do sêmen bovino (Salamon & Maxwell, 1995).

Observando a necessidade de aperfeiçoamento da técnica de criopreservação de sêmen ovino, o presente trabalho teve como objetivo comparar a eficiência dos diluidores TRIS e Botu-Bov<sup>®</sup>, sob os parâmetros seminais de motilidade e vigor após a pós - descongelação, de ovinos nativos de Mato Grosso do Sul.

### **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 nativos de 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. Os animais foram mantidos 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/animal e sal mineral e água *ad libidum*. O experimento foi conduzido em condições naturais de temperatura, precipitação pluviométrica, umidade relativa e radiação solar.

Foram utilizados dois diluentes, o diluidor comercial Botu-Bov<sup>®</sup> (Frasco de 100ml) do laboratório Biotech Ltda - Botucatu/SP, crioprotetor elaborado para congelamento de sêmen de bovinos e pequenos ruminantes.

O diluidor TRIS foi processado no BIOCAPRI e apresentava a composição proposta por Evans e Maxwell (1990). A solução de TRIS foi composta por 700 ml de água milli-Q, 25,235g de TRIS, 14,168g de ácido cítrico e 10,416g de frutose. A partir dessa solução foi preparada a solução glicerolada para a congelamento, composta por 343 ml de solução TRIS, 100 ml de gema de ovo, 32 ml de água milli-Q e 25 ml de glicerol.

Previamente ao início das colheitas de sêmen destinadas à congelamento os animais foram submetidos a um período de adaptação e condicionamento à monta em vagina artificial, e a exames clínico-andrológicos.

Os ejaculados foram obtidos semanalmente, sendo duas colheitas por carneiros por semana, durante o período de abril a junho de 2011, pelo método da vagina artificial de modelo curto (Mies Filho, 1987), utilizando uma fêmea como manequim.

A vagina artificial foi aquecida em temperatura média de 40°C e teve como revestimento uma mucosa de borracha. Um funil de silicone foi encaixado na vagina e na sua extremidade mais fina acoplado um tubo de *falcon* de plástico graduado (15 mL). Esse mesmo tubo foi revestido externamente com papel alumínio, para evitar mudanças bruscas na temperatura do sêmen pelo meio ambiente e também a incidência de raios solares. Em seguida, após a colheita do sêmen o tubo foi encaminhado ao laboratório, para que as amostras fossem analisadas.

Após cada colheita, os ejaculados foram mantidos em banho-maria a 36°C e em seguida submetidos às avaliações macroscópicas (volume (mL), aspecto (aquoso, leitoso e cremoso) e cor, e microscópicas (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.

Foram feitas avaliações de motilidade e vigor em microscopia de campo claro. Após a

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

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

- Número de doses = [ ] do ejaculado x motilidade x volume ejaculado /  $100 \times 10^6$
- 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, o sêmen *in natura* foi diluído no meio, Botu-Bov<sup>®</sup> e TRIS. 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 câmara fria sob temperatura de 4°C, onde permaneceram por 3 horas. Imediatamente após o resfriamento, foi iniciada a 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 5 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 criogênico a -196°C até a sua descongelamento e análise.

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 seminal feitas anteriormente a congelamento.

Neste estudo, a comparação entre os momentos de análise, em relação à variável motilidade dos espermatozoides foi realizada 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 que a comparação 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 foram apresentados na forma de estatística descritiva ou na forma de tabelas e gráficos. A análise estatística foi realizada utilizando-se o “Software” *SigmaStat*, versão 2.0, considerando um nível de significância de 5%.

**Resultados e Discussão**

A motilidade antes da congelação apresentou-se superior a motilidade da descongelação para ambos os diluentes. Na pré-congelação o sêmen diluído no meio Tris apresentou melhor motilidade que o sêmen diluído no meio Botu-Bov® (Botu-Bov = 71,83±3,61; Tris = 76,72±2,65 / p=0,023).

Verificou-se redução significativa da motilidade na pós-descongelação para os dois meios (Botu-Bov= p<0,001; Tris= p<0,001), sendo que o diluidor Botu-Bov® foi significativamente superior ao diluidor Tris (Botu-Bov= 40,56±8,34; Tris= 24,28±12,48 / p=0,024). O Tris apresentou maior perda de motilidade que o Botu-Bov® (Tris= 52,44±11,45; Botu-Bov= 31,28±8,86).

**Tabela 1.** Motilidade e vigor dos espermatozóides nos meios Botu-Bov e TRIS, avaliados antes e após a crioproteção e a perda entre os dois momentos, Campo Grande, 2011.

Variável	Meio	Momento		Perda
		Antes	Depois	
Motilidade	Botu-Bov	71,83±3,61Ba	40,56±8,34Ab	31,28±8,86B
	Tris	76,72±2,65Aa	24,28±12,48Bb	52,44±11,45A
Vigor	Botu-Bov	4 (3-5)Aa	3 (2-4)Aa	1 (-1-2)B
	Tris	4 (3-4)Aa	1,5 (1-2)Bb	2,5 (1-3)A

Os dados de motilidade estão expressos em 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.

O vigor antes da congelação apresentou-se semelhante para os diluentes (p=0,699). O Tris apresentou diminuição significativa de vigor no pós-descongelação (p<0,001), o que não ocorreu com o Botu-Bov® (p=0,188). Portanto o Botu-Bov® apresentou melhor vigor na pós - descongelação (p=0,004). O diluente Botu-Bov® apresentou perda de vigor significativamente inferior à perda apresentada pelo Tris (p=0,028).

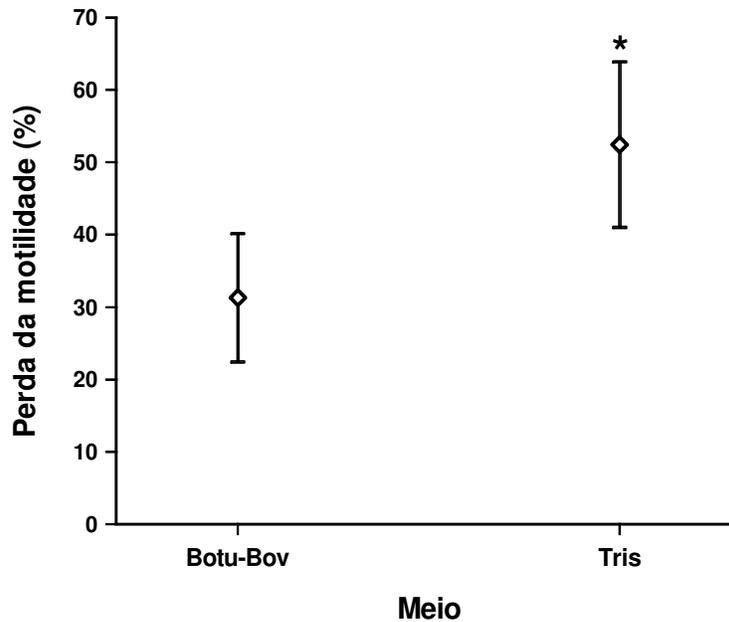
Na figura 1 observa-se que o meio Botu-Bov® além de ter a menor perda de motilidade na pós -congelação também sofreu menor variação em comparação ao meio Tris, que teve uma variação relativamente maior em seus resultados.

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

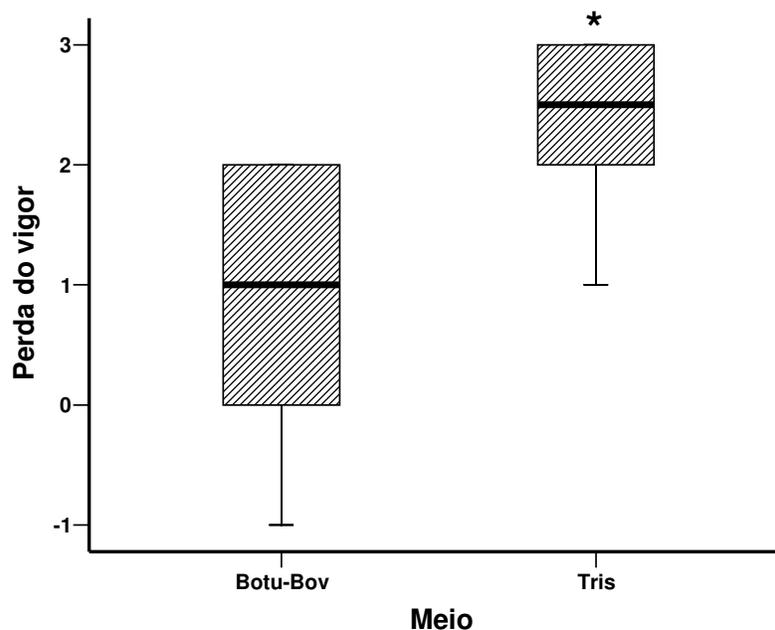
A motilidade antes da congelação

apresentou-se superior a motilidade pós-descongelação para ambos os diluentes. Uma queda na motilidade é sempre esperada visto que durante o processo de congelação-descongelação, os espermatozóides são submetidos a condições adversas como desidratação, mudanças da fase de transição dos fosfolipídios da membrana, efeito solução e a formação de gelo intracelular (Parks & Graham, 1992).

O sêmen congelado no meio Tris teve melhor motilidade que o sêmen congelado em meio Botu-Bov®, na pré-congelação (Botu-Bov= 71,83±3,61; Tris= 76,72±2,65). Portanto houve diferença significativa na motilidade pré-congelação quando se compara o sêmen utilizado para o diluidor Tris e para o Botu-Bov (p=0,023). Essa diferença pode ser consequência do dia de colheita e processamento do sêmen, já que nem sempre foi possível a divisão da dose de sêmen para os dois diluentes, devido ao baixo volume em determinadas coletas.



**Figura 1.** Perda de motilidade dos espermatozóides criopreservados em meio contendo Botu-Bov ou Tris. Cada símbolo representa a média e a barra o desvio padrão da média. \* Diferença significativa em relação ao meio contendo Botu-Bov (teste t-student,  $p=0,005$ ), Campo Grande, 2011.



**Figura 2.** Box plot ilustrando a perda de vigor dos espermatozóides criopreservados em meio contendo Botu-Bov 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 Botu-Bov (teste de Mann-Whitney,  $p=0,028$ ), Campo Grande, 2011.



Verificou-se redução significativa das motilidades na pós-descongelamento (Botu-Bov=  $p < 0,001$ ; Tris=  $p < 0,001$ ). Levando em consideração a motilidade progressiva mínima de 30% para se considerar o sêmen congelado dentro do padrão (CBRA, 1998), o diluidor Tris não foi eficiente para o congelamento de sêmen ovino. Como o diluidor Botu-Bov<sup>®</sup> apresentou-se dentro do padrão ( $>30\%$ ) e foi também significativamente superior ao diluidor Tris (Botu-Bov=  $40,56 \pm 8,34$ ; Tris=  $24,28 \pm 12,48$ ), pode-se considerar como eficiente nesse quesito, quando se considera somente a motilidade ( $p=0,024$ ). Segundo Papa et. al. (2008) em estudos realizados com bovinos, além de obter melhor preservação do movimento espermático, o diluidor Botu-Bov<sup>®</sup> também apresentou mais eficiência na manutenção da integridade das membranas plasmáticas e acrossomais. Resultados diferentes são mostrados por Crespilho et al. (2006) para sêmen bovino (nelore). Nesse caso foi comparada a eficácia dos meios diluidores Tris-gema de ovo-frutose e o diluidor comercial Botu-Bov<sup>®</sup>, ambos mostraram-se eficientes quando somente a motilidade total pós-descongelamento foi comparada (BB=  $71,8 \pm 9,7$ ; TRIS=  $67,4 \pm 10,5$ ), portanto não houve diferença significativa entre estes ( $p=0,3424$ ).

O Tris apresentou maior perda de motilidade que o meio Botu-Bov<sup>®</sup> (Tris=  $52,44 \pm 11,45$ ; Botu-Bov=  $31,28 \pm 8,86$ ). Portanto, mesmo as amostras de sêmen que apresentaram maior motilidade antes da congelamento com o meio TRIS, na pós-descongelamento as médias ficaram inferiores as do Botu-Bov<sup>®</sup>, observando-se maior queda de motilidade (68%) para o meio Tris em relação ao diluidor Botu-Bov<sup>®</sup> (43%) ( $p=0,005$ ). Segundo Bilodeau et al. (2002) é comum ao se utilizar o Tris-gema de ovo na congelamento de sêmen bovino observar quedas de cerca de 50% da motilidade no sêmen descongelado em relação ao sêmen fresco. Portanto, uma queda ainda maior foi observada ao se utilizar o diluidor Tris-gema no sêmen dos ovinos nativos.

O vigor antes do congelamento apresentou-se equivalente para os diluentes ( $p=0,699$ ). 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 Botu-Bov<sup>®</sup> ( $p=0,188$ ). Portanto, podemos notar uma superioridade significativa do vigor apresentado pelo grupo Botu-Bov<sup>®</sup> na pós-descongelamento em comparação ao vigor apresentado pelo grupo Tris

( $p=0,004$ ). Resultados semelhantes foram encontrados por Crespilho (2006) na congelamento de sêmen bovino, onde os espermatozoides criopreservados com o diluidor Botu-Bov<sup>®</sup> apresentaram movimento mais linear e retilíneo que os congelados em meio Tris, o que estaria relacionado a um maior vigor. Quando se compara a perda de vigor, mais uma vez o Botu-Bov<sup>®</sup> demonstra-se superior ao Tris com uma perda significativamente inferior ( $p=0,028$ ).

O fato de ter havido maior variação na motilidade pós-descongelamento do meio Tris pode ter sido determinado por ter havido variação da resposta individual de um carneiro para outro a esse diluidor. O mesmo serve para a maior variabilidade do meio Botu-Bov<sup>®</sup> em seu vigor pós-descongelamento.

#### **Conclusão**

O diluidor comercial Botu-Bov<sup>®</sup> apresentou mais eficiência que o diluidor Tris na congelamento do sêmen de ovinos nativos de Mato Grosso do Sul, quando somente os parâmetros motilidade e vigor foram comparados.

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**

BILODEAU, J. F., BLANCHETTE, S., CORMIER, N. SIRARD, M.A. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, v.57, n.3, p. 1105-1122, 2002.

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.

CRISPILHO, A.M., PAPA F. O., ALBERTI K., SIQUEIRA FILHO E. R., MARTINS A. Jr., NOVAES J. L. C., DELL'AQUA J. A. Eficiência comparativa entre dois diluidores para a congelamento de sêmen ovino sobre os padrões de motilidade e integridade de membrana plasmática. **ARS Veterinária**, v.22, n.3, p.229-235, 2006.

ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog



semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.47, p.243- 255, 1993.

FISER, P.S., HANSEN, C., UNDERHILL, H., MARCUS, G.J. New thermal stress test to assess the viability of cryopreserved boar sperm. **Cryobiology**, v.28, p.454-459, 1991.

FOOTE, R.H. **The history of artificial insemination: selected notes and notables**. Department of Animal Science. Cornell University, Ithaca, 2002

GOMES, P.L.N.S.; LIPINSKI, L.C.; PEREIRA, R.J.T.A. Avaliação da necessidade do tempo de equilíbrio no congelamento de sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira – Suplemento 1**, 2009 – Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3-22, 2000.

LINDE-FORSBERG, C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extend semen. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v.21, p.467-485, 1991.

MAXWELL, W.M.C., EVANS, G. Salamon's Artificial Insemination of sheep and goats. **Butterworths Pty Limited**, p. 194, 1987

MIES FILHO, A. **Inseminação Artificial**. 6ª Ed., Porto Alegre: Sulina, v. 2., 1987.

NATH, J. Correlative biochemical and ultrastructural studies on the mechanism of freezing damage to ram semen. **Cryobiology**, v.9, p.240–246, 1972.

PAPA, F.O., ZAHN, F.S., DELL'AQUA Jr., ALVARENGA, M.A.Utilização do diluente MP50 para criopreservação de sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p.184-191, 2002

PAPA, F.O.; CRESPILO, A.M.; FREITAS DELL'AQUA, C.P.; DELL'AQUA JR, J.A., Impacto do sêmen no sucesso dos programas de IATF: Métodos básicos e avançados de avaliação. 3º **Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**. cap. 9, p. 68-94, 2008.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.

SALAMON, S., MAXWELL W.M.C. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 37, p. 185-249, 1995.

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

SIRIVAIYANPONG, S. CHENG, F. P., MARKS, A. Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. **Theriogenology**, v.53, p. 789-802, 2000.

SUAREZ, S.S. The oviductal sperm reservoir mammals; mechanisms of formation. **Biology and Reproduction**; v.58, p.1105-1107, 1998.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and 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.60/61, p.481-492, 2000.

WULSTER-RADCLIFFE M. C., WILLIAMS M. A., STELLFLUG J. N., LEWIS G. S. Technical note: artificial vagina vs. a vaginal collection vial for collecting semen from rams. **Journal of Animal Science**, v.79, p.2964-2967, 2001.