



## Uso de dimetil-formamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de sêmen caprino

Alessandra Ferreira da Silva<sup>1</sup>, Eduardo Paulino da Costa<sup>2</sup>, Fabrício Albani Oliveira<sup>3</sup>, Ciro Alexandre Alves Torres<sup>4</sup>, Giorgia Thaís da Silva Hass<sup>1</sup>, Vinício Araújo Nascimento<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Pós-Graduação em Medicina Veterinária - UFV.

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Veterinária - UFV.

<sup>3</sup> Graduação em Medicina Veterinária - UFV.

<sup>4</sup> Departamento de Zootecnia - UFV.

<sup>5</sup> Pós-Graduação em Zootecnia - UFV.

**RESUMO** - O objetivo neste trabalho foi avaliar os efeitos da dimetil-formamida na criopreservação de sêmen caprino, por meio de testes *in vitro*. As partidas de sêmen foram congeladas com os diluidores leite desnatado-gema, associado a diferentes crioprotetores e concentrações: 7% de glicerol (T1); 3,5% de glicerol e 3,5% de dimetil-formamida (T2) e 5% de dimetil-formamida (T3). O sêmen foi centrifugado e envasado em palhetas de 0,5 mL, sendo resfriado por 40 minutos, atingindo 5,0°C e permanecendo nesta temperatura por mais 1 hora e 20 minutos. Os parâmetros avaliados *in vitro* foram a motilidade progressiva e o vigor espermático, a integridade acrossômica, a integridade da membrana plasmática (HO) e a reação acrossômica. Observou-se perda de 30,0% da motilidade inicial quando as amostras foram submetidas aos procedimentos de criopreservação. A perda de integridade da membrana plasmática, avaliada pelo teste hiposmótico (HO) foi de 19%. As lesões de acrossoma aumentaram em 3% durante o teste de termo-resistência (TTR) lento. Não houve diferença entre os tratamentos quanto aos aspectos de motilidade nos tempos de 0,00; 0,05; e 1,00 horas do TTR e vigor em todos os tempos. No tempo de 2,00 horas do TTR, registrou-se diferença entre os tratamentos 1 e 2, de modo que a motilidade no tratamento 2 foi superior às demais. Os valores de integridade de membrana plasmática, integridade acrossômica e reação acrossômica pós-descongelamento não diferiram entre os tratamentos, indicando que a dimetil-formamida não foi superior ao glicerol na manutenção da qualidade espermática após a criopreservação.

Palavras-chave: dimetil-formamida, glicerol, sêmen caprino

## Use of dimethylformamide associated or not with glycerol for goat semen cryopreservation

**ABSTRACT** - The objective of this trial was to evaluate the efficiency of dimethylformamide on cryopreservation of goat semen using semen physical analyses and complementary tests. Alpine and Saanen bucks from the Dairy Goat Experimental Station- DZO were used. Semen samples were frozen with a yolk-skimmed milk diluent and cryoprotectors with different concentrations as follows: 7% glycerol (T1), 3.5% glycerol plus 3.5% dimethylformamide (T2) or 5% dimethylformamide (T3). Semen was centrifuged, diluted, and bottled in 0.5 mL straws followed by cooling for 40 minutes until reach 5.0°C and kept at this temperature for additional 80 minutes. Samples were then exposed to liquid nitrogen vapor for 15 minutes and finally frozen. Thawing was done in a waterbath at 37°C for 50 seconds. The following variables were evaluated *in vitro*: sperm progressive motility and vigor, acrosomal integrity and reaction, and plasmatic membrane integrity. The cryopreservation procedures reduced 30.0% of the initial motility and 19% of plasmatic membrane integrity that was evaluated using the hyposmotic swelling test (HOST). It was observed an increase of 3% in acrosomal lesions when samples were submitted to a slow thermoresistance test (TRT). No significant differences in sperm motility were observed among treatments at 0, 5, and 60 minutes of TRT as well as in sperm vigor at all TRT times. However, at 120 minutes of TRT a significant difference in sperm motility was found comparing T1 and T2 while T3 was intermediate. There were no significant differences on plasmatic membrane integrity, acrosomal integrity, and post-thawing acrosomal reaction across treatments. It can be concluded that dimethylformamide can be a viable alternative for goat semen cryopreservation used alone or in association with glycerol.

Key Words: glycerol, dimethyl formamide, goat semen

### Introdução

A inseminação artificial em caprinos tem sido praticada em vários países, especialmente da Europa, onde a caprinocultura

é uma atividade cultural. Entretanto, existe grande variação nos resultados, principalmente quanto à utilização de sêmen congelado, o que permite questionamento acerca da metodologia aplicada (Andrade et al., 1999).

No Brasil, a limitada capacidade de investimento da maioria dos caprinocultores, o pouco conhecimento sobre a fisiologia da espécie, a insuficiência de tecnologias próprias e adequadas para o congelamento, além da desorganização nos canais de comercialização de sêmen são considerados os principais fatores limitantes da expansão da inseminação artificial em caprinos (Andrade et al., 1999).

Desde que os primeiros espermatozoides caprinos foram congelados por Smith & Polge (1950), inúmeras pesquisas têm sido realizadas visando estabelecer protocolos de resfriamento e congelamento do sêmen caprino. Mascarenhas (1994) acredita que o futuro da inseminação artificial em caprinos depende do sucesso do congelamento do sêmen, sendo necessários mais estudos para melhorar os meios e as técnicas de criopreservação dos espermatozoides.

De acordo com Roy (1957), um problema específico na preservação do sêmen caprino está relacionado ao efeito deletério do plasma seminal na viabilidade dos espermatozoides criopreservados com diluentes contendo gema de ovo e/ou leite desnatado. Uma das explicações seriam a síntese e secreções de enzimas pelas glândulas bulbo-uretrais liberadas no plasma, as quais podem se associar aos componentes destes diluentes e produzir componentes tóxicos para a célula espermática. Esta condição desfavorável pode ser prevenida por meio da retirada do plasma seminal durante os procedimentos de criopreservação (Leboeuf et al., 2000).

Além dos fatores inerentes ao ejaculado caprino, o processo de criopreservação de sêmen, particularmente no estado congelado, causa danos ultra-estruturais, bioquímicos e funcionais aos espermatozoides, reduzindo-se a motilidade, a viabilidade e o posterior transporte no trato genital feminino (Leboeuf et al., 2000).

Os crioprotetores são fundamentais para a sobrevivência dos espermatozoides no processo de criopreservação. A utilização de diversos crioprotetores e suas combinações podem minimizar e controlar os efeitos deletérios na célula durante os processos de congelamento e descongelamento (Rossi et al., 2003).

O glicerol tem sido o crioprotetor mais utilizado para o congelamento de sêmen caprino (Leboeuf et al., 2000). Entretanto, as amidas também têm demonstrado bons potenciais como agentes crioprotetores, provavelmente por sua menor toxicidade e seu mais baixo peso molecular (Amann & Pickett, 1987; Graham, 1996; Medeiros et al., 2002).

O objetivo neste trabalho foi avaliar os possíveis benefícios que a dimetil-formamida pode promover como crioprotetor da célula espermática caprina.

## Material e Métodos

Foram utilizados quatro reprodutores caprinos das raças Alpina e Saanen, dos quais foram coletados cinco ejaculados (20 no total), utilizando-se vagina artificial. Após as coletas, foram realizadas as análises físicas do sêmen (volume, motilidade progressiva espermática = 0-100%, vigor = 0-5 e turbilhonamento = 0-5) e separadas amostras para avaliações da morfologia espermática, da integridade funcional da membrana plasmática (teste hiposmótico) e da concentração espermática. O plasma seminal foi retirado por meio de única centrifugação, durante 10 minutos a 600xg. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, cada tubo graduado foi ressuscitado em uma proporção de 1:2 nos meios de congelamento leite desnatado-gema com 7% de glicerol (T1), leite desnatado-gema com 3,5% de glicerol e 3,5% de dimetil-formamida (T2) e leite desnatado-gema com 5% de dimetil-formamida (T3). Realizada a diluição final, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL contendo 100 milhões de espermatozoides.

O resfriamento foi realizado em uma caixa de isopor, segundo metodologia descrita por Bueno et al. (2001), durante 40 minutos, com temperatura inicial de 20°C e final de 5°C. Após esse período, as amostras foram acondicionadas em geladeira com temperatura interna de 4,5°C, por 1 hora e 20 minutos (período de equilíbrio).

Após o resfriamento, as palhetas foram dispostas sobre uma grade, 5 cm acima da lâmina de nitrogênio líquido, durante 15 minutos. Seqüencialmente, foram mergulhadas no nitrogênio líquido a -196°C e transferidas para um botijão criogênico.

As partidas foram descongeladas a 37°C por 50 segundos e acondicionadas em tubos *ependorf*. De cada partida foram retiradas amostras para realização do teste de termo-resistência lento (TTR), da avaliação da integridade funcional da membrana plasmática (teste hiposmótico) e acrossômica, além da reação acrossômica. No teste de termo-resistência lento, as partidas descongeladas foram incubadas a 37°C por duas horas, de modo que, nos tempos 0, 5, 60 e 120 minutos deste período, foram avaliados a motilidade espermática progressiva e o vigor, por meio de contraste de fase acoplado.

A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada pelo teste hiposmótico, utilizando-se 1 mL de solução hiposmótica contendo frutose (100mOsmol/kg), acrescida de 10 µL de sêmen de cada partida e incubada por uma hora em banho-maria.

A avaliação dos danos acrossomais foi realizada no início e ao final do TTR. Uma alíquota da amostra desconge-

lada, em cada um desses momentos, foi acondicionada em solução formol-salina tamponada (Hancoch, 1957) e, posteriormente, analisada por meio da preparação úmida.

A reação acrossômica foi avaliada por meio de esfregaços das partidas descongeladas pela metodologia de coloração adotada por Bryan & Akruk (1977).

Para análise estatística, as variáveis foram submetidas aos testes de normalidade (teste de Lilliefors) e homocedasticidade (teste de Cochran & Bartlett) e, posteriormente, às análises de variância (ANOVA), aplicando-se o teste Duncan a 5% de probabilidade (UFV, 1999) para aquelas que apresentaram significância. As variáveis que não atenderam às premissas de normalidade e homocedasticidade, mesmo após a transformação dos dados, foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis (UFV, 1999). A determinação das relações entre as características estudadas foi feita pela correlação de Pearson (UFV, 1999) e a avaliação das médias e do desvio-padrão, por meio de estatística descritiva.

## Resultados e Discussão

Todas as partidas descongeladas apresentaram requisitos superiores aos exigidos para sêmen descongelado, quanto aos aspectos de motilidade (>30%) e vigor (>2), de acordo com as exigências do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

Um dos fatores que limitam a fertilidade do sêmen criopreservado é o período de sobrevivência dos espermatozoides após o descongelamento, que pode ser avaliado pelo teste de termo-resistência lento. Neste trabalho, a motilidade espermática média observada ao final do TTR foi de 14,3% (Tabela 1).

Os resultados do TTR evidenciaram, em geral, queda linear dos parâmetros de motilidade espermática progressiva e vigor, ao longo de duas horas de duração do teste, o que também foi observado por Siqueira (2004), ao avaliar partidas de sêmen descongeladas de touros.

A queda da motilidade espermática observada ao final do TTR pode ser decorrente da perda dos componentes intracelulares ou de lesões estruturais das membranas das células espermáticas, resultantes tanto do processo de congelamento como de descongelamento. Watson (1995) relata que, embora o declínio da motilidade espermática possa ser explicado com base em mudanças no transporte ativo e na permeabilidade de membrana plasmática dos espermatozoides, é possível que alterações na energia disponível ou danos nos elementos do axonema possam contribuir para esse fenômeno.

Verificou-se perda de 30,0% da motilidade inicial, inferior à registrada por McLaughlin et al. (1992), que

verificaram que o processo de criopreservação diminuiu a motilidade média dos espermatozoides em torno de 40%, com maior redução no sêmen de pior qualidade. Esse declínio da motilidade pós-descongelamento era esperado, pois o processo de criopreservação diminui a viabilidade espermática e promove danos estruturais não correlacionados diretamente e inicialmente à motilidade (Watson, 1995).

A motilidade espermática e o vigor pós-descongelamento não diferiram ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos (Tabela 1), contrariando as informações de Keith (1998), que, ao avaliar o glicerol e diferentes amidas (dimetil-formamida) na criopreservação de espermatozoides eqüinos, encontrou diferença significativa na motilidade progressiva espermática pós-descongelamento entre os tratamentos. Segundo essa autora, a motilidade pós-descongelamento do sêmen criopreservado com glicerol (60,5%) foi superior àquela com qualquer outro crioprotetor ( $P<0,05$ ), o que pode estar associado tanto a diferenças na metodologia aplicada para a criopreservação quanto a características intrínsecas do sêmen da espécie envolvida.

Ao final do TTR, as partidas congeladas com a associação de glicerol e dimetil-formamida apresentaram motilidade espermática superior à daquelas congeladas com glicerol ( $P<0,05$ ), porém não diferiram significativamente das partidas contendo dimetil-formamida como único crioprotetor ( $P>0,05$ ) (Tabela 1), possivelmente em razão da boa proteção que a combinação de crioprotetores pode oferecer na criopreservação celular em relação ao uso isolado de crioprotetores (Dalimatia & Graham, 1997).

Zahn et al. (2002) demonstraram melhores resultados dos parâmetros espermáticos quando utilizou as amidas e suas associações com glicerol, em comparação à utilização do glicerol como único crioprotetor. Do mesmo modo, Rossi et al. (2003) afirmaram que a baixa toxicidade das amidas e a posterior diminuição das concentrações de glicerol podem neutralizar os efeitos deletérios sobre a motilidade e integridade acrossômica dos espermatozoides eqüinos criopreservados.

Os tratamentos não diferiram ( $P>0,05$ ) quanto ao percentual de células reativas ao hiposmótico, demonstrando igual eficiência dos tratamentos para manutenção da integridade celular. Entretanto, houve perda de 19% da integridade celular, que pode ser atribuída tanto aos danos de membrana celular após a criopreservação quanto ao procedimento de centrifugação. Adicionalmente, este valor pode ser considerado baixo se comparado à perda de 30% relatada por Santos (2003).

Segundo Hossain et al. (1998), citados por Siqueira (2004), a resposta mediana observada ao teste hiposmótico após a criopreservação pode estar relacionada aos danos

Tabela 1 - Média e desvio-padrão da motilidade espermática progressiva e do vigor, durante o TTR, de sêmen caprino congelado com três diluentes

Table 1 - Mean and standard deviation of spermatic progressive motility and vigour during term resistance test of frozen of goat semen

Variável <i>Variable</i>	Tempo de incubação (minutos) <i>Incubation time (minutes)</i>	Tratamento <i>Treatment</i>		
		1 M±DP	2 M±DP	3 M±DP
Motilidade espermática (0-100%) <i>Spermatic motility (0-100%)</i>	0	67,8±15,8 <sup>a</sup>	61,1±28,0 <sup>a</sup>	53,6±23,1 <sup>a</sup>
	5	53,5±21,7 <sup>a</sup>	56,6±21,3 <sup>a</sup>	42,1±23,5 <sup>a</sup>
	60	32,2±22,0 <sup>a</sup>	43,3±28,4 <sup>a</sup>	34,7±23,8 <sup>a</sup>
	120	14,2±3,0 <sup>a</sup>	36,9±27,8 <sup>b</sup>	22,1±21,5 <sup>ab</sup>
Vigor (1-5) <i>Vigour (1-5)</i>	0	3,6±0,4 <sup>a</sup>	3,3±0,7 <sup>a</sup>	3,2±0,8 <sup>a</sup>
	5	3,2±0,4 <sup>a</sup>	3,2±0,7 <sup>a</sup>	3,0±0,7 <sup>a</sup>
	60	2,5±0,6 <sup>a</sup>	2,9±0,8 <sup>a</sup>	2,6±0,8 <sup>a</sup>
	120	1,8±0,6 <sup>a</sup>	2,5±0,9 <sup>a</sup>	2,1±0,9 <sup>a</sup>

Médias com letras diferentes sobrescritas na mesma linha diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste Duncan. Tratamento 1 - diluente leite desnatado-gema com 7% de glicerol; Tratamento 2 - diluente leite desnatado-gema com 3,5% de glicerol e 3,5% de dimetil-formamida; Tratamento 3 - diluente leite desnatado-gema com 5% de dimetil-formamida.

Means with different letters in the same row differ ( $P < 0,05$ ) by Duncan test. Treatment 1 - yolk skim-milk extender with 7% glycerol; Treatment 2 - yolk-skim milk extender with 3.5% glycerol and 3.5% dimethylformamide; Treatment 3 - yolk-skim milk extender with 5% dimethylformamide.

que a cauda espermática sofre durante os processos de congelamento e descongelamento, que diminuem a capacidade do espermatozóide em reagir com o aumento do volume celular, em resposta à baixa osmolaridade. Além disso, o próprio meio de congelamento pode induzir o estresse osmótico, o que resultaria em lesões da estrutura celular (Correa & Zavos, 1994).

Observou-se correlação positiva (0,5) entre motilidade espermática progressiva, avaliada durante o TTR, e a porcentagem de células reativas ao hiposmótico pós-descongelamento ( $P < 0,01$ ). Da mesma forma, Melo (1999) observou valores médios entre o teste hiposmótico com a motilidade espermática.

Os danos acrossomais não diferiram entre os diferentes crioprotetores ( $P > 0,05$ ). Resultados diferentes foram observados por Medeiros et al. (2003) e Keith (1998), que ressaltaram a superioridade das amidas, como a dimetil-formamida, em relação ao glicerol na manutenção da integridade acrossômica. Segundo esses autores, a eficiência das amidas pode estar relacionada ao seu menor peso molecular, que lhes confere maior permeabilidade de membrana plasmática e acrossomal.

Independentemente do tratamento, o valor médio de lesões acrossômicas (8,0%) observadas ao final do TTR foi inferior aos 22 e 50% relatados por Barbosa et al. (1999) e Santos (2001), respectivamente, mas próximo da média observada por Méndez et al. (1994), de 9,2%. Esses valores inferiores talvez possam ser explicados pelos menores efeitos do estresse térmico sofridos pelas partidas e pela boa proteção que os agentes crioprotetores conferiram à membrana espermática.

O processo de descongelamento pode ser tão deletério quanto o congelamento. Portanto, a metodologia de descongelamento influencia a viabilidade dos espermatozóides

pós-descongelamento (Penã & Linde-forsberg, 2000). Soderquist et al. (1997) avaliaram a integridade acrossomal de espermatozóides de cordeiros descongelados a 35°C e registraram média de 67,6% de acrossomas intactos. Neste estudo, após o descongelamento a 37°C, foram observados inicialmente 95% de acrossomas intactos. Estes valores podem ser considerados, uma vez que a motilidade progressiva, associada aos danos acrossomais, pode ser um indicador da capacidade fertilizante do sêmen (Méndez et al., 1994).

O teste de reação acrossômica indica a população de células da partida viáveis para realização deste procedimento no trato reprodutivo da fêmea, além de estar altamente correlacionado à taxa de fertilidade (Silva, 1998). O índice médio de reações acrossômicas observadas foi de 24,8%, valor intermediário aos de 14 e 34% (Silva, 1998) e superior ao de 9,85% (Siqueira, 2004), observados em sêmen criopreservados de touros. Siqueira (2004) não constatou correlação significativa entre teste de reação e fertilidade. Entretanto, não foi observada diferença ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos.

O alto índice de células que não reagiram ao teste demonstra reação acrossômica precoce durante a criopreservação e pode estar relacionado a dois fatores: desestabilização prematura da membrana espermática, decorrente do processo de criopreservação (Watson, 1995); e ausência de plasma seminal nas amostras criopreservadas, uma vez que a remoção do plasma seminal torna o espermatozóide mais susceptível a fatores que induzem a reação acrossômica precoce (Iborra et al., 2000).

Os maiores valores para motilidade espermática pós-descongelamento foram associados a porcentagens superiores de células que reagiram ao teste. Resultados semelhantes foram observados por Barnabé et al. (1981b), que inferiram

motilidades espermáticas progressivas superiores, associadas a maiores percentagens de acrossomas normais. Da mesma forma, Siqueira (2004) relatou correlação negativa para o teste de reação acrossômica e a motilidade espermática progressiva pós-descongelamento.

### Conclusões

A utilização da dimetil-formamida como crioprotetor isolado ou associado ao glicerol, em comparação à utilização única de glicerol, não foi superior na manutenção da qualidade espermática após a criopreservação.

### Literatura Citada

- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal Equine Veterinary Science**, v.7, n.3, p.145-173, 1987.
- ANDRADE, S.J.; MARQUES JR., A.P.; LEITE, R.C. et al. Sêmen caprino congelado: efeito de dois diluidores sobre a taxa de fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, p.245, 1999.
- BARBOSA, L.P.; GUIMARÃES, J.S.; ESPECHIT, C.J.B. et al. Avaliação de diferentes diluentes e métodos de congelamento de sêmen em programas de inseminação artificial em cabras Alpinas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, p.283-285, 1999.
- BARNABÉ, R.C.; BARNABÉ, V.H.; VIANA, W.T. et al. Correlações entre motilidade progressiva e retenção do acrossoma em sêmen de bovinos, pós-descongelamento e após provas de termo-resistência. **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.18, p.61-68, 1981b.
- BRYAN, J.H.D.; AKRUK, S.R. A naftol yellow and erithrosin B staining procedure for use in studies of the acrosome reaction of rabbit spermatozoa. **Stain Technology**, v.52, p.47-51, 1977.
- BUENO, R.; COSTA, E.P.; GUIMARÃES, J.D. et al. Qualidade espermática de sêmen canino criopreservado. II. Utilização de dois protocolos de resfriamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, p.372-379, 2001.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49p.
- CORREA, J.R.; ZAVOS, P.M. The hypoosmotic swelling test: its employment as assay to frozen-thawed bovine sperm membrane. **Theriogenology**, v.42, p.351-360, 1994.
- DALIMATA, A.M.; GRAHAM, J.K. Criopreservação of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, v.48, p.831-841, 1997.
- GRAHAM, J.K. Veterinary clinical of North American: equine practice. **Cryopreservation of Stallion Spermatozoa**, v.12, p.131-147, 1996.
- HANCOCH, J.L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal Reproduction Microscopy Science**, n.76, p.84-97, 1957.
- IBORRA, A.; COMPANYÓ, M.; MARTINEZ, P.; MORROS, A. Cholesterol efflux promotes acrosome reaction in goat spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.62, p.378-383, 2000.
- KEITH, S.L. **Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa**. Colorado: Colorado State University, 1998. 116p. Thesis (Master of Science) - Colorado State University, 1998.
- LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.113-141, 2000.
- MASCARENHAS, R. Inseminação artificial em caprinos: produção e conservação de sêmen. **Veterinária Técnica**, p.14-7, 1994.
- McLAUGHLIN, E.A.; FORD, W.C.L.; HULL, M.G.R. Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v.95, p.527-534, 1992.
- MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M.; CARMO, M.T. et al. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v.58, p.1-4, 2002.
- MEDEIROS, A.S.L.; LANDIN-ALVARENGA; PAPA, F.O. et al. Avaliação da integridade acrossomal de espermatozoides de garanhões criopreservados com crioprotetores a base de amidas e glicerol. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.353-354, 2003.
- MELO, M.I.V. **Teste hiposmótico na avaliação de sêmen equino**. Belo Horizonte, MG: Universidade Federal de Minas Gerais, 1999. 67p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, 1999.
- MÉNDEZ, J.V.; HERRERA, G.G.; GARCIA, M.E.G. et al. Motilidad y daño acrosomal del semen caprino congelado en pajillas de 0,25 ml y 0,5 ml y descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura. **Veterinary Mexican**, v.25, n.2, p.127-131, 1994.
- PENÁ, A.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of Equex, one or two step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.54, p.859-875, 2000.
- ROSSI, T.C.; PAPA, F.O.; SANTOS, T.B. et al. Efeito da utilização de diferentes crioprotetores e suas associações no processo de congelamento de sêmen equino com meio MP50. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.350-352, 2003.
- ROY, A. Egg yolk-coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. **Nature**, n.179, p.318-19, 1957.
- SANTOS, A.D.F. **Características reprodutivas e congelamento do sêmen de reprodutores das raças Alpina e Saanen submetidos ao manejo de fotoperíodo**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 61p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- SANTOS, E.C.O. **Viabilidade *in vitro* do sêmen de cão submetido a congelação com diferentes diluidores e crioprotetores**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 2003. 60p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.
- SILVA, A.E.D.F. **Reação acrossômica induzida: método indicador de fertilidade de touros**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 38p (Documentos, 35).
- SIQUEIRA, J.B. **Relação da fertilidade de sêmen bovino congelado com testes de avaliação espermática "in vitro"**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004. 77p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- SMITH, A.H.; POLGE, C. Survival of spermatozoa at low temperatures. **Nature**, v.166, p.668-671, 1950.
- SODERQUIST, L.; MADRID-BURY, N.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assesment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. **Theriogenology**, v.48, p.1115-1125, 1997.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. **Sistema de análise estatística e genética - SAEG**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, MG: Central de Processamento de Dados, 1999.
- WATSON, P.F. Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility Development**, v.7, p.871-891, 1995.
- ZAHN, F.S.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA JR., J.A. Cholesterol incorporation on equine sperm membrane: effects on post-thaw parameters and fertility. **Theriogenology**, v.58, p.237-240, 2002.

Recebido: 10/01/05

Aprovado: 25/08/05