

# CONSERVAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO SOB REFRIGERAÇÃO OU CONGELAÇÃO

[Goat Semen Conservation for Chilling or Freezing]

**Francisco Silvestre Brilhante Bezerra\***

Mestre em Ciência Animal. Departamento de Ciências Animais. Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), Mossoró, RN.

**RESUMO** – A conservação do sêmen caprino sob refrigeração ou congelação baseia-se na redução do metabolismo espermático, promovendo a preservação do ejaculado por longos períodos, e favorecendo o seu uso até mesmo na contra-estação reprodutiva. No entanto, para se realizar esta importante biotécnica é necessário o conhecimento de diversos aspectos como o melhor diluente e crioprotetor a serem utilizados, as taxas de resfriamento, congelação e descongelação mais adequadas, quais as interações existentes entre as substâncias presentes no plasma seminal com os diluidores a serem utilizados e ainda qual a origem das principais lesões ocasionadas pelo frio, tendo em vista sua redução. Desta forma, a presente revisão se propõe a apresentar os princípios e os protocolos mais usuais de conservação do sêmen caprino pelo frio, quer seja através do resfriamento ou mesmo da congelação.

**Palavras-chaves:** Congelação, criopreservação, refrigeração, sêmen caprino.

**ABSTRACT** – Goat semen conservation under chilling or freezing is based on a reduction in sperm metabolism, promoting the ejaculate preservation for long time and permitting its use even when it is not the seasonal breeding. However, to perform this important biotechnique is necessary to know various aspects, such as the better extender and cryoprotectant to be used, the better chilling, freezing and thawing rates, wich interactions exist with the substances present in the seminal plasma and the extenders and yet the origin of main injuries caused by cold, in order to reduce the sperm loss after thawing. Thus, this review has the objective to present the most common principles and protocols to goat semen conservation by cold, either by chilling or by freezing.

**Keywords:** Chilling, cryopreservation, goat, semen processing.

## INTRODUÇÃO

A habilidade do glicerol em proteger as células dos danos ocasionados pelo frio foi descoberta acidentalmente (Pegg, 2002). Assim, em 1948, foi descoberto pelos pesquisadores Smith, Polge e Parks que o glicerol poderia permitir a sobrevivência dos espermatozoides de aves durante a congelação a uma temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  (Polge et al., 1949). De acordo com Figueiredo (2008), várias especulações surgiram sobre como se deu essa descoberta. Atualmente, está claro que um engano ao etiquetar uma garrafa de solução em um refrigerador permitiu que o sêmen de ave fosse congelado em uma mistura de glicerol, albumina e água, ao invés da solução planejada, contendo frutose. Os resultados da experiência mostraram que a solução de frutose foi ineficaz e que a solução de glicerol, ao contrário, foi

altamente efetiva. Para o sêmen caprino, no entanto, o primeiro relato de sucesso de sua criopreservação se deu logo em seguida, no ano 1950, produzido por Polge e Smith (Bezerra, 2009).

Atualmente, sabe-se que a criopreservação do sêmen das espécies domésticas é um processo complexo que envolve o balanço de muitos fatores tendo em vista a obtenção de resultados satisfatórios. Para garantir o sucesso da criopreservação é necessário ter o conhecimento não somente do diluente e do crioprotetor apropriado, das taxas de diluição, resfriamento ou descongelação, mas também o conhecimento da própria fisiologia espermática da espécie, que é essencial para a recuperação espermática máxima após a descongelação, e, conseqüentemente, para a obtenção de altas taxas de fertilidade (Purdy, 2006).

\* Autor para correspondência. E-mail: silvestrebrilhante@hotmail.com.

Há várias formas de utilização do sêmen caprino para a inseminação artificial, tendo em vista que o mesmo pode ser usado a fresco (puro ou diluído), resfriado ou criopreservado. O sêmen fresco e o resfriado apresentam fertilidade mais elevada, mas de uso restrito ao período de atividade sexual dos machos, haja vista ser uma espécie que, em determinadas regiões, apresenta estacionalidade reprodutiva em virtude do fotoperíodo. Já o sêmen criopreservado pode ser mantido por um longo período armazenado em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>), apresentando maior aplicabilidade (Traldi, 2006).

Tendo em vista a complexidade do processo de conservação do sêmen caprino pelo frio, o presente trabalho se propõe a apresentar um levantamento geral acerca dos principais aspectos ligados à conservação do sêmen caprino sob congelação ou refrigeração.

### **PARTICULARIDADES DO SÊMEN CAPRINO**

Sabe-se que o sêmen caprino apresenta particularidades que o diferenciam do de outras espécies, sendo a mais importante a síntese e secreção de enzimas pelas glândulas bulbo uretrais liberadas no plasma seminal (Simplício & Machado, 1989). Segundo Iritani & Nishikawa (1961), essas enzimas possuem atividade fosfolipase e hidrolisam a lecitina presente na gema de ovo em lisolecitinas e ácidos graxos, altamente tóxicos para os espermatozóides. Sendo a lecitina o fosfolípide mais abundante nas membranas plasmáticas dos espermatozóides e também presente na gema de ovo, a composição enzimática do sêmen do bode e dos diluidores assume grande importância no processo de conservação do sêmen, congelado ou resfriado (Simplício & Machado, 1989). No caso dos diluidores à base de leite, uma fração protéica, também oriunda da glândula bulbo uretral, denominada SBUIII, hidrolisa os seus triglicerídeos, resultando na produção de ácidos graxos tóxicos aos espermatozóides de caprinos, como o ácido oléico, capazes de inibir sua motilidade (Corteel et al., 1983; Leboeuf et al., 2000). O efeito SBUIII pode ser direto sobre os fosfolípidos da membrana dos espermatozóides ou indireto, pela produção de derivados tóxicos dos lípidos do leite.

### **DANOS OCASIONADOS PELO RESFRIAMENTO DO SÊMEN**

Envolvendo toda a célula espermática, existe a membrana plasmática que é composta por uma dupla camada de lípidos, proteínas e carboidratos. As

membranas espermáticas são as estruturas mais afetadas pelo choque térmico (Amann & Graham, 1993). Os danos causados pelo estresse térmico são decorrentes de danos estruturais diretos, como a ruptura das membranas ou, indiretos, por alterações das funções celulares (Squires et al., 1999).

Em geral, quando os espermatozóides mamíferos são submetidos a temperaturas inferiores a 5°C, ocorre o choque térmico pelo frio, definido como uma criodestruição que causa perda irreversível da motilidade e redução significativa da atividade respiratória e da glicólise (De Leeuw et al., 1991; Parks & Lynch, 1992). O choque térmico acarreta desequilíbrio iônico (aumento do Ca<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup> e Zn<sup>++</sup> intracelulares e perda de íons K<sup>++</sup> e Mg<sup>++</sup>), com conseqüente redução da motilidade espermática. Isso porque durante o resfriamento, esse desbalanço provoca lesões na membrana com mudança na sua permeabilidade (Watson, 1996). O choque térmico pelo frio causa lesões, especialmente no acrossomo, com desprendimento e perda do conteúdo enzimático. Dessa forma, qualquer dano ocorrido no acrossomo pode inibir a capacidade fecundante do espermatozóide (Woelders, 1990).

Já durante o processo de congelação, os espermatozóides são expostos a vários fatores estressantes: transição de fase dos fosfolípidos da membrana, estresse osmótico e tóxico pela adição e remoção de crioprotetores, desidratação, aumento da concentração dos solutos e formação e dissolução de cristais de gelo (Bortolozzo et al., 2008).

Duas hipóteses são utilizadas para explicar as injúrias às células espermáticas decorrentes da congelação, dependendo da taxa de congelação do sistema: a formação de gelo intracelular a taxas rápidas de congelação, e, o “efeito solução” a taxas lentas de congelação (Mazur, 1970). Quando a taxa de congelação é rápida, a água intracelular congela e forma cristais de gelo, tidos como letais para a célula. Por outro lado, quando a taxa de congelação é lenta os cristais de gelo se formam na solução extracelular primeiro, o que gera um aumento na concentração de eletrólitos da fração não congelada. O aumento na concentração induz, conseqüentemente, desidratação celular através de uma diferença de pressão osmótica. Se a desidratação é severa, toxicidade ou injúria celular pode ser induzida devido à alta concentração de eletrólitos, o que é denominado de “efeito solução” (Fahy, 1980). Sabe-se que a formação de cristais intracelulares é letal e consiste no principal mecanismo de danos envolvido quando usadas taxas rápidas de congelação (Toner et al., 1993), mas, a injúria pelo “efeito solução” não está completamente

compreendida (Han & Bischof, 2004). Porém, tanto o gradiente osmótico extracelular quanto a formação de cristais de gelo intracelulares causam alterações na organização das membranas bem como na função das organelas (Mazur, 1984).

### **DILUENTES PARA USO NO SÊMEN CAPRINO**

Os diluentes são utilizados com o intuito de proteger os espermatozoides dos efeitos críticos da congelação. Um bom diluente se caracteriza pela ausência de toxicidade à célula espermática; pela osmolaridade adequada, onde o espermatozoide caprino prefere meios hipertônicos entre 425 e 525 mOsm; poder nutritivo e tampão eficaz; pelos estabilizadores de membrana; pelo pH (potencial hidrogeniônico) em torno da neutralidade (para caprinos entre 6 e 8), que favorece a sobrevivência espermática e, por último, por ser de fácil preparo e baixo custo (Concannon & Batista, 1989; Purdy, 2006).

Segundo Gibbons (2002), é imprescindível na composição de um diluente usado para a congelação do sêmen caprino uma substância tampão como o Tris, sais como o citrato de sódio, um ou mais açúcares (glicose, frutose, lactose, rafinose ou trealose), crioprotetores penetrantes (glicerol, etilenoglicol ou dimetilsulfóxido) e não-penetrantes (leite ou gema de ovo) além de antibióticos, sendo a penicilina e a estreptomicina os mais utilizados.

Um dos diluentes mais utilizados para sêmen caprino é o Tris, ácido cítrico, frutose, gema de ovo e glicerol (Neves et al., 2008). O Tris (Tris-hidroximetil-aminometano -  $H_2NC(CH_2OH)_3$ ) é uma substância solúvel em água, disponível comercialmente em um alto grau de pureza na forma de cristais. Ele permanece estável em temperatura ambiente por diversos meses, atuando como tampão iônico bipolar em pH entre 7,0 e 9,0 (McPhail & Goodman, 1984).

De acordo com Purdy (2006), além do Tris, diluentes à base de leite em pó desnatado também são muito utilizados, entretanto o primeiro confere os melhores resultados de motilidade após a descongelação (Deka & Rao, 1987). Isso porque, tal como já relatado anteriormente, o sêmen caprino apresenta particularidades que limitam o uso exacerbado de diluentes ricos em fosfolípidos, como aqueles à base de leite ou mesmo com altas proporções de gema de ovo. Diante deste problema, buscou-se um meio diluente pobre em fosfolípidos, sendo então desenvolvida a água de coco em pó

(ACP<sup>®</sup>), uma substância nutritiva mas pobre em fosfolípidos, como uma alternativa viável para a diluição do sêmen caprino (Neves et al., 2008).

### **CRIOPROTETORES PARA USO NO SÊMEN CAPRINO**

No intuito de reduzir as crioinjúrias, várias substâncias foram utilizadas como crioprotetores, que são componentes normalmente não encontrados nas células vivas (Fuller, 2004; Purdy, 2006). De acordo com Amann (1999), os crioprotetores se classificam como penetrantes ou não-penetrantes. Um crioprotetor não-penetrante, não consegue atravessar a membrana plasmática e age extracelularmente. Assim, ele pode atuar como um soluto e reduzir a temperatura de congelação do meio. Já os crioprotetores penetrantes, são permeáveis à membrana plasmática e agem intra e extracelularmente. Como são solúveis, causam a desidratação do espermatozoide devido ao fluxo de água osmoticamente direcionado. Após curtos períodos de tempo, o crioprotetor e a água se equilibram, resultando em iguais concentrações extra e intracelulares.

Muitos crioprotetores penetrantes (glicerol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, etilenoglicol, propilenoglicol) e suas combinações têm sido testadas para o sêmen caprino, todavia, o crioprotetor penetrante mais frequentemente utilizado continua sendo o glicerol (Purdy, 2006; Bezerra, 2009). A adição do glicerol pode ser realizada em 1, 2 ou 3 passos à temperatura de 37°C ou de 5°C, sendo que a concentração final de uma substância crioprotetora é determinada pela toxicidade da própria substância química utilizada (Purdy, 2006). Assim, os crioprotetores podem apresentar níveis de toxicidade dependentes de sua concentração e da duração da exposição das células a estes agentes, o que denota a importância da identificação da concentração ideal que balanceie a toxicidade e a ótima crioproteção (Fuller, 2004).

### **SÊMEN CAPRINO CONSERVADO SOB REFRIGERAÇÃO**

À temperatura corporal, o metabolismo espermático é alto e, a cada 10°C de sua queda, este se reduz em cerca de 50%. Quando os espermatozoides são mantidos a 5°C, apenas 10% de seu metabolismo é necessário para sua sobrevivência quando comparado à preservação a 38°C. Desta forma, a refrigeração reduz o catabolismo espermático, o que é necessário para a preservação do ejaculado por

longos períodos (Squires et al., 1999). Dessa forma, a redução da temperatura diminui reversivelmente a atividade metabólica do espermatozóide, possibilitando assim a sua armazenagem (England, 1993).

Segundo Gonçalves et al. (2001) e Medeiros et al. (1994), o sêmen caprino pode ser conservado sob refrigeração a 4°C podendo ser utilizado em um curto espaço de tempo, tendo sua viabilidade máxima de 48hs. Este tipo de sêmen apresenta a vantagem de possuir uma fertilidade mais elevada com o uso da IA em relação ao sêmen congelado (Traldi, 1994). Siqueira et al. (2009) inseminaram fêmeas da raça Toggenburg com sêmen diluído em Tris-frutose-gema de ovo a 2,5%, envasado em palhetas de 0,25, com  $150 \times 10^6$  espermatozoides/mL e resfriado a 5°C durante 12 e 24h. Os autores não observaram diferença significativa entre os tratamentos e obtiveram uma taxa de concepção de 66,14% para as fêmeas inseminadas com sêmen resfriado por 12h, e de 62,5% para aquelas inseminadas com sêmen resfriado por 24h, concluindo que a utilização do sêmen resfriado a 5°C em até 24h seria uma opção viável e facilitadora do transporte a longas distâncias.

O resfriamento do sêmen ocorre de maneira progressiva em geladeira, onde permanece por 45 minutos dentro de um tubo inserido em bquer ou um copo de vidro contendo água até atingir a temperatura de 4°C. Para a inseminação com sêmen resfriado a diluição pode ser realizada com uma parte de sêmen para nove partes do diluente; isto é, para 1,5ml de sêmen, adiciona-se 13,5ml do diluente, quantidade suficiente para inseminar 30 fêmeas; já que se utiliza 0,5ml da solução por inseminação. (Gonçalves et al., 2001).

### **SÊMEN CAPRINO CONSERVADO SOB CONGELAÇÃO**

Segundo Ribeiro (1997) com o uso da I.A com sêmen congelado, o número de fêmeas por reprodutor é superior sendo difícil de ser determinado, onde uma única ejaculação pode produzir de 10 até 40 doses de sêmen dependendo da quantidade do mesmo e quantidade de espermatozoides utilizados por dose. O processo de criopreservação de sêmen, além de possibilitar sua utilização por períodos mais longos de tempo, reduz custos com a aquisição e transporte de reprodutores e favorece rápida difusão de material genético entre regiões, países e continentes (Castelo et al., 2008).

De acordo com Bezerra (2009) no processamento para a congelação do sêmen caprino, o sêmen fresco deve ser diluído em Tris-gema de ovo a temperatura ambiente (32°C), avaliadas quanto à sua motilidade progressiva (para verificar o efeito da diluição sobre a qualidade do sêmen) e posteriormente acondicionado em caixa isotérmica de poliestireno expandido durante o período de 40min, visando alcançar uma temperatura de 15°C. Alcançada esta temperatura, o sêmen é então transferido para o refrigerador por mais 30 min para que a temperatura caia para 5°C. Após a refrigeração, o sêmen o sêmen é submetido a uma segunda diluição com Tris-gema acrescido de glicerol a uma concentração final de 6% e avaliado quanto à motilidade progressiva mais uma vez (para verificar o efeito do crioprotetor sobre a qualidade do sêmen). Essa diluição final resulta em uma concentração espermática de  $150 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

O sêmen refrigerado pode ser envasado em palhetas plásticas de 0,5 e 0,25 mL. Maxwell et al. (1995) afirmaram que um método de envase adequado é aquele que permite a identificação de cada dose de sêmen e ainda, um melhor armazenamento no botijão de nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>), ocupando menor espaço. Bezerra (2009), avaliaram a influência do volume das palhetas de 0,25 e 0,5mL sobre a qualidade do sêmen caprino descongelado e concluíram que o envase nesta última promove maiores resultados de motilidade progressiva após a descongelação, sendo esta portanto a mais recomendada para o envase do sêmen nesta espécie.

Para a congelação propriamente dita Sundararaman & Edwin (2008) recomendam que as palhetas sejam dispostas horizontalmente em uma rampa de congelação a uma altura de 5 cm do nível de nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>), alcançando temperatura aproximada de - 70 °C pela exposição ao vapor. Finalmente, as palhetas são armazenadas em N<sub>2</sub> até o dia da descongelação.

Bezerra (2009) inseminou cabras S.R.D. do Semi-árido potiguar com sêmen congelado diluído em Tris-frutose-gema de ovo a 2,5% acrescido de 6% de glicerol. Antes da inseminação as cabras tiveram o estro sincronizado através do uso de esponjas vaginais contendo acetato de medroxiprogesterona. Uma taxa de concepção de 42,7% foi observada.

### **DESCONGELAÇÃO**

Para ser utilizado, o sêmen criopreservado deve ser submetido ao processo de descongelação.

Tradicionalmente, o sêmen caprino envasado em palhetas é descongelado a 37 °C durante 12 a 30 s (Cabrera et al., 2005; Purdy, 2006). Bezerra (2009) não observaram diferenças entre a descongelação do sêmen caprino realizada a 37 °C/1 min. e a 55 °C/7 s. Entretanto, deve-se observar que durante o uso de taxas rápidas de descongelação com temperaturas mais altas, o tempo torna-se um ponto crítico, visto que se excedido, pode resultar em altas taxas de mortalidade espermática. Assim, a descongelação do sêmen a 37°C é mais recomendável sob condições práticas de inseminação artificial, pois o risco de superaquecimento é menor.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar das tentativas de aperfeiçoamento dos protocolos de resfriamento e congelação do sêmen caprino, atualmente, a inseminação artificial nesta espécie com sêmen fresco tem se tornado uma técnica freqüente comparativamente ao sêmen congelado. Isso porque, como em outras espécies domésticas, o processo de congelação reduz a viabilidade do sêmen caprino, e, a taxa de nascimentos após IA com sêmen congelado varia entre 30 e 70% (Ritar & Salamon, 1983; Leboeuf et al., 2003; Dorado et al., 2007), enquanto que para o sêmen fresco ou resfriado esses valores sobem para 60 a 80% (Ritar & Salamon, 1983; Roca et al., 1997; Paulenz et al., 2005). No entanto, vários estudos sobre o processamento, congelação e descongelação de espermatozóides caprinos vêm sendo conduzidos visando à redução das crioinjúrias. E, assim, com o conhecimento mais aprofundado sobre a fisiologia da espécie e do processamento seminal, o uso do sêmen caprino congelado e resfriado se tornará cada vez mais freqüente, haja vista os seus benefícios para a conservação deste tipo de germoplasma.

### REFERÊNCIAS

- Amann R.P. 1999. Cryopreservation of sperm. In: Knobil E. & Neill J.D. (Eds.). Encyclopedia of Reproduction. Burlington: Academic Press, p.773-783.
- Amann R.P. & Graham J.K. 1993. Spermatozoal function. In: McKinnon A.O. & Voss J.L. (Ed.). Equine reproduction. Philadelphia: Lea & Febiger, p.715-745.
- Bezerra F.S.B. 2009. Criopreservação do sêmen caprino: efeito de diferentes palhetas, taxas de descongelação e crioprotetores. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal área de concentração Produção e Sanidade Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró, 93f.
- Bortolozzo F.P., Bernardi M.L., Bennemann P.E., Wentz I. 2008. Inseminação artificial em suínos. In: Gonçalves P.B.D., Figueiredo J.R. & Freitas V.J.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2ª ed. São Paulo: Roca. 395p.
- Cabrera F., González F., Batista M., Calero P., Medrano A., Gracia A. 2005. The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of canary Buck (*Capra hircus*). *Reprod. Dom. Anim.*, 40:191-195.
- Castelo T.S., Frota T.R. & Silva A.R. 2008. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Vet. Bras.*, 2:67-75.
- Concannon P.W. & Battista M. 1989. Canine semen freezing and artificial insemination. In: KIRK, R.W. Current Veterinary Therapy. Philadelphia: WB Saunders. p. 1247-1259.
- Corteel J.M., Baril G. & Leboeuf B. 1984. Goat semen technology. In: Nijhoff, M. The Male in Farm Reproduction Seminar, 1983, Nouzilly. Proceedings... Boston. p. 237-256.
- Deka B.B. & Rao A.R. 1987. Effect of extenders and thawing methods on post-thawing preservation of goat semen. *Ind. Vet. J.*, 64:591-594.
- De Leeuw F.E., Colebrander B. & Verkleij A.J. 1991. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Reprod. Domest. Anim.*, p. 95-104, suppl. 1.
- Dorado J., Rodríguez I. & Hidalgo M. 2007. Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology*, 68:168-177.
- England G.C.W. 1993. Cryopreservation of dog semen: a review. *Journal of Reproduction and Fertility*, 47:243-255.
- Fahy G.M. 1980. Analysis of solution effects injury—equations for calculating phase diagram information of the ternary system NaCl-dimethylsulfoxide-water and NaCl-glycerol-water. *Biophys. J.*, 32:837-850.
- Figueiredo J.R., Rodrigues A.P.R., Amorim C.A. & Silva J.R.V. Manipulação de óocitos inclusos em Foliculos Ovarianos Pré-antrais. In: Gonçalves P.B.D., Figueiredo J.R. & Freitas V.J.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2ª ed. São Paulo: Ed. Roca. 395 p.
- Fuller B. J. 2004. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo. Lett.*, 25:375-388.
- Gibbons, A. 2002. Inseminacion artificial con semen congelado en cabras da raza angora. *Revista Taurus*, 4:24-32.
- Gonçalves P.B.D., Figueiredo J.R. & Freitas V.J.F. 2002. Biotécnica aplicada à reprodução animal. 1ª Ed. São Paulo: Varela. 340p.
- Han B., Bischof J.C. 2004. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. *Cryobiology*, 48:8-21.
- Iritani A.J. & Nishikawa Y. 1961. Studies on the egg yolk coagulating factor in goat semen. II. Properties of the coagulating factor and influential condition for coagulation. In: Silver Jubilee Laboratory Animal Husbandry Kyoto University, Kyoto. Proceedings...Kyoto, 1961. p. 97-104
- Leboeuf B., Forgerit Y., Bernelas D., Pougarda J.L., Sentya E. & Driancourt M.A. 2003. Efficacy of two types of vaginal sponges to control onset of oestrus, time of preovulatory LH peak and kidding rate in goats inseminated with variable numbers of spermatozoa. *Theriogenology*, 60:1371-1378.

- Leboeuf B., Restall B. & Salamon S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 62:113-141.
- McPhail D.B. & Goodman B.A. 1984. Tris buffer – a case for caution in its use for cooper containing systems. *Bioch. J.*, 221:559-560.
- Maxwell W.M.C., Landers A.J. & Evans G. 1995. Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubes. *Theriogenology* 43:1202-1210.
- Mazur, P. 1970. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science*, 168:939-949.
- Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 247:125-142.
- Medeiros L.P., Girão R.N., Girão E.S. & Pimentel J.C.M. 1984. Caprinos: Princípios básicos para sua exploração. Teresina: Embrapa-CPAMN/SPL, p. 63-78.
- Neves J.P., Nunes J. F., Moraes J.C.F., Souza C.J.H., Salgueiro C.C.M. & Almeida J.L. 2008. Inseminação artificial em pequenos ruminantes. In: Gonçalves P.B.D., Figueiredo J.R. & Freitas V.J.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2ª ed. São Paulo: Ed. Roca. 395 p.
- Parks J.E. & Lynch D.V. 1992. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, Bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 29:255-266.
- Paulenz H., Söderquist L., Soltun K., Saether P.A., Fjellsoy K.R. & Andersen Berg K. 2005. Effect of cervical and vaginal insemination with liquid semen stored at room temperature on fertility of goats. *Anim. Reprod. Sci.*, 86:109-17.
- Pegg D.E. 2002. The history and principles of cryopreservation. *Semin. Reprod. Med.*, 20: 5-13.
- Polge C., Smith A.U. & Parkes A.S. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164: 666-666.
- Purdy, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rumin. Res.*, 63:215-225, 2006.
- Ribeiro S.D.A. 1997. Criação racional de caprinos. São Paulo: Nobel, p. 157-72.
- Ritar A.J. & Salamon S. 1983. Fertility of fresh and frozen-thawed semen of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.*, 36:49-59.
- Roca J., Carrizosa J.A., Campos I., Lafuente A., Vázquez J.M. & Martínez E. 1997. Viability and fertility of unwashed Murciano-Grandina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5°C. *Small Rum. Res.*, 25:147-53.
- Simplício A.A. & Machado R. 1989. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial na espécie caprina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 8., 1989, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: CBRA, 1989. p.171-177
- Siqueira A.P., Silva Filho J.M., Fonseca J.F., Bruschi J.H., Palhares M.S., Borges A.M., Bruschi M.C.M., Peixoto M.P. & Rossi R. 2009. Taxa de concepção de cabras inseminadas com sêmen caprino resfriado a 5°C, por 12 ou 24 horas, em meio diluidor à base de gema de ovo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 61:66-71.
- Squires E.L., Pickett B.W., Graham J.K., Vanderwall D.K., McCue P.M. & Brummer J.E. 1999. Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, p.1-38. (Bulletin, 9).
- Smith A.H. & Polge C. 1950. Survival of spermatozoa at low temperatures. *Nature*, 166:668-671.
- Sundaraman M.N. & Edwin M.J. 2009. Changes in motility characteristics of goat spermatozoa during glycerol-equilibration and the relevance to cryopreservation. *Asian J. Cell. Biol.*, 3:22-23.
- Toner R., Cravalho E.G. & Karel M. Cellular response of mouse oocytes to freezing stress: prediction of intracellular ice formation. *J. Biomech. Eng.*, 115:169-174, 1993.
- Traldi A.S. 1994. Tópicos em reprodução e I.A. em caprinos – Manual técnico. Texto apostilado.
- Traldi A.S. 2006. Biotécnicas Aplicadas em Reprodução de Pequenos Ruminantes. In: FEINCO 3.
- Watson P.F. 1996. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reprod. Dom. Anim.*, 31:135-140.
- Woelders, H. 1991. Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 1:145-164, 1991. Supplement.