

CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN OVINO EM PELLETS COM ETILENO GLICOL¹

ETHYLENE GLYCOL FOR FREEZING RAM SEMEN IN PELLETS

Cácio do Nascimento Moraes² Jairo Pereira Neves³ Paulo Bayard Dias Gonçalves³
João Francisco Coelho de Oliveira⁴ Cristine Marie Schweitzer²

RESUMO

Com a finalidade de avaliar a eficácia do etileno glicol para a preservação do sêmen ovino, utilizou-se 16 pools de sêmen, sendo cada um dividido em quatro aliquotas com concentrações de 0,3M, 0,5M e 0,7M de etileno glicol para comparação com 0,72M de glicerol. A avaliação do sêmen por teste de termo-resistência demonstrou que a motilidade inicial, final e vigor final foram semelhantes para 0,5M de etileno glicol e 0,72M de glicerol, e superiores aos demais tratamentos. No entanto, o grupo que utilizou o etileno glicol em 0,5M proporcionou uma melhor proteção acrossomática. Setenta ovelhas divididas em três grupos (etileno glicol 0,5M, glicerol 0,72M e sêmen fresco), foram submetidas a sincronização deaios, inseminação, pela via cervical e diagnóstico de gestação aos 45 dias de gestação por ultra-sonografia. Não foram observadas diferenças significativas entre o grupo do etileno glicol com os do sêmen fresco e glicerol, porém verificou-se diferença entre os grupos do sêmen fresco e do glicerol. Considerando os resultados obtidos, conclui-se que o etileno glicol utilizado na concentração de 0,5M propicia motilidade e vigor semelhantes ao glicerol (0,72M), porém proporciona uma melhor proteção acrossomática.

Palavras-chave: etileno glicol, congelamento sêmen, ovinos.

SUMMARY

The aim of the present study was to verify the efficiency of ethylene glycol for freezing ram semen. A total of 16 pools of semen was used and each pool was divided in four fractions, which were frozen with ethylene glycol (in concentration of 0.3M, 0.5M or 0.7M) or glycerol (0.72M; control group). The percentage of motile

spermatozoa after thawing (initial motility) and after 5 hour of incubation at 37°C (final motility) as well as the final sperm vigor were similar after freezing with ethylene glycol (0.5M) and glycerol (0.72M). The other concentrations of ethylene glycol resulted in lower sperm motility and vigor. However, ethylene glycol, in the concentration of 0.5M, was able to increase the number of sperm with intact acrosomes. Seventy ewes were divided into three different treatments (ethylene glycol-0.5M, glycerol-0.72M and fresh semen). The estrous were synchronized and the ewes were inseminated by cervical technique. Forty-five days after finishing the artificial insemination program, pregnancy diagnosis was performed by ultrasound. The pregnancy rate was similar when the ethylene glycol treatment group was compared to the glycerol and fresh semen. However, the percentage of pregnancy was higher in the group of ewes inseminated with fresh semen than with semen frozen with glycerol ($p < 0.0003$). Considering these results, we can conclude that ethylene glycol in a concentration of 0.5M is efficient for freezing ram semen, allowing post-thaw sperm motility similar to glycerol (0.72M) but with higher number of intact acrosomes.

Key words: ethylene glycol, frozen semen, sheep.

INTRODUÇÃO

A melhoria da qualidade do sêmen ovino congelado tem sido motivo de muitas pesquisas, visando o aumento dos índices de nascimento de ovelhas inseminadas pela via cervical. Esta técnica torna o emprego do sêmen mais acessível, reduzindo

¹Trabalho realizado com suporte financeiro da FAPERGS.

²Médico Veterinário, MSc, autônomo, Lages, SC.

³Professor Titular, Doutor, Departamento de Clínica de Grandes Animais, Centro de Ciências Rurais (CCR), Univesidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, 97015-900, e-mail: jpneves@lince.hcv.ufsm.br. J.P. Neves: autor para correspondência.

⁴Professor Assistente, MSc, Depto de Clínica de Grandes Animais, CCR, UFSM, Santa Maria, RS.

os custos e a necessidade de mão-de-obra especializada requeridas pela inseminação intra-uterina utilizando a laparoscopia. A partir da utilização do glicerol como crioprotetor, as pesquisas sobre congelamento de sêmen tiveram um grande avanço, porém na espécie ovina o sêmen congelado utilizado pela via cervical ainda não proporciona resultados satisfatórios, devido a alterações bioquímicas e moleculares espermáticas ocorridas durante o processo de congelamento e descongelamento, redução do tempo de sobrevivência e falha de transporte após deposição no sistema genital da ovelha.

A criopreservação atinge diretamente a membrana plasmática dos espermatozoides, nas interações entre seus componentes através da influência das diversas etapas de resfriamento, congelamento e descongelamento (PARKS & GRAHAM, 1992). A origem do comprometimento permanece incerta, mas algumas evidências sugerem que a membrana espermática fica afetada no reordenamento lipídico desde o resfriamento até o reaquecimento, desorganizando as associações lipo-proteicas, as quais são indispensáveis para o seu funcionamento. As membranas celulares, incluindo a dos espermatozoides, também são afetadas durante a congelamento e descongelamento, através da adição do crioprotetor, das alterações volumétricas, associadas a distensão e contração em resposta a soluções hiperosmóticas, da desidratação induzida pela congelamento, da elevada concentração de solutos e da formação de gelo intracelular (WEITZE & PETZOLDT, 1992).

A congelamento e a descongelamento do sêmen determinam marcadas alterações na estrutura da membrana, redução do transporte espermático e sua viabilidade no sistema genital das ovelhas (MATTFNER *et al.*, 1969; LIGHTFOOT & SALAMON, 1970; VALCÁRCEL *et al.*, 1994). Após a descongelamento, o percentual de membranas íntegras fica reduzido em 70% e foi encontrada uma correlação positiva entre este percentual de membranas íntegras imediatamente após a descongelamento e a motilidade após 8 horas de incubação a 37°C (VALCÁRCEL *et al.*, 1994). Outros autores consideram que somente 10 a 20% das células espermáticas continuam competentes para a fecundação, após a descongelamento. Isto tem sido sustentado através de experimentos comparativos, utilizando inseminações com sêmen fresco e congelado (SALAMON & MAXWELL, 1995b).

Os crioprotetores podem ser classificados em intracelulares, constituídos de moléculas pequenas requerendo maior concentração e extracelulares, constituídos de moléculas grandes e que requerem uma

menor concentração para que protejam as células contra as crioinjúrias (MERYMAN, 1971). O glicerol, o DMSO (dimetil sulfoxido), o 1,2-propanodiol e o etileno glicol, são intracelulares. Os extracelulares são constituídos de grandes moléculas de açúcar como a sacarose, rafinose, proteínas e lipoproteínas contidas no leite, gema de ovo e soro sanguíneo (RODRIGUES, 1992).

O glicerol é conhecido como protetor contra danos durante a criopreservação (POLGE *et al.*, 1949), e a sobrevivência dos espermatozoides em baixas temperaturas depende de sua concentração no meio (JONES, 1969; COLAS, 1975; WATSON & MARTIN, 1975; NEVES, 1980; JOSHI, 1990). O mecanismo pelo qual ele protege as células não está completamente esclarecido. A hipótese mais provável é que sua ação mais efetiva ocorra ao nível extracelular (AMANN & PICKETT, 1987) sendo possível a congelamento do sêmen ovino logo após a sua adição (MATOS *et al.*, 1992). Contrariamente, BERNDTSON & FOOTE (1972) sugerem que ocorra uma rápida penetração do glicerol nos espermatozoides. A presença de glicerol durante a congelamento diminui a concentração de sais no interior do espermatozoide, esperando-se com isso que ele auxilie na estabilização da membrana plasmática, pois esta alta concentração é nociva a membrana (HOLT *et al.* 1992).

O etileno glicol é um crioprotetor que despertou interesse para a congelamento do sêmen ovino e quando utilizado na concentração de 1,5% e 2,0% mostrou-se semelhante ao glicerol (3,5%). A fertilidade do sêmen congelado em meio composto de citrato, lactose e gema de ovo com 1,75% de etileno glicol ou 3,5% de glicerol foi de 22%, para ambos os tratamentos (PLATOV, 1965). Quando utilizado na concentração de 5% foi inferior ao glicerol (5%). O sêmen congelado em *pellets* utilizando 1,75% e 3,5% de etileno glicol teve melhor resultado que o glicerol em iguais concentrações, porém a concentração de etileno glicol que melhor protege os espermatozoides foi de 1,5% (SALAMON & MAXWELL, 1995a). A utilização do sêmen equino propiciou resultados semelhantes ao glicerol, quanto a motilidade e vigor, no entanto os índices de prenhez foram melhores quando foi utilizado o etileno glicol (MERCANTE *et al.*, 1995; NEVES NETO *et al.*, 1995). Atualmente os estudos com etileno glicol tem se concentrado no âmbito da criopreservação de embriões, permitindo bons resultados de prenhez e facilitando a descongelamento (VOELKEL, 1992ab; VISINTIN *et al.*, 1995ab). Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a eficácia do etileno glicol para preservação do sêmen ovino.

MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizaram-se três carneiros da raça Ile de France e um da 3/4 Romney Marsh + 1/4 Merino Booroola, todos com 3 anos de idade, em bom estado nutricional e aptos para a reprodução. Durante os experimentos, os animais foram mantidos em estábulos individuais num regime de semi-confinamento e submetidos a um regime de duas coletas de sêmen por dia, duas vezes por semana. Os ejaculados, para formação de um "pool", foram obtidos com vagina artificial e colocados em banho-maria à 30°C, sendo avaliados quanto ao volume (mL), turbilhão (1-3 cruzes), motilidade (%), vigor (1-5) e concentração espermática. Procedeu-se também a tomada de uma amostra de sêmen para avaliação da morfologia espermática.

Foram utilizados somente os ejaculados com os seguintes padrões mínimos: volume 0,5mL, turbilhão nível 2, motilidade de 65%, concentração de $3 \times 10^6/\text{mm}^3$ (cremoso fino) e 80% de espermatozóides morfológicamente normais. A avaliação da integridade de acrossomo e da morfologia espermática foram realizadas em preparação úmida em microscópio de contraste de fase (1000x). Foram contados um total de 100 espermatozóides por amostra. As demais avaliações foram realizadas em microscópio com iluminação convencional.

O congelamento do sêmen foi em *pellets*, com volume de 130µL, correspondendo a uma concentração mínima de 100×10^6 espermatozóides/mm³, a partir da diluição de uma parte de sêmen para três partes de diluente, conforme técnica desenvolvida por EVANS & MAXWELL (1987). A congelamento do sêmen foi realizada em placa de acrílico de 4mm de espessura a uma distância de 3cm acima do nível do nitrogênio líquido.

Para os estudos *in vitro*, foram constituídos quatro grupos, conforme o crioprotetor utilizado e sua concentração. Cada pool de sêmen, constituído por quatro ejaculados dos diferentes carneiros utilizados, foi dividido em quatro alíquotas, as quais foram diluídas com solução estoque adicionada do crioprotetor (0,3M, 0,5M ou 0,7M de etileno glicol ou 0,72M de glicerol - grupo controle). A solução estoque foi composta de 3,87g de Tris (Hydroximethyl) aminometano; 0,533g de glicose; 2,123g de ácido cítrico; 16mL de gema de ovo; 100.000UI de penicilina; 100mg de estreptomicina; água tri-distilada e deionizada até 100mL (EVANS & MAXWELL, 1987). Cada *pellet* foi constituído com uma concentração mínima de 100 milhões de espermatozóides.

A descongelamento do sêmen ocorreu sempre 24 horas após sua congelamento, em banho-maria 37°C, em um tubo de ensaio contendo 0,39mL de citrato de sódio a 2,94%, com o cuidado de agitar o tubo até o completo descongelamento. Foram avaliadas a motilidade e o vigor logo após o descongelamento e após 5 horas de incubação, assim como a morfologia do acrossomo logo após a descongelamento.

Para a inseminação artificial foram utilizadas 70 ovelhas da raça Ideal com idade entre 2 e 3 anos, as quais tiveram ciclo sincronizado com esponjas intra-vaginais (50mg de acetato de progesterona) e ovulação induzida com eCG (500UI) aplicado via intramuscular. Utilizou-se sêmen criopreservado com etileno glicol (0,5M) ou glicerol (0,72M) por deposição cervical superficial utilizando uma pipeta de vidro (EVANS & MAXWELL, 1987), na qual foi acoplada uma seringa para aspiração e deposição do sêmen. Cada dose de sêmen continha um mínimo de 200×10^6 de espermatozóides, correspondendo a dois *pellets*. O sêmen fresco foi obtido com vagina artificial, avaliado e mantido à 30°C até o momento de sua aplicação. A inseminação foi realizada em média 12 horas após detecção do cio, mediante a deposição cervical superficial.

O experimento foi desenvolvido em blocos inteiramente casualizados, sendo que cada "pool" de sêmen utilizado no experimento ($n = 16$) foi considerado um bloco. Tendo em vista que os resultados obtidos foram em percentagem, os dados foram transformados pelo PROC RANK no programa estatístico SAS (1988), para usar um modelo de análise estatística paramétrico. Os resultados encontrados nos diferentes tratamentos foram comparados usando o seguinte modelo aditivo para o delineamento experimental em blocos casualizados:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ijk}$$

onde Y_{ijk} foram as percentagens transformadas obtidas pelos tratamentos nos diferentes experimentos, μ foi a constante comum a todas as observações, α foram os efeitos dos tratamentos, β_j foram os efeitos dos blocos, e ε_{ijk} foi o efeito residual. As médias foram comparadas pelo contraste do método dos mínimos quadrados ponderados no PROC GLM (SAS, 1988).

As percentagens de prenhez obtidas com sêmen fresco, congelado com glicerol ou etileno glicol foram analisadas por qui-quadrado. Os resultados dos tratamentos foram comparados utilizando a análise de contraste no PROC CATMOD (SAS, 1988).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão expressos os valores de motilidade e vigor logo após o descongelamento, no final do teste de termo-resistência lento, assim como o percentual de acrossomos alterados imediatamente após o descongelamento. A concentração de etileno glicol de 0,5M proporcionou os melhores resultados, pois além da mesma motilidade espermática observada no grupo controle (glicerol), proporcionou uma melhor proteção acrossomática. Os grupos do glicerol e 0,7M de etileno glicol caracterizaram-se por uma alta percentagem de alterações de acrossomo, diferindo ($P < 0,05$) das outras duas concentrações de etileno glicol. Tanto a motilidade como o vigor, observados nos diferentes momentos de avaliação espermática, não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) entre os grupos do glicerol e de 0,5M de etileno glicol.

Os resultados indicaram que 0,5M de etileno glicol foi capaz de manter uma motilidade inicial semelhante a do glicerol ($P = 0,443$) e promover uma melhor proteção do acrossomo ($P < 0,0001$), indicando que a sua capacidade de crioproteção foi superior a do glicerol. O etileno glicol (0,3M) representa 1,7% do diluente, ficando na concentração considerada por SALAMON & MAXWELL (1995a) a ideal. Neste experimento, a utilização de 0,3M proporcionou os melhores percentuais de preservação acrossomática, porém não diferiu de 0,5M ($P > 0,146$), que mostrou-se superior em motilidade inicial ($P > 0,0001$) e ao final do período de incubação ($P > 0,0001$), sendo o mesmo efeito observado no vigor. Quando o etileno glicol foi utilizado na maior concentração (0,7M = 3,9%), apresentou o pior

desempenho, tanto em motilidade e vigor, quanto em alterações de acrossomo. Outros experimentos comparando glicerol e etileno glicol em concentrações idênticas (5%), demonstraram uma superioridade do glicerol (SALAMON, 1968). Resultados similares foram observados neste experimento, onde foi encontrada uma diminuição significativa da eficiência do etileno glicol, na maioria dos parâmetros estudados, quando as concentrações foram superiores a 0,5M (2,8%). Assim, pode-se determinar que são necessárias menores concentrações de etileno glicol do que de glicerol para obter índices ideais de criopreservação do sêmen ovino. A propriedade do etileno glicol em melhor preservar o acrossomo, pode significar também uma melhor preservação de outras estruturas dos espermatozoides, como o núcleo, cuja integridade é indispensável para que ocorra um perfeito desenvolvimento embrionário e que a gestação chegue a termo. Isto pode explicar porque em equinos, onde o glicerol e o etileno glicol foram semelhantes em motilidade e vigor, houve superioridade em prenhez quando o crioprotetor utilizado foi o etileno glicol (MERCANTE *et al.*, 1995; NEVES NETO *et al.*, 1995). Este fato é importante, pois a utilização de sêmen congelado na espécie ovina proporciona uma maior perda embrionária (MIES FILHO, 1987; MORAES, 1992).

A melhor proteção do acrossomo com a utilização do etileno glicol (0,5M), pode ser explicada pela sua velocidade de penetração. O etileno glicol penetra mais rápido na célula, o que poderá proporcionar uma diminuição da alta concentração de sais no interior do espermatozoide. Esta alta concentração de sais é nociva a membrana espermática (HOLT *et al.* 1992). Os efeitos do glicerol sobre o espermatozoide tem sido motivo de várias pesquisas, porém ainda não se conseguiu bons índices de nascimento de cordeiros em programas de inseminação cervical, utilizando este crioprotetor com os atuais diluentes. O potencial do etileno glicol em melhor proteger a membrana celular faz acreditar que com esse crioprotetor as chances em obter sucesso através da inseminação cervical são maiores, pois permitiria uma maior sobrevivência espermática, considerando as correlações já estudadas sobre

Tabela 1 - Motilidade (%), vigor (1-5) logo após a descongelamento (inicial) e ao final do teste de termo-resistência (final) e alterações de acrossomo encontrados na comparação de diferentes molaridades de etilenoglicol (EG) e 0,72M de glicerol (GL).

Crioprotetor	Motilidade		Vigor		Alterações de cromossomo
	inicial	final	inicial	final	
EG 0,30M	5,0 ^a (±0,7)	15,0 ^a (±4,0)	3,0(±0,0)	1,7 ^a (±0,2)	52,0 ^a (±4,1)
EG 0,50M	59,0 ^b (±0,7)	33,0 ^b (±3,9)	3,2(±0,1)	2,9 ^b (±0,1)	57,0 ^a (±2,4)
EG 0,70M	54,0 ^a (±1,2)	17,0 ^a (±3,7)	3,1(±0,1)	1,8 ^a (±0,2)	69,0 ^b (±2,6)
GL 0,72M	58,0 ^b (±1,1)	26,0 ^{ab} (±4,3)	3,1(±0,1)	2,4 ^b (±0,3)	70,0 ^b (±2,6)

Os dados entre parênteses representam o erro padrão da média.

^{ab}Valores com letras designais, na mesma coluna diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

integridade de acrossomo e motilidade espermática (BARNABE *et al.* 1981).

A inseminação artificial serviu de um indicativo de que o etileno glicol (0,5M) pode proporcionar melhores resultados que o glicerol na inseminação cervical ovina, como mostra a Figura 1. No entanto, esta tecnologia ainda é um desafio, pela complexidade do assunto, onde a verdadeira causa da instabilidade dos resultados não está bem definida, ou seja, se ela tem origem na manipulação do sêmen doado pelo macho, na complexa estrutura cervical, no transporte espermático na fêmea ou associação destes fatores. O etileno glicol (0,5M) propiciou melhores resultados que o glicerol (0,72M), principalmente no que se refere a preservação do acrossomo, estrutura indispensável no momento de fecundação.

Conclui-se que o sêmen ovino pode ser congelado utilizando como crioprotetor o etileno glicol, que quando utilizado na concentração de 0,5M proporciona motilidade e vigor semelhantes a do glicerol, porém com uma melhor proteção acrossomática.

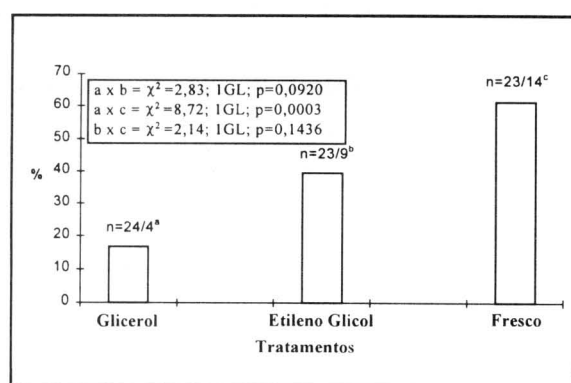


Figura 1 - Efeito de dois crioprotetores em comparação com o sêmen fresco na percentagem de prenhez de ovelhas inseminadas pela via cervical superficial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Principales of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. *Equine Vet Sci*, v. 7, p. 145-173, 1987.
- BARNABE, V.H., BARNABE, R.C., VISINTIN, J.A.; *et al.* Correlações entre motilidade progressiva e retenção do acrossomo em sêmen congelado de bovinos após o descongelamento e após provas de termoresistência. *Rev Fac Med Vet Zootec Univ de São Paulo*, v. 18, p. 61-68, 1981.
- BERNDTSON, W.E., FOOTE, R.H. Bovine sperm cell volume at various intervals after addition of glycerol at 5°C. *Cryobiology*, v. 9, p. 57-60, 1972.
- COLAS, G. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *J Reprod Fert*, v. 42, p. 277-285, 1975.
- EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. *Salamon's artificial insemination of sheep and goats*. Sydney, Butterworths, 1987. 194 p.
- HOLT, W.V.; HEAD, M.F.; NORTH, R.D. Freeze-induced membrane in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. *Biol Reprod*, v. 43, p. 1086-1094, 1992.
- JONES, R.C. Studies of the suitability of preparations of ewe and cow milk for storing ram spermatozoa at 37.5 and -79°C. *Aust J Biol Sci*, v. 22, p. 983-900, 1969.
- JOSHI, A. Factors affecting metabolic behaviour of ram spermatozoa during cryopreservation. *Indian J Anim Sci*, v. 60, p. 1336-1337, 1990.
- LIGHTFOOT, R.J., SALAMON, S. Freezing ram spermatozoa by the pellet method. I. Transport and viability of spermatozoa within the genital tract of the ewe. *J Reprod Fert*, v. 22, p. 385-398, 1970.
- MATOS, D.G., MOSES, D.F., de las HERAS, M.A., *et al.* Minimal time required in contact with glycerol for cryopreservation of ram semen. In: INTERNATIONAL CONGRESS. ON ANIMAL REPRODUCTION, 12, 1992, The Hague. *Proc... The Hague: International Congress on Animal Reproduction*, 1992, v. 3, p. 1401-1403.
- MATTNER, P.E., ENTWISTLE, K.N., MARTIN, I.C.A. Passage survival and fertility of deep frozen ram semen in the genital tract of the ewe. *Aust J Biol Sci*, v. 22, p. 181-187, 1969.
- MERCANTE, C.F.J., ARRUDA, R.P., NEVES NETO, J.R., *et al.* Congelamento de sêmen equino em etilenoglicol ou glicerol: motilidade, vigor e teste de termoresistência. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1995. *Anais... Belo Horizonte, MG: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, 1995, p. 290.
- MERYMAN, H.T. Crioprotective agents. *Cryobiology*, v. 8, p. 173-183, 1971.
- MIES FILHO, A. *Inseminação Artificial*. 6. ed., Porto Alegre: Sulina, 1987. V. 2. 750 p.
- MORAES, J.C.F. A mortalidade embrionária e a eficácia da inseminação artificial em ovinos. *Ciência Rural*, v. 22, p. 367-372, 1992.
- NEVES, J.P. *Untersuchungen zur Samenübertragung beim Schaf unter besondere Berücksichtigung der Spermatiegefrierkonservierung*. Hannover, Alemanha 107 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Escola Superior de Veterinária de Hannover, Alemanha, 1980.
- NEVES NETO, J.R., MERCANTE, C.F.J., ARRUDA, R.P., *et al.* Fertilidade do sêmen equino congelado com etilenoglicol ou glicerol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11, 1995, Belo Horizonte MG. *Anais ... Minas Gerais: Congresso Brasileiro Reprodução Animal*, 1995, p. 292.
- PARKS, J.E., GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriog*, v. 38, p. 209-222, 1992.

- PLATOV, E.M. The freezing of ram semen in a lactose-yolk ethilene glycol diluent. **An Breeding Abst**, p. 76-77, 1965.
- POLGE, C, SMITH, A.U., PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, p. 666-668, 1949.
- RODRIGUES, J. L. Aspectos da congelação de embriões bovinos. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 7, Jaboticabal, SP. **Anais...** Jaboticabal: Sociedade brasileira de transferência de embriões, 1992, p. 55-79.
- SALAMON, S. Deep freezing of ram semen: recovery of spermatozoa after pelleting and comparison with other methods of freezing. **Aust J Biol Sci**, v. 21, p. 351-360, 1968.
- SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **An Reprod Sci**, v. 37, p. 185-249, 1995a.
- SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **An Reprod Sci**, v. 38, p. 1-36, 1995b.
- SAS SAS/STAT USER'S GUIDE. 6.03 ed. Cary, NC, USA: SAS Institute INC, 1988. 1028 p.
- VALCÁRCEL, A., DE LAS HERAS, M.A., PÉREZ, *et al*. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. **Theriog**, v. 41, p. 483-489, 1994.
- VISINTIN, J.A., GARCIA, J.F., NOGUEIRA, M.F.G., *et al*. Criopreservação de embriões bovinos micromanipulados e sexados, pelo método "one-step". In: I SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA EM MEDICINA VETERINÁRIA, São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo, 1995a, p. 119.
- VISINTIN, J.A., GARCIA, J.F., NOGUEIRA, M.F.G., *et al*. Criopreservação de embriões bovinos: método "one-step". In: I SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA EM MEDICINA VETERINÁRIA, São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo, 1995b, p. 120.
- VOELKEL, S.A., HU, Y.X. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriog**, v. 31, p. 23-37, 1992a.
- VOELKEL, S.A., HU, Y.X. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen thawed embryos to recipient females. **Theriog**, v. 37, p. 687-697, 1992b.
- WATSON, P.F., MARTIN, I.C.A. Effects of egg yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrosomal structures of frozen ram spermatozoa. **Aust J Biol Sci**, v. 28, p. 153-159, 1975.
- WEITZE, K.F., PETZOLDT, R. Preservation of semen. **Reprod Sci**, v. 28, p. 229-235, 1992.