

Viabilidad de espermatozoides ovinos mantenidos a 5° y 15°C en diferentes sistemas de refrigeración*

Viability of ram sperm chilled at 5° and 15°C in different cooling systems

Murillo Mansano Moscardini,** Caroline Scott,** Diego Souza Moura,** Tarcísio Torre Lourenço,**
Viviana Helena Vallejo Aristizábal,*** Fabiana Ferreira de Souza****

Resumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar la cualidad espermática del semen refrigerado de carneros, en cajas térmicas con diferentes temperaturas. Fueron utilizados 6 eyaculados, de 2 carneros colectado con vagina artificial. En el semen se analizó volumen, movimiento en masa, motilidad, vigor, concentración espermática, test hipo-osmótico y coloración supra-vital. Las muestras fueron divididas en 2 alícuotas y diluidas en solución NaCl 0,9% o en un medio (Botubov®, Botupharma, Botucatu, SP, Brasil); después, la dilución fue mantenida a temperatura ambiente, nevera (5°C), caja Botubox® (15°C, Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), caja Botutainer® (5°C, Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) y caja MaxSemen® (15°C, EHG Agrofarma, Campinas, SP, Brasil). Todas las muestras fueron analizadas cada 24 horas, siguiendo los mismos parámetros. De acuerdo con los resultados, las muestras mantenidas en el diluyente presentaron viabilidad hasta 48 horas de refrigeración en las cajas térmicas y en la nevera, y la motilidad se mantuvo entorno de 30% hasta las 72 horas. Las muestras diluidas en solución NaCl 0,9% conservaron la motilidad en 30% hasta las 24 horas de refrigeración. Basado en los resultados se concluye que las tres cajas pueden ser utilizadas para transporte de semen ovino, diluido y refrigerado por un período de 24 a 48 horas.

Palabras clave: carnero, crio-preservación, espermatozoide.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the ovine sperm quality colled in thermal boxes. Six ejaculates from 2 rams were collected using artificial vagina. Samples were analyzed to volume, mass movement, motility, vigor, sperm cell concentration, hypo-osmotic swelling test and supravital stain. Ejaculates were divided into 2 aliquots and diluted in 0.9% NaCl or in the extender (Botubov®, Botupharma, Botucatu, SP, Brazil), and was kept at room temperature, refrigerator (5°C), Botubox® (15°C, Botupharma, Botucatu, SP, Brazil), Botutainer® (5°C, Botupharma, Botucatu, SP, Brazil) and MaxSemen® (15°C, EHG Agrofarma, Campinas, SP, Brazil). All samples were analyzed each 24 hours to the same parameters. According to the results the samples diluted and cooled in extender preserved sperm viability until 48 hours in thermal boxes and in refrigerator; and the samples extended preserved in environment maintained motility 30% up to 72 hours. Samples diluted in 0.9% saline retained motility around 30% until 24 hours of cooling. Based on the results it is concluded that the three boxes may be used for transport of ram semen, diluted and refrigerated for a period of 24 to 48 hours.

Keywords: cryopreservation, ram, spermatozoa.

Introducción

La cría de ovinos en los últimos años ha crecido y el mercado internacional de carne ovina se mantiene en alta, debido al menor costo de producción. Este crecimiento ha impulsado y estimulado la aplicación de biotécnicas de reproducción en la especie (Oliveira y Oliveira, 2008) con el objetivo de aumentar la productividad y rentabilidad del rebaño.

Dentro de las biotecnologías se debe resaltar la importancia de la refrigeración de semen (Simplicio et al., 2007). Las células espermáticas de los ovinos pueden ser conservadas por largos períodos a temperatura ambiente, no obstante la conservación entre 10 a 15°C o 0 a 5°C, con disminución gradual de la

temperatura es más apropiado para conservar la integridad celular (Bicudo et al., 2003).

La conservación del semen reduce o para el metabolismo del espermatozoide sin prejuicios para la fertilidad (Maxwell y Salamon, 1993; Watson, 1995). Con todo, la congelación y descongelación del semen de carneros causa injurias a las células y reduce la fertilidad. El tiempo máximo de refrigeración sin alteración en la fertilidad ha sido relatado entre 6 y 12 horas (Kasimanickam et al., 2007).

La refrigeración es una alternativa a él semen congelado, cuando la inseminación es hecha dentro de un corto espacio de tiempo después de la colecta. Salamon et al. (1979) y Salamon

*Recebido em 14 de janeiro de 2014 e aceito em 29 de junho de 2014.

**Medicina Veterinária, Universidad de Franca, UNIFRAN, Av. Dr. Armando Salles de Oliveira, 201, Parque Universitário, Franca, SP, Brasil, CEP 14404-600.

***Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, UNESP, Distrito de Rubião Júnior, s/n°, Botucatu, SP, Brasil, CEP 18618-970. E-mail: vallaristy@gmail.com.

****Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, UNESP, Distrito de Rubião Júnior, s/n°, Botucatu, SP, Brasil, CEP 18618-970. Autor responsable de la correspondencia, E-mail: fafesouza@fmvz.unesp.br. Número telefónico: +55 14 3880-2237, FAX: +55 14 3880-2119.

y Maxwell (2000) reportaron una buena cualidad de semen de carneros, mantenidos a 5°C por 6 días, sin embargo la tasa de fertilización después del día 6 y 8 cayó drásticamente.

Estudios describen alteraciones en la integridad acrosomal (Tasserón et al., 1977; Hollinshead et al., 2004), capacitación espermática (Paulenz et al., 2002) y motilidad (Maxwell y Stojanov, 1996; Upreti et al., 1997; Gündogan, 2003) durante la refrigeración por períodos variables. A pesar de eso, la refrigeración posee ventajas sobre la congelación por tener una alta cualidad seminal y un menor precio, viabilizando la técnica para períodos de almacenamiento cortos (England y Ponzio, 1996).

Independiente del diluyente, tasa de dilución, temperatura o condiciones de refrigeración, cuanto mayor el tiempo de refrigeración, mayor tasa de deterioro de la célula, la cual es acompañada por un declino en el transporte y sobrevivencia del espermatozoide en el tracto reproductivo femenino y, consecuentemente, reducción de la fertilidad (Salamon y Maxwell, 2000).

Con la utilización de cajas isotérmicas es posible el envío de muestras de semen para regiones más distantes evitando pérdida del material (Mota-Filho et al., 2007). Los sistemas de transporte térmicos para semen son considerados equipamientos buenos utilizados en la biotecnología, con fácil acceso, por ser producidos en Brasil (Farrás et al., 2008).

Por se tratar de un método simple de conservación de células espermáticas y tener pocos estudios en la especie, el objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de la temperatura sobre la viabilidad del semen ovino mantenido a 5°C, 15°C y temperatura ambiente, utilizando diferentes cajas térmicas de transporte.

Materiales y métodos

El estudio fue realizado con consentimiento y vigilancia del comité de ética en el uso de animales (CEUA) de la Universidad, bajo el protocolo n° 014/07 A.

Fueron utilizados dos carneros adultos, de la raza Santa Inês, provenientes de la hacienda experimental. Antes del inicio del experimento, los carneros fueron evaluados clínicamente y entrenados para colecta de semen con vagina artificial. El experimento fue realizado en los meses de mayo y junio.

El semen fue colectado de carneros previamente entrenados con vagina artificial en la presencia de una hembra vacía. Los animales fueron sometidos a tres colectas de semen con intervalo de una semana entre cada una, para un total de seis eyaculados. El semen fue recogido en tubos de recolección graduados calentados y protegidos de la luz.

Inmediatamente terminada la colecta fueron analizadas las características macro y microscópicas del semen en un plazo máximo de 15 minutos.

El volumen fue determinado por medio del tubo graduado utilizado al momento de la colecta (mL).

El movimiento en masa de los espermatozoides fue evaluado por visualización en microscopio con contrafase, con aumento de 40x, colocando una gota de semen sobre un porta objetos. El movimiento fue clasificado entre 1 y 5. La motilidad espermática fue determinada con una gota de semen diluida en solución

salina 0,9%. Colocada sobre una lámina térmica y recubierta por cubre objeto. El examen fue realizado por la observación de movimiento de las células espermáticas, utilizando un microscopio con contraste de fase, en un aumento de 100X. La motilidad fue representada por el porcentaje de 0 a 100 de espermatozoides con movimiento.

El vigor espermático fue representado por un score de 0 a 5, donde 0 son los espermatozoides sin movimiento y 5 los que presentan movimientos rápidos y vigorosos. La concentración espermática fue determinada en cámara hematimetría de Neubauer, después de la dilución del semen en formol-salino tamponado, pH 7,2. Los espermatozoides fueron contabilizados por microscopio con contraste de fase, en un aumento de 400X y el número de células fue expresado en millones (CBRA, 2013).

El test hipo osmótico fue realizado según la técnica descrita por Jeyendran y col (1984) que consistió en mezclar 5 µL de semen con 500 µL de la solución hipo osmótico. Las muestras fueron agitadas por movimientos de transposición lentos y suaves, y una gota del material fue colocada en una porta objeto y cubierta por un cubre objeto, la lectura fue realizada por microscopio de contraste de fase. Fueron contadas 200 células espermáticas, en varios campos de la lámina, escogidos aleatoriamente. Los espermatozoides fueron considerados con integridad estructural y funcional de la membrana cuando observado edema, evidenciando por el enroscamiento de la cola. El resultado fue dado en porcentaje obtenido de la cantidad de espermatozoides con cola enroscada.

La coloración supra vital para evaluar integridad de membrana fue efectuada con una gota de eosina (eosina amarilla 3% en solución NaCl 0,9%, (Hafez, 1995) depositada sobre un porta objeto al lado de una gota de semen. Las gotas fueron homogenizadas y se realizó un frotis. La lectura fue realizada en microscopio óptico, con aumento de 400X. Las células teñidas en rojo fueron consideradas con membrana lesionada (muertas) y las que no se tiñeron fueron consideradas íntegras. El resultado fue dado en porcentaje.

Después del análisis, las muestras fueron diluidas en alícuotas de 500µL cada una. Fue adicionado 2 ml de medio diluyente Botubov® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) o 2 ml de solución NaCl al 0,9 %. Estas muestras diluidas fueron nuevamente divididas en cinco tubos plásticos con tapa y mantenidas a temperatura ambiente, nevera (5°C) y en las cajas térmicas Max-Semen®-Express (EHG Agrofarma, Campinas, SP, Brasil, 15°C), Botutainer® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil, 5°C) y Botubox® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil, 15°C). En cada caja fue colocado un volumen de 150 ml de agua, en un tubo plástico, para que el pequeño volumen del semen no sufriera prejuicios debido al rápido enfriamiento, manteniéndose la curva de refrigeración propuesta por el fabricante.

Las muestras fueron analizadas después de la dilución (antes de refrigerarlas) cada 24 horas, hasta que la motilidad espermática fuera <10%. Las cajas fueron abiertas rápidamente y 100µl de cada muestra fueron retiradas para evaluación, sin que los tubos fuesen removidos, en los periodos de 24, 48, 72 y 96 horas. Previo a la evaluación, las alícuotas permanecieron a temperatura ambiente por 15 minutos.

Los resultados obtenidos fueron descritos por medias aritméticas y desviaciones estándares, y analizados por análisis de varianza

ANOVA y las comparaciones múltiples entre los grupos por el método de Student-Newman-Keuls, en el cual se consideró diferencia significativa cuando $P < 0,05$. Los análisis fueron realizados en el programa SigmaPlot para Windows versión 11.0.

Resultados e discusión

Los parámetros de semen fresco, en todas las colectas realizadas, se encontraron dentro de los valores normales establecidos para la especie (Aisen, 2008). La media y el desvío padrón del análisis del semen fresco fueron $1,3 \pm 0,4$ mL volumen, $3,2 \pm 0,4$ movimiento de masa, $88,3 \pm 5,2$ % de motilidad, $4,0 \pm 0,0$ vigor, $88,0 \pm 7,6$ % test hipo osmótico y $86,0 \pm 4,5$ % de espermatozoides con membrana íntegra (eosina).

Según Milczewski et al. (2000) la reducción, el aumento de la temperatura y la manipulación del semen promueven una disminución en la motilidad y danos ultra-estructurales, bioquímicos y funcionales en los espermatozoides. Tal afirmación fue confirmada en este estudio, lo cual verifico que el proceso de refrigeración provocó una disminución significativa, en la cualidad espermática de acuerdo con el tiempo de refrigeración, tanto en el semen diluido en el medio, cuanto en el diluido en solución NaCl 0,9%; y en cualquier situación el semen fresco presentó cualidad superior al refrigerado. Sin embargo, la refrigeración en medio diluyente fue siempre superior a la refrigeración en solución NaCl 0,9 %.

Con respecto al análisis del semen refrigerado en medio diluyente hubo una caída significativa ($P < 0,05$) de la cualidad del semen con el tiempo en todos los tratamientos (Figura 1). Según Maxwell y Salamon (1993) la fertilidad disminuye rápidamente, después de la inseminación cervical, cuando el semen es refrigerado por más de 24 horas. El decrecimiento de la fertilidad presenta una tasa de 10% a 35% por día de refrigeración. En

cuanto 68% a 75% de las ovejas parieron después de una única inseminación con semen fresco, la tasa de parto para el semen refrigerado 24, 48 e 72 h fue de 45% a 50%, 25% a 30%, 15% a 20%, respectivamente. Estos resultados están de acuerdo con los encontrados en este estudio, habiendo sido observada una caída de aproximadamente el 20% a cada día de refrigeración, cuando el semen fue diluido en medio diluyente, especialmente en las primeras 48 horas. Conforme con los estudios realizados de Menchata et al. (2005) donde encontraron una reducción en la tasa de concepción del semen refrigerado a 5°C durante 24 horas, cuando comparados en fresco. Resultados más recientes reportan una disminución en las tasas de fertilidad de 5,3 % de semen refrigerado por 26 horas cuando comparadas con semen fresco, concluyendo que el éxito en el uso de semen refrigerado depende de múltiples factores, como temperatura de almacenamiento (5°) y composición del diluyente (Gimenez-Diaz et al., 2011). El presente estudio no evaluó la tasa de fertilización, no obstante, el medio diluyente utilizado es comprobadamente eficaz para la manutención de las células espermáticas del carnero (Monreal et al., 2012).

Las células mantenidas a temperatura ambiente fueron evaluadas por hasta 48 horas, ya que posteriormente a este período ninguna célula viable fue encontrada. Las medidas de los parámetros evaluados fueron menores ($P < 0,05$) en las muestras conservadas en solución NaCl 0,9 % a temperatura ambiente, cuando comparadas con las de medio diluyente, durante las 48 horas de refrigeración, aunque a las 24 horas los parámetros no difirieron. La motilidad espermática de las células diluidas en medio diluyente no tuvo diferencia entre las cajas térmicas evaluadas en los períodos propuestos. Según Salamon et al. (1979) observaron una tasa de preñez de 62 a 75%, cuando el semen fue mantenido a 5°C, por 5 días. Aunque no allá sido evaluada la tasa de preñez en el presente estudio, basados en los resultados, las cajas de transporte aquí estudiadas mantuvieron el semen ovino con alta motilidad, durante 48 horas, disminuyendo los niveles inaceptables después de 72 horas de refrigeración.

Según Azevedo et al. (2005) la refrigeración del semen torna la célula espermática vulnerable, pues la línea de temperatura entre 15 a 5°C induce daños irreversibles a la motilidad y a la capacidad fertilizante. Martínez-Rodríguez et al. (2012) afirman que el semen mantenido a 15°C preserva su capacidad fertilizante hasta por 12 horas, sin embargo su motilidad puede permanecer estable por hasta 48 horas. Contrariando tales afirmaciones Verstegen et al. (2005), en especies distintas, comprobaron que el cambio de medio puede elevar la motilidad espermática, del semen refrigerado por largos períodos. En el estudio aquí presentado, las cajas térmicas utilizadas son capaces de mantener la temperatura por máximo 48 horas, debido a la duración del hielo reciclable, lo que puede haber contribuido a la caída elevada de la motilidad después de este período. Con todo, aún permanece incierto si el cambio del medio y de los hielos auxiliaría en la manutención de la motilidad. Inesperadamente, las muestras mantenidas en la nevera, a una temperatura

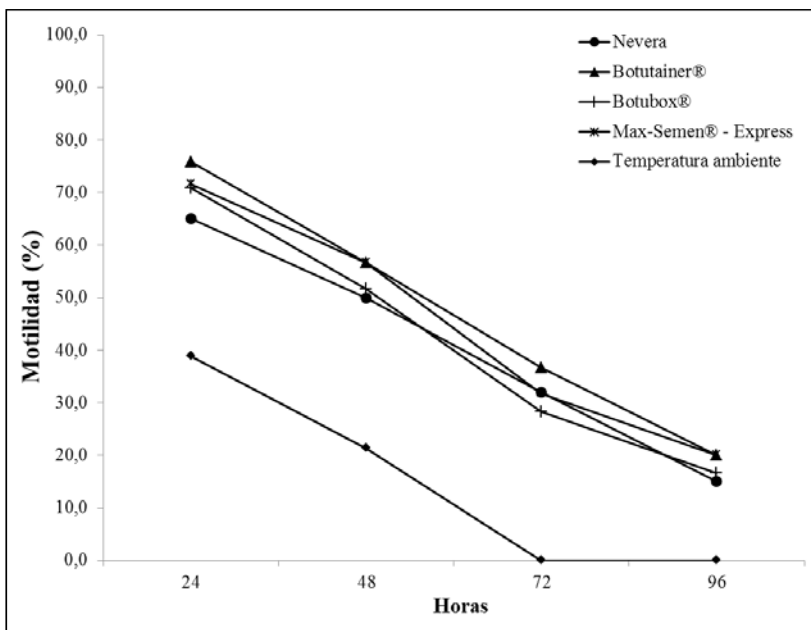


Figura 1: Motilidad de las células espermáticas diluidas en medio diluyente (Botubov®, Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) mantenidas en temperatura ambiente o en cajas térmicas Botutainer® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), Botubox® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) o Max-Semen® - Express (EHG Agrofarma, Campinas, SP, Brasil).

constante presentaron el mismo comportamiento de las muestras mantenidas en las cajas térmicas, lo que justifica la afirmación de Verstegen et al. (2005) que el medio se torna impropio para mantener las células espermáticas por largos períodos de refrigeración, principalmente por el acúmulo de metabolitos, disminución del pH y acúmulo de radicales libres de oxígeno (ROS) (Salamon y Maxwell, 2000).

La refrigeración perjudica parámetros esenciales de los espermatozoides como índice de fragmentación de DNA, potencial de membrana mitocondrial e integridad de la membrana plasmática (Watson, 1995). Gil et al. (2011) describieron una disminución en la motilidad e integridad de membrana de espermatozoides mantenidos en medio diluyente a 5°C después de 48 horas de refrigeración, diferente de lo encontrado en este estudio, donde la integridad de la membrana (hipo-osmótico y de coloración con eosina) fue evaluada. Sin embargo no se alteró hasta las 72 horas (en torno de 75%), cayendo bruscamente a las 96 horas de refrigeración en las muestras mantenidas en medio diluyente, exceptuando las muestras mantenidas a temperatura ambiente que a las 72 horas no presentaron viabilidad y por tanto no fueron evaluadas para este parámetro durante este momento. También, el medio diluyente fue capaz de mantener las membranas íntegras, demostrado por la baja integridad de la membrana, cuando el semen fue refrigerado en solución NaCl 0,9% o mantenido a temperatura ambiente. Probablemente, los componentes del medio diluyente protegerán las células espermáticas durante las 72 horas iniciales de refrigeración, aunque la elevación de la temperatura puede haber contribuido para la disminución del porcentaje de membrana íntegra, posterior a este período.

Paulenz et al. (2002) estudiaron el efecto de diferentes diluyentes (leche, citrato de sodio e TRIS, todos conteniendo gema de huevo) y temperaturas de refrigeración (4° e 20°C) sobre la viabilidad del semen de carneros. Todos los parámetros evaluados fueron influenciados por el tiempo de refrigeración y diluyente, en cuanto la motilidad espermática fue también influenciada por la interacción entre los diluyentes y la temperatura. La resistencia osmótica y la integridad de la membrana disminuyeron después de 6 horas y la motilidad espermática, integridad del acrosoma y capacitación disminuyeron gradualmente de 0 a 30 horas de almacenamiento a 5°C. A 5°C la viabilidad fue mejor, cuando comparada a 20°C, durante 30 horas. En este trabajo los dos medios testados Botubov® y la solución NaCl 0,9%, se mostraron diferentes, y en el primero la viabilidad del semen fue más duradera. Los medios contienen diferentes sustancias que contribuyen para la manutención de la viabilidad. De acuerdo con O'Harra (2010) el efecto del diluyente sobre la motilidad y viabilidad es significativo cuando la temperatura de refrigeración es igual o superior a 15°C. Sin embargo la solución NaCl 0,9% no posee ninguna fuente de energía o sistema tampón (Watson, 1995), no siendo un medio ideal para la manutención de las

células espermáticas, que fueron utilizadas en este estudio, solo como medio de control.

Las células espermáticas refrigeradas en solución NaCl 0,9% no fueron evaluadas estadísticamente debido al reducido número de muestras viables. Con todo, se notó que las cajas Botutainer® e Max-Semen®-Express consiguieron mantener la viabilidad de un número mayor de muestras por mayor período de tiempo, aun cuando las muestras fueron diluidas en la solución NaCl 0,9%, siendo que en la segunda, a las 24 horas, la motilidad espermática media fue de 39%.

La refrigeración prolongada puede ser un paso inicial para la congelación, cuando hay dificultad de congelar el semen luego después de la colecta. Para esta propuesta, Hermansson y Linde-Forsberg (2006) congelaron el semen de canes después de uno o dos días de refrigeración a 4°C. Ninguna diferencia fue verificada en la motilidad, integridad de la membrana espermática y acrosomal, cuando comparado con el congelado luego después de la colecta. A pesar de ser especies diferentes, la motilidad observada (en torno de 70%) a las 24 horas de refrigeración posibilitaría la congelación del semen, sin necesidad de transportar el animal o cualquier equipamiento a la propiedad rural, apenas la caja de transporte.

Según los trabajos de Maxwell y Salamon (1993) y Yaniz et al. (2005) el semen refrigerado puede ser preservado a una temperatura entre 4° y 15° C. A pesar de esto, cuando mayor el tiempo de refrigeración, mayor la tasa de deterioración espermática, caída de la viabilidad espermática y disminución de la integridad de las membranas plasmáticas, interfiriendo en la capacidad fecundante (Milczewski et al., 2000). Estas afirmaciones fueron confirmadas en este estudio, siendo que el tiempo de refrigeración ideal para el semen ovino fue de 48 horas.

Las bajas temperaturas disminuyen las tasas metabólicas del espermatozoide y prolongan su longevidad (Watson, 1995). A pesar del corto periodo de almacenamiento de la técnica de refrigeración, la ventaja es que la cualidad del semen refrigerado es superior al congelado (Rabassa et al., 2007), siendo una técnica viable para cortos períodos de almacenamiento. Cuando se comparan las cajas de transporte para el semen congelado (botellón de nitrógeno líquido) y refrigerado (caja térmica), se puede afirmar que las cajas térmicas son más leves y por este motivo, el transporte tiene un costo menor, lo que puede ser otra ventaja del semen refrigerado.

Conclusiones

En las condiciones del estudio, se concluye que el semen de ovinos puede ser conservado en las cajas térmicas BotuBox®, Botutainer® y Max-Semen Express®, a 5°C y 15°C, por 48 horas sin prejuicios extensos a la motilidad o integridad de la membrana plasmática. Pero, después de este período, la motilidad es afectada.

Referencias

- AISEN, E.G. *Reprodução ovina e caprina*. Curitiba: MedVet, 2008, 220 p.
- AZEVEDO, H.C.; MAIA, M.S.; BICUDO, S.D.; SOUSA, D.B.; RODELLO, L.; SICHERLE, C.C. Cinética e integridade dos espermatozoides no sêmen ovino submetido a diferentes ritmos de refrigeração e congelamento em sistemas automatizados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 26. 2005. *Anais...* Goiânia: Centro de Convenções, CBRA, 2005. p.1.
- BICUDO, S.D.; SOUSA, D.B.; TAKADA, L. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 27, p. 120-127, 2003.
- ENGLAND, G.C.W.; PONZIO, P. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology*, v. 46, p. 165-171, 1996.
- FARRÁS, M.C.; AVANZI, B.R.; MELO, C.M.; DELL'AQUA, J.A.; PAPA, F.O. Efeito de diferentes diluentes na manutenção das características do sêmen equino em dois sistemas de refrigeração passiva. *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, p. 693-699, 2008.
- GIL, J.; FIERRO, S.; BENTANCUR, O.; OLIVERA-MUZANTE, J. Chilled storage of ram semen improves with the addition of egg yolk and glycerol to milk-based extenders. *Reproduction Domestic Animals*, v. 46, p. 503-507, 2011.
- GIMENEZ-DIAZ, C.; EMSSEN, E.; OCAK, S.; ASLAN, F. Laparoscopic artificial insemination in dairy sheep with chilled semen stored for up to 26 h. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, n. 30, p. 5812-5814, 2011.
- GÜNDÖGAN, M. Effect of diluents on motility of ram sperm during storage at 5°C. *Archives of Andrology*, v. 49, p. 69-75, 2003.
- HAFEZ, E.S.E. *Reprodução animal*. 6. ed. São Paulo: Manole, 1995, 582 p.
- HERMANSSON, U.; LINDE-FORSBERG, C. Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology*, v. 65, p. 584-593, 2006.
- HOLLINSHEAD, F.K.; O'BRIEN, J.K.; GILLIAN, L.; MEYERS, M.; MAXWELL, W.M.; EVANS, G. Liquid storage of flow cytometrically sorted ram spermatozoa. *Theriogenology*, v. 62, p. 587-605, 2004.
- JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 70, p. 219-228, 1984.
- KASIMANICKAM, R.; KASIMANICKAM, V.; PELZER, K.D.; DESCANIO, J.J. Effect of breed and sperm concentration on the changes in structural, functional and motility parameters of ram-lamb spermatozoa during storage at 4°C. *Animal Reproduction Science*, v. 101, p. 60-73, 2007.
- MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, C.; ALVAREZ, M.; ORDÁS, L.; CHAMORRO, C.A.; MARTINEZ-PASTOR, F.; ANEL, L.; de PAZ, P. Evaluation of ram semen quality using polyacrylamide gel instead of cervical mucus in the sperm penetration test. *Theriogenology*, v. 77, p. 1575-1586, 2012.
- MAXWELL, W.M.C.; SALAMON, S. Liquid storage of ram semen: a review. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 5, p. 613-638, 1993.
- MAXWELL, W.M.C.; STOJANOV, T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 8, p. 1013-1020, 1996.
- O'HARA, L.; HANRAHAN, J.P.; RICHARDSON, L.; DONOVAN, A.; FAIR, S.; EVANS, A.C.O.; LONERGAN, P. Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology*, v. 73, p. 541-549, 2010.
- MILCZEWSKI, V.; KOZICKI, L.E.; NEVES, J.P. Inseminação artificial intrauterina e cervical em ovelhas utilizando sêmen refrigerado. *Archives of Veterinary Science*, v. 5, p. 35-39, 2000.
- MONREAL, A.C.D.; SCHMID, R.F.; PAULA, J.G.S.; URT, M.A.G.; SOUZA, A.S. Extenders for native ram semen in Mato Grosso do Sul. *Revista Agrarian*, v. 5, n. 17, p. 281-287, 2012.
- MOTA-FILHO, A.C.; CASTELO, T.S.; COSTA, L.L.M.; LIMA, G.L.; SILVA, A.R. Conservação do sêmen canino sob refrigeração em diferentes caixas isotérmicas. *Acta Veterinaria Brasílica*, v. 1, p. 78-83, 2007.
- OLIVEIRA, R.P.M.; OLIVEIRA, F.F. Manipulação do ciclo estral em ovinos. *Pubvet*, v. 2, p. 1-29, 2008.
- PAULENZ, H.; SÖDERQUIST, L.; PÉREZ-PÉ, R.; BERG, K.A. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*, v. 57, p. 823-836, 2002.
- RABASSA, V.R.; TABELÃO, V.C.; PFEIFER, L.F.M.; SCHNEIDER, A.; ZIGUER, E.A.; SCHOSSLER, E.; SEVERO, N.C.; DEL PINO, F.A.B.; CORRÊA, M.N. Efeitos das técnicas transcervical e laparoscópica sobre a taxa de prenhez de ovelhas inseminadas em tempo fixo. *Ciência Animal Brasileira*, v. 8, p.127-133. 2007.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p. 77-111, 2000.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C.; FIRTH, J.H. Fertility of ram semen after storage at 5°C. *Animal Reproduction Science*, v. 2, p. 373-385, 1979.
- SIMPLÍCIO, A.A.; FREITAS, V.J.F.; FONSECA, J.F. Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, p. 234-246, 2007.
- TASSERON, F.; AMIR, D.; SCHINDLER, H. Acrosome damage of rams spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 51, p. 461-462, 1977.
- UPRETI, G.C.; JENSEN, K.; OLIVER, J.E.; DUGANZICH, D.M.; MUNDAY, R.; SMITH, J.F. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Animal Reproduction Science*, v. 48, p. 269-278, 1997.
- VERSTEGEN, J.P.; ONCLIN, K.; IGUER-OUADA, M. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: in vitro and in vivo studies. *Theriogenology*, v. 64, p. 720-733, 2005.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in cryopreservation of sperm and assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 7, p. 871-892, 1995.
- YANIZ, J.; MARTI, J.I.; SILVESTRE, M.A.; FOLCH, J.; SANTOLARIA, P.; ALABART, J.L.; LÓPEZ-GATIUS, F. Effect of solid storage of sheep spermatozoa at 15°C on their survival and penetrating capacity. *Theriogenology*, v. 64, p.1844-1851, 2005.