
DIFERENÇAS DA CÉLULA ESPERMÁTICA SUÍNA E CRIOPROTETORES: REVISÃO

DI DOMENICO, Dalvane¹

PEDROSO, Eliza Montenegro de Souza Resende

TEIXEIRA, Pedro Paulo Maia¹

Recebido em: 2014.07.14

Aprovado em: 2015.03.26

ISSUE DOI: 10.3738/1982.2278.1169

RESUMO: Na espécie suína o emprego de sêmen congelado leva a índices reprodutivos insatisfatórios, quando comparados aos obtidos com sêmen refrigerado em inseminação artificial, pois o processo de criopreservação produz danos celulares conhecidos como crioinjúrias, que afetam a qualidade estrutural e funcional dos espermatozoides. As lesões ocasionadas têm sido atribuídas à mudança de temperatura, toxicidade de crioprotetores e estresse osmótico. Além das alterações da membrana plasmática que levam à maior sensibilidade da célula ao processo de criopreservação, ainda possui uma baixa defesa antioxidante citoplasmática e no plasma seminal favorecendo a danos oxidativos *in vivo*. Para as células sobreviverem ao processo de criopreservação é necessário a presença de agentes crioprotetores durante o resfriamento, congelamento e descongelamento. Os agentes crioprotetores são divididos entre externos ou não penetrantes e internos ou penetrantes.

Palavras-chave: Inseminação artificial. Criopreservação. Crioprotetores.

DIFFERENCES OF SWINE SPERM CELL AND CRYOPROTECTANTS: REVIEW

SUMMARY: In swine the use of frozen semen leads to poor reproductive rates compared to those obtained with cooled semen in artificial insemination because the cryopreservation process produces cellular damage known as cryoinjuries, affecting the structural and functional quality of sperm. The injuries caused have been attributed to temperature change, cryoprotectants toxicity and osmotic stress. Besides the changes of the plasma membrane leading to increased sensitivity of the cell to the cryopreservation process, still has a low antioxidant defense cytoplasmic and seminal plasma favoring oxidative damage *in vivo*. For cells survive the cryopreservation process cryoprotectors agents during cooling, freezing and thawing is necessary. The cryoprotective agent are divided between external or internal or non-penetrating and penetrating.

Keywords: Artificial insemination. Cryopreservation. Cryoprotectors.

INTRODUÇÃO

A suinocultura brasileira, a exemplo de outras cadeias produtivas do agronegócio, cresceu significativamente nos últimos anos. Esse crescimento deve-se principalmente ao melhoramento nutricional e genético dos animais. A base do melhoramento genético em suínos está relacionada à inseminação artificial, porém nesta espécie essa biotecnologia é apenas viável com sêmen refrigerado (MAPA, 2014). No qual possui algumas desvantagens em relação ao sêmen congelado, como o curto período de utilização do sêmen, a inviabilização da criação de bancos de sêmen e do comércio internacional de doses (ALONSO, 2009).

A conservação do sêmen suíno através do congelamento, sem alteração dos resultados de fertilidade, é um dos objetivos da pesquisa na área da reprodução (FERNÁNDEZ-SANTOS *et*

¹ Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná (UNICENTRO/CEDETEG) – Guarapuava (PR), Brasil.

al., 2006). A criopreservação de sêmen é uma biotécnica reprodutiva consolidada e difundida desde 1975 (GROSSFELD *et al.*; 2008), trata-se de uma tecnologia em que células, tecidos ou embriões são preservados a temperaturas abaixo do ponto de congelamento da água para reduzir o metabolismo celular, tendo como objetivo preservar a composição e viabilidade celular por tempo indefinido (PEGG, 2002). Porém, a espécie suína possui característica de membrana de espermatozoide que lhe proporciona notória sensibilidade ao processo de criopreservação (JOHNSON *et al.*, 1969).

Esse panorama faz com que a criopreservação não tenha aplicabilidade comercial (ERIKSSON *et al.*, 2002). Deste modo, o emprego de sêmen congelado ainda está restrito ao melhoramento genético, intercâmbio de material genético entre os países, repovoamento de granjas, formação de bancos genéticos e pesquisas científicas (REED, 1985; SCHEID *et al.*, 1990).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica sobre o avanço tecnológico na criopreservação de sêmen suíno, demonstrando de maneira sucinta e objetiva a utilização de crioprotetores como recurso para otimizar o congelamento do sêmen, com o intuito de melhorar sua aplicabilidade comercial.

CARACTERÍSTICAS DA CÉLULA ESPERMÁTICA SUÍNA

O processo de criopreservação causa inúmeros danos à célula espermática suína, reduzindo a proporção de espermatozoides viáveis, bem como sua capacidade funcional (WATSON, 2000; MEDEIROS, 2002). As lesões ocasionadas têm sido atribuídas à mudança de temperatura - resultando na formação de cristais de gelo intracelulares e extracelulares, danos oxidativos, alterações de membrana e DNA - além da toxicidade de crioprotetores e estresse osmótico (WATSON, 2000). Contudo cada espécie possui um potencial de crioproteção distinto, devido às características intrínsecas de suas células (LADHA, 1998; WATSON, 2000; PURDY, 2006).

Um dos fatores diferenciais que aumenta a sensibilidade do sêmen está relacionado à membrana plasmática, essa possui alto teor de ácidos graxos poli-insaturados, menor porcentagem de moléculas de colesterol distribuídas de forma assimétrica, com maior disposição na monocamada interna levando a uma redução da motilidade e danos funcionais de membrana e acrossoma. Além disso, existe uma baixa defesa antioxidante citoplasmática e no plasma seminal favorecendo a danos oxidativos *in vivo*. (SARAVIA *et al.*; 2005; BREZEZINSKA-SLEBODZINSKA *et al.*, 1995; JOHNSON *et al.*, 2000).

Os ácidos graxos poli-insaturados nos fosfolipídios presentes na membrana plasmática possuem poucas ligações duplas do tipo *cis* (CEROLINI *et al.*; 2000), tornando esta célula susceptível à peroxidação lipídica, devido ao estresse oxidativo produzidos pelas espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas moléculas obtêm elétrons a partir de ácidos nucleicos, lipídeos, proteínas, carboidratos ou qualquer outra molécula próxima (AQAEWAL *et al.*, 2005). A geração de EROs é um pré-requisito essencial para a função normal das células, no entanto, a formação excessiva pode conduzir a dano celular e patologia (HALLWELL; ARUOMA, 1991). O aumento na produção resulta em inúmeros danos na membrana, inibição de respiração espermática, lesões ao DNA espermático e mitocondrial além da perda de enzimas intracelulares, interferindo na capacidade fecundante do espermatozoide (VALENÇA; GUERRA, 2007). A mitocôndria quando danificada é a principal fonte de EROs, pois provoca a liberação de proteínas pré-apoptóticas como a citocromo C, que desencadeia a capacitação e morte celular (MISHRA e SHANA, 2005). Este fato ainda é agravado pela característica de baixa capacidade antioxidante do citoplasma e plasma seminal (BREZEZINSKA-SLEBODZINSKA *et al.*, 1995).

A toxicidade dos crioprotetores está relacionada principalmente com as injúrias físicas como a osmolaridade, além de efeitos farmacológicos e bioquímicos (SANTOS, 2003). A proporção de células que sobrevivem ao protocolo de criopreservação, é determinada pela sensibilidade ao estresse osmótico durante a adição e remoção de crioprotetores, e durante o resfriamento e reaquecimento. O estresse osmótico é causado pelos elevados gradientes de concentração de solutos no meio diluidor e a formação e dissolução de cristais de gelo no meio extracelular (WATSON, 2000).

Com o emprego de sêmen congelado, os índices reprodutivos são insatisfatórios quando comparados aos obtidos com sêmen resfriado em inseminação artificial (JOHNSON *et al.*, 2000; ROCA *et al.*, 2003), devido à perda da capacidade fertilizante e da não sobrevivência de 40-50% dos espermatozoides durante o processo de criopreservação (WATSON *et al.*, 2000). Esse fato resulta em uma diminuição de 20 a 30% na taxa de parto e de 2 a 3 leitões por leitegada (ROMERO *et al.*, 2004).

CRIOPRESERVAÇÃO

A palavra “criobiologia” tem origem do termo grego “kruos”, frio, e quer dizer “estudo da vida a temperaturas extremamente baixas”. A técnica de criopreservação é uma maneira de solucionar problemas relacionados com o armazenamento de espermatozoides, ovócitos, embriões e tecidos, a qual visa diminuir o metabolismo celular isto é, as células são mantidas em estado de quiescência, sendo assim possível a sua conservação por tempo indeterminado. Por

volta de 1776, Lazzaro Spallanzani descreveu os efeitos da criopreservação no sêmen humano. Em 1866 Mantegazza observou a motilidade dos espermatozoides após a congelação e no século XX grupos de pesquisadores testaram diferentes meios de congelação como o álcool resfriado por gelo seco (-79 °C), nitrogênio líquido (-196 °C) e hélio (-296 °C) (CANTANHÊDE, 2013).

As inseminações artificiais conduzidas com o sêmen descongelado apresentam baixos níveis de concepção e leitegadas reduzidas em relação às inseminações realizadas com sêmen fresco ou refrigerado (JOHNSON *et al.*, 2000). A criopreservação do sêmen está sendo cada vez mais utilizada e tem como principal objetivo manter a integridade estrutural e a viabilidade celular após submeter essas células a baixas temperaturas por tempo indeterminado. Esse processo produz danos celulares conhecidos como crioinjúrias, que afetam a qualidade estrutural e funcional dos espermatozoides (OETTLE *et al.*, 1992).

O processo de congelamento de sêmen suíno é um método demorado e complexo, sendo em média necessárias de 7 a 9 horas, desde a coleta até o final da congelação (BORTOLOZZO *et al.*, 2005).

As amostras são submetidas a várias etapas e curvas de resfriamento objetivando a manutenção da viabilidade espermática pós-descongelação (BORTOLOZZO *et al.*, 2005). São variados os protocolos utilizados para criopreservação de sêmen suíno, variando desde o crioprotetor utilizado, velocidade no abaixamento de temperatura, tipos de embalagens utilizadas para conservação e métodos de descongelação (CANTANHÊDE, 2013).

CRIOPROTETORES

As pesquisas sobre criopreservação de sêmen desenvolvidas nos últimos 30 anos resultaram em avanços originados de estudos sobre a avaliação de diferentes crioprotetores, embalagens de congelamento, diluentes e curvas de congelamento e descongelamento (ANTUNES, 2007).

Para as células sobreviverem ao processo de criopreservação é necessário a presença de agentes crioprotetores (AC) durante o resfriamento, congelamento e descongelamento (CANDEIAS, 2010). Os agentes crioprotetores são definidos como a classe de componentes que especificamente atuam na manutenção da viabilidade das células animais ao congelamento e descongelamento (GILMORE *et. al.*, 1997). Os agentes crioprotetores são divididos entre externos ou não penetrantes – sendo exemplos desses a gema de ovo (JASKO, 1994) – e internos ou penetrantes, como o glicerol (SANTOS *et al.*, 2008).

As características ideais de um crioprotetor são de conferir proteção aos espermatozoides contra danos térmicos e ter baixo potencial de toxicidade, essa característica é dependente do

número de pares de cadeia simples de elétrons que ele contém, a simetria esférica destas cadeias e sua solubilidade na água (NASH, 1966). São as ligações que ocorrem entre as moléculas de hidrogênio com as moléculas de água que mudam a orientação destas nos cristais de gelo e criam um ambiente menos nocivo para as células espermáticas. Portanto, esta propriedade modifica as características durante o processo de congelamento limitando a formação de cristais de gelo, retardando os cristais e reduzindo as concentrações de soluto entre o meio extracelular, com o meio intracelular (DALIMATA; GRAHAM, 1997).

Uma segunda função dos crioprotetores é a interação com a membrana celular, exercendo ação estabilizadora durante as mudanças de um estado relativamente líquido para um estado sólido e, talvez até mais importante, na volta para o estado líquido durante a descongelação (CANTANHÊDE, 2013).

Os crioprotetores internos combinados aos externos promovem uma proteção mais completa ao espermatozoide, atuando ao nível da membrana celular (LEUNG e JAMIESON, 1991).

CRIOPROTETORES EXTRACELULARES OU NÃO PENETRANTES

Os agentes crioprotetores não penetrantes aumentam a osmolaridade do meio extracelular, são responsáveis pela passagem da água do interior da célula para o meio extracelular impedindo assim a formação de cristais de gelo de seu interior durante o congelamento. São moléculas de alto peso molecular como açúcares, lipoproteínas da gema do ovo, proteína do leite e, em alguns casos, aminoácidos (AMANN; PICKETT, 1987). Substância iônicas ou não, que contribuem para manter a osmolaridade e o pH (tampão) ou também aditivos como enzimas e antibióticos, podem ser adicionados ao meio de congelamento (VISHWANATH; SHANNON, 2000).

Açúcares

Os açúcares são substâncias de grande importância na criopreservação, pois além de atuarem como substrato energético para as células (CORCUERA *et al*, 2007; MALO *et al*, 2010) criam uma pressão osmótica externa, induzindo a desidratação celular e diminuindo a formação de gelo intracelular, preservando a membrana plasmática (FULLER, 2004). Segundo Nicolajsen e Hvidt (1994) os componentes hidroxila das moléculas de açúcares tem a capacidade de proteger as células de injúrias causadas pelas congelação eutética do meio biológico, pela sua habilidade em capturar sais como o NaCl em um meio viscoso ou mesmo em fase cristalizada.

Dentre os açúcares utilizados nos meios diluidores para criopreservação de sêmen de suíno, estão os açúcares simples, como a frutose e a glicose, e os açúcares não penetrantes na célula, como lactose, rafinose e tralose (SQUIRES *et al.*, 2004).

Gema de ovo

A gema de ovo está presente em quase todos os diluentes devido a fosfatidilcolina e lipoproteínas da gema que protegem as células espermáticas contra o choque térmico (MIES FILHO *et al.*, 1982). Esta proteção é devido, principalmente, a presença de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que aderem a membrana plasmática durante o processo de criopreservação, garantindo resistência ao choque térmico e melhoria na motilidade pós-descongelamento (MOUSSA *et al.*, 2002).

A gema de ovo é amplamente utilizada para o congelamento de sêmen de espécies domésticas, porém na suinocultura não possui a mesma magnitude (JOHNSON *et al.*, 2000). Então o seu efeito protetor é melhorado pela adição de *Orvus Es Past* (OEP), detergente sintético baseado em sódio e laurilsulfato de trietanolamina. Tem sido sugerido que a OEP dá proteção, pois modifica os constituintes da gema de ovo no diluente (STRZEZEK *et al.*, 1984). Porém segundo, Aires (2003), o uso da gema de ovo pode aumentar o risco de contaminação microbiana, o que pode reduzir a capacidade de fertilização dos espermatozoides.

Leite em pó desnatado (LPD)

O leite desnatado é um excelente meio conservador para os espermatozoides, em baixas temperaturas, de uso prático, inclusive preservando melhor a motilidade espermática do que os outros diluentes, sendo desta forma um dos crioprotetores de escolha para uso na espécie suína (KULAKSIZ *et al.*, 2012). Segundo Memon e Ott (1981), as lipoproteínas e lectinas do leite promovem proteção da célula espermática contra o choque térmico quando adicionadas antes do resfriamento. Inclusive, há relatos sobre o efeito crioprotetor do leite desnatado (JULIANI e HENRY, 2008). As caseínas do leite diminuem as ligações das proteínas do plasma aos espermatozoides, reduzindo a perda de lipídeos da membrana celular e aumentando a proteção durante o processo de criopreservação (BERGERON *et al.*, 2007).

CRIOPROTETORES INTRACELULARES OU PENETRANTES

Com relação ao crioprotetor interno, ou seja, permeável à membrana plasmática, o glicerol é o mais utilizado, desidratando e reduzindo o ponto crioscópico do interior das células, dificultando a formação de cristais de gelo intracelular (WATSON, 1995). O glicerol é utilizado

em concentrações baixas (inferiores a 4%), pois apresenta uma potencial ação de toxicidade ao ser metabolizado como fonte de açúcar pela célula sendo responsável pela produção de metilglicoxal, por exemplo - mediador da ativação de 27 fosfolípases e proteases provocando irreversíveis danos na célula (JONES *et al.*, 1992). Porém Buhr *et al.* (2001) mostraram que nenhuma concentração de glicerol maximiza os parâmetros funcionais do esperma criopreservado.

Glicerol

O glicerol é um crioprotetor permeável à membrana e protege o espermatozoide da formação de cristais de gelo durante a congelação, reduzindo os danos da membrana celular (PURDY, 2005). Porém, as concentrações de glicerol utilizadas podem interferir na capacidade de fecundação destas células, principalmente por apresentar certo grau de toxicidade às células (PURDY, 2005). O glicerol é utilizado em concentrações baixas (inferiores a 4%), pois apresenta uma potencial ação de toxicidade ao ser metabolizado como fonte de açúcar pela célula (O' SHE *et al.*, 1979).

O glicerol é quimicamente considerado um álcool que contém três grupos funcionais de hidroxilas que podem aceitar um hidrogênio da molécula de água em seis sítios diferentes. Seu efeito crioprotetor está relacionado com a capacidade de se ligar com a água e a baixas dissociações em sais, diminuindo a osmolaridade do meio de congelação. Além de ter facilidade em atravessar a membrana celular, mantendo a osmolaridade interna e externa (FAHY, 1986).

Buhr *et al.* (2001) mostraram que nenhuma concentração de glicerol maximiza os parâmetros funcionais do esperma suíno criopreservado. Desta forma busca-se encontrar crioprotetores para a substituição do glicerol, a exemplo disso, a trealose (HU *et al.*, 2009; GUTIÉRREZ-PÉREZ *et al.*, 2009) e a dimetilacetamida (BIANCHI *et al.*, 2008) mostram resultados promissores para a espécie suína, sugerindo desta forma sua utilização.

Dimetilsulfóxido

O dimetilsulfóxido é muito usado como crioprotetor em diferentes espécies, uma vez que penetra na membrana plasmática. Para que um soluto atue dessa maneira é necessário que seja solúvel em membrana, assim como em água (WOLFE; BRYANT, 2001).

A elevada capacidade higroscópica decorre da sua intensa afinidade pelo hidrogênio, formando pontes mais fortes que às formadas entre moléculas de água e extrema capacidade de penetração e difusão. Possui capacidade citoprotetora (KOTERBA *et al.*; 1990) considerada superior ao do glicerol para preservar eritrócitos e espermatozoides (BRAYTON, 1986).

Por ser um álcool dipolar, ele é capaz de interagir ou combinar-se com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos, proteínas e muitas drogas sem alterar de forma irreversível a 22 configuração das moléculas (SOJKA *et al.*, 1990). Essa substância é considerada relativamente atóxica (WUSTEMAN *et al.*, 2008) e interage com as membranas, atravessando-as rapidamente por meio de difusão.

Segundo Cantanhêde (2013) o dimetilsulfóxido a 3% não possui benefícios na criopreservação de sêmen suíno em comparação ao glicerol. Sendo este, em baixas concentrações, ainda a melhor opção de crioprotetor na espécie suína.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A conservação do sêmen suíno através do congelamento, sem alteração dos resultados de fertilidade ainda não é uma realidade aplicável comercialmente. Porém os recentes avanços em pesquisas acerca de conhecimentos bioquímicos e fisiológicos da célula espermática suína tem possibilitando adaptações com o uso de crioprotetores de forma promissora. Desse modo, acredita-se que essa tecnologia se tornará comercialmente viável em pouco tempo, contribuindo de maneira promissora para o aumento de produtividade do rebanho comercial suíno e incentivando o intercâmbio de material genético.

REFERÊNCIAS

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Suínos**. 2014. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/suinos>>. Acesso em: 08 maio 2014.

AIRES, V.A. et al. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology**, v.60, p.269–79, 2003.

ALONSO, R.T.P.. **Novas Tecnologias em Reprodução Suína**. 2009. Disponível em: <http://www.consuitec.com.br/sgc/fotos/Novas_tecnologias_de_reproducao_suina_-_Revista_33.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2015.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v.7, p. 145-173, 1987.

ANTUNES, R.C. Avanço tecnológico e aplicabilidade da técnica de congelamento de sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.1, p.60-63, 2007.

AQARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.3, p. 1-21, 2005.

- A.R. JONES, L.; CHANTRIL, A.; COKINAKIS. Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 94, p. 129–134, 1992.
- BERGERON, A. et al. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. **Biology of Reproduction**, v.77, p.120-126, 2007.
- BIANCHI, I. et al. Inseminação artificial intra-uterina em leitoas com sêmen criopreservado com dimetilacetamida e glicerol. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p.1978-1983, 2008.
- BORTOLOZZO, F.P. et al. Inseminação Artificial na Suinocultura Tecnificada. **Suinocultura em Ação**. Porto Alegre, RS: Pallotti, p. 185, 2005.
- BUHR, M.M. et al. Cryopreservation in different concentrations of glycerol alters boar sperm and their membranes. **Journal of Andrology**, v.22, p.961–969. 2001.
- BRAYTON, C. F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. **Cornell Vet**. v.76-90, 1986.
- BREZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E. et al. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. **Biological Trace Element Research**, v.47, p. 69–74, 1995.
- CANDEIAS, M. L.. **Avaliação de diferentes protocolos de criopreservação de sêmen de garanhão da raça Mangalarga Marchador**. 2010. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2010.
- CANTANHÊDE, L.F.. **Desenvolvimento de uma nova técnica de criopreservação de sêmen suíno**. 2013. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Departamento de Reprodução e Sanidade Anima, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2013.
- CEROLINI, S. et al. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction Science**., v. 58, p.99–111, 2000.
- CORCUERA, B.D. et al. Effect of lactose and glycerol on the motility, normal apical ridge, chromatatin and chromatin stability of frozen boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 67. p. 1150-1157, 2007.
- DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J. K. Cryopreservantion of rabbit spermatozoa using acetamida in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**. v. 49. p. 831-41. 1997.
- ERIKSSON, B.M.; PETERSSON, H., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Field fertility with exported boar semen frozen in the new flatpack container. **Theriogenology** v. 58, p. 1065–1079, 2002.
- FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. **Cryobiology**, v.23, p.1-13, 1986.
- FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R. et al. Effects of egg yolk and cooling rate on the survival of refrigerated of red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, p.114-118, 2006.

FULLER, B.J., Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. **Cryo Letters**, v. 25, p. 375–388, 2004.

GILMORE, J.A. et al. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. **Human Reproduction**, v.12, p.112-118,1997.

GUTIÉRREZ-PÉREZ, O. et al. Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. **Cryobiology**, v.58, p. 287–292, 2009.

GROSSFELD, R. et al. New aspects of boar semen freezing strategies. **Theriogenology**, v.70, p.1225–1233, 2008.

HALLWELL, B.; ARUOMA, O.I. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. **FEBS Letters**, v.281, p. 9-19,1991.

JASKO, D. P. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars Veterinaria**, v. 10, p. 156-165, 1994.

JOHNSON, L.A.; GERRITS, R.J.; YOUNG, E.P. The fatty acid composition of porcine spermatozoa phospholipids. **Biology of Reproduction**, v. 1, p. 330–334, 1969.

JOHNSON, L.A. et al. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 143-172, 2000.

JULIANI, G.C.; HENRY, M. Efeito do glicerol, etilenoglicerol, acetamida e leite desnatado na criopreservação de espermatozoides equinos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.5, p. 1103-1109, 2008.

J.H. HU. et al. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. **Animal Reproduction Science**, v.112, p.107–118, 2009.

KOTERBA, A.M.; DRUMOND, W.H.; KOSCH, P.C. Equine clinical neonatology. Malvern: **Lea & Febiger**. p.846, 1990.

KULAKSIZ, R; ÇEBİC.; AKÇAY,E. The effect of different extenders on the motility and morphology of ram sperm frozen or stored at 4 °C. **Turkey Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v.36, n.2, p. 177-182, 2012.

LADHA S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. **Journal of Membrane Biology**, v.165, p.1-10, 1998.

LEUNG, L.K.P.; JAMIESON, B.G.M. Live preservation of fish gametes. In: JAMIESON, B. G. M. (Ed.). Fish evolution and systematics: evidence from Spermatozoa. **Cambridge: Cambridge University Press**. Cap. 20, p. 245-295, 1991.

MALO, C. et al. Comparing sugar type supplementation for cryopreservation of boar semen in egg yolk based extender. **Cryobiology**, v.61, p. 17–21, 2010a.

MEDEIROS, C.M.O. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, p. 327-344, 2002.

MEMON, M.A.; OTT, R. S. Methods of semen preservation and artificial insemination in sheep and goats. **World Review of Animal Production**. v.17, n.1, p.19-25, 1981.

MIES FILHO, A.; DUTRA, J.; GIRÃO, R. N. Congelação do sêmen ovino na primavera. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 5, p.27-57, 1982.

MISHRA, D.P.; SHANA, C. Estrogen induced spermatogenic cell apoptosis occurs via the mitochondrial pathway: role of superoxide and nitric oxide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 6181–6196, 2005.

MOUSSA, M.et al. Low density lipoproteins extratec from hen egg yolk an easy method cryoprotective effect on frozen - thawed bull semen. **Theriogenoly**, v. 57, p. 1695-1706,2002.

NASH, T. Chemical constitution and physical properties of ompound able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. **Cryobiology**, New York, p. 170-220, 1966.

NICOLAISEN, H.; HVIDT, A. Phase behavior of the system thehalose-NaCl-Water. **Criobiology**, v.31, p. 1999-205, 1994.

OETTLE, E. E.et al. Ultrastructural parameters of fertile cryopreserved human sperm. **Arch Androl**.;v. 29, n. 2, p. 151-6, 1992.

PEGG,D.E. The History and Principles of Cryopreservation. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 20, p. 05- 14, 2002.

PURDY P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research Journal**, v.63, p.215-225, 2006.

PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, (in press), 2005.

REED, H.C.B. Current use of frozen boar semen – future need of frozen boar semen. **In: INTERNATINAL CONFERENCE ON DEEP FREEZING OF BOAR SEMEN**. 1., 1985, Uppsala. Proceedings... Uppsala, 310p. p.225-237,1985.

ROCA, J.et al.Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology** v.60, p.77–87, 2003.

ROMERO C.et al.Situação atual de novas tecnologias na reprodução de suínos. **Suín Cia**, v.2, n.6, p.28-33, 2004.

SANTOS, R.R.et al. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 9-15, 2008.

SARAVIA, F.et al.Deep freezing of concentrated boar semen for intrauterine insemination: effects on sperm viability. **Theriogenology** v. 63, p.1320–1333, 2005.

SCHEID, I.R.et al. Estrus detection, time of insemination and fertility with boar semen frozen in maxistraws. In: **International Pig Veterinary Society Congress**. 11, Lousanne. Proceedings... p. 464,1990.

SHE, T.O.; DACHEAUX, J.L.; PAQUIGNON, M. Metabolism of boar spermatozoa before, during preparation for, and after storage in liquid nitrogen. **Journal of Reproduction & Fertility**. V.55, p.277–285, 1979.

SOJKA, J. E.et al. Dimethyl sulfoxide update – New applications and dosing methods. **Proceedings of the annual convention of the American Association of Equine Practitioners**. v. 36, p. 683-690, 1990.

SQUERES, E. L.et al. Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: Colorado State University. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Bulletin**. n. 9, p. 80, 2004.

STRZEZEK, J.et al. Some aspects of cryobiochemistry of boar semen. **Proc. 10th International Congress on Animal Reproduction**. A. I.; Urbana, IL 2, 224, 1984.

VALENÇA, R.M.B e GUERRA, M.M.P. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.1, p.47-53, 2007.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 23-53, 2000.

WATSON, P.F., Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing functions. **Reproduction, Fertility and Development**. V.7, p.871-891, 1995.

WATSON P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60/61, p.481-492, 2000.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, v.24, p. 436-450, 2001.

WUSTEMAN, M.et al. Reduction of cryoprotectant toxicity in cell in suspension by use of a sodium-free vehicle solution. **Cryobiology**. v. 56, p. 72-79, 2008.