

JOÃO FLÁVIO PANATTONI MARTINS

**COMPORTAMENTO DO COMPLEXO DNA-PROTEÍNA, DO VIGOR E DA
MOTILIDADE DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS SUBMETIDOS A DIFERENTES
TEMPOS DE CONGELAÇÃO**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo candidato a
João Flávio Panattoni
Martins
e aprovada pela Comissão Julgadora

09/10/97

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre
em Ciências Biológicas, área de Biologia Celular

MARIA LUIZA S. MELLO

-Orientadora-

CAMPINAS

1997

* CHAMADA:	
UNICAMP	
M366c	
Ex.	
OMBO BC/	32561
ROC.	39598
C	☐
D	☒
REÇO	1100
ATA	16/01/98
* CPD	

CM-00104562-6

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

M366c

Martins, João Flávio Panattoni

Comportamento do complexo DNA-proteína, do vigor e da motilidade de espermatozóides de touros submetidos a diferentes tempos de congelação / João Flávio Panattoni Martins. -- Campinas, SP :[s.n.], 1997.

Orientador: Maria Luiza Silveira Mello.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Touro - Espermatozóides. 2. Sêmen.
3. Criopreservação de órgãos, tecidos, etc. 4. Células - Motilidade. 5. *Subfertilidade. I. Mello, Maria Luiza Silveira.
- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
- III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 09 de outubro de 1997

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Profa.Dra. MARIA LUIZA SILVEIRA MELLO
(Orientadora)



Assinatura

Prof. Dr. SYLVIO FERRI



Assinatura

Profa.Dra. SHIRLEI MARIA RECCO-PIMENTEL



Assinatura

SUPLENTE:

Prof.Dr. EDSON ROSA PIMENTEL



Assinatura

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Luíza Silveira Mello, pela oportunidade e orientação a mim dedicada, e pela credibilidade, paciência e compreensão demonstradas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sylvio Ferri, ao Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel e à Profa. Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel pela cuidadosa leitura deste trabalho e valiosas sugestões que levaram ao aprimoramento do mesmo.

Aos professores do Departamento de Biologia Celular - UNICAMP pelos valiosos conhecimentos adquiridos e que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho se concretizasse.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Biologia Celular - UNICAMP, pela amizade, colaboração e agradável convívio com os quais me distinguiram.

Ao colega Dr. Marcelo Emílio Beletti, por acreditar em minha capacidade e ter-me iniciado nesta carreira.

Ao Prof. Dr. Pedro Franklin Barbosa, pela atenção dispensada e por seus conselhos estatísticos neste trabalho.

À PECPLAN-Bradesco, nas pessoas do Dr. Carlos de Rosa e Dr. Alessandro de Carvalho Lima e a empresa ABS- American Breeders Service, na pessoa de João Evangelista Diniz que não mediram esforços para o fornecimento de sêmen.

Aos colegas Dr. Adauto de Carvalho Rosas, Dr. Roberto Porto Filho e Dr. Hélio Vaz de Resende Filho, pela grande amizade e agradável convívio, e por estarem sempre prontos a ajudar.

À Capes pelo auxílio prestado.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

I - INTRODUÇÃO

A criobiologia aplicada à conservação de sêmen foi iniciada por SMITH e POLGE (1950) que relataram o efeito crioprotetor do glicerol na sobrevivência espermática, após a congelação de espermatozóides de várias espécies a -79°C . Foi a seguir demonstrado que o sêmen diluído em gema de ovo-citrato, adicionado de glicerol e conservado a -79°C por período de até 32 semanas (POLGE e ROWSON, 1952) ou um ano (ROWSON e POLGE, 1953), mantinha sua capacidade fertilizante, resultando em taxas de concepção de 69% e 65%, respectivamente. Posteriormente, mereceu considerável atenção a utilização de nitrogênio líquido para a congelação, demonstrando que a motilidade progressiva percentual mantinha-se mais elevada no sêmen conservado a -196°C do que a -79°C (BEAN et al., 1963; SULLIVAN e MIXNER, 1963).

Resultados discordantes têm sido reportados na literatura quanto ao desempenho reprodutivo do sêmen que tenha sido congelado por diferentes períodos. Enquanto muitos autores encontraram um declínio da fertilidade do sêmen congelado com o decorrer do tempo (MADDEN, 1956; SALISBURY, 1963; STEWART, 1964; GOFFAUX et al., 1966; MIXNER, 1968; JOKINEN e LINDSTROM, 1976; GRAHAM, 1996), outros demonstraram que o material poderia ser estocado em nitrogênio líquido sem perda da capacidade fertilizante (BRATTON et al., 1957; ERICKSON e GRAHAM, 1959; CLEGG e PICKETT, 1966; STROM, 1968; LINDSTROM et al., 1972; GOFFAUX et al., 1975; BRAUN et al., 1990; KRAUSE et al., 1990). Porém, como descrito em BARNABÉ (1980), não se pode deixar de levar em consideração a revisão feita por SALISBURY (1968), envolvendo 1.014.925 inseminações artificiais em bovinos, e reportando uma diminuição da eficiência reprodutiva, associada a um aumento da taxa de mortalidade embrionária, quando o sêmen é conservado mais que quatro meses a -79°C e mais do que onze meses a -196°C .

Além disso, MIXNER e WIGGIN (1964) e posteriormente MIXNER (1968), observaram que a queda do poder fecundante de um sêmen estocado por doze anos e utilizado durante o período intermediário, oferecia queda de 23,9% no percentual de fertilidade. De fato, aos 14 dias de congelado sua fertilidade era de 65,6%, aos 6 meses de 69,8%; 1 ano, 66,1%; 2 anos, 66,2%; 4 anos, 56,1%; 8 anos, 59,2% e 12 anos, de 41,7%. Resultado correlato foi consignado por STEWART (1964) onde o potencial de fertilidade do sêmen, originalmente de 66,5%, caiu para 58% após 9 anos de estocagem em CO₂.

Atualmente, a crioconservação de sêmen é uma prática amplamente difundida e explorada na medicina reprodutiva das espécies, onde, aliada às técnicas de inseminação artificial, vem contribuindo eficazmente em diversas áreas de interesse, como no auxílio da reprodução de espécies selvagens (HOWARD et al., 1986; ROTT, 1995) e no melhoramento genético de várias espécies animais, principalmente aquelas envolvidas com a produção de alimentos de origem animal. Segundo GRAHAM (1996), entre 1950 e 1980 a produção diária do rebanho leiteiro dos E.U.A. passou de 26.000 kg de leite/ vaca/ ano para 52.000 kg de leite/ vaca/ ano, após a utilização de fertilização com sêmen de reprodutores com grande potencial genético para a produção de leite, e que tal melhoria não seria possível em apenas 30 anos sem a utilização de sêmen congelado.

Sendo assim, a avaliação da viabilidade espermática pós-descongelção vem merecendo ser estudada de muitas maneiras, tanto “in vitro” (THOMAS & GARNER, 1994; BEORLEGUI et al., 1995; TAO et al., 1995; WATSON, 1995; YAVETZ et al., 1995; JANUSKAUSKAS & RODRIGUEZ MARTINEZ, 1995; HEITLAND et al., 1996), como na resposta a campo expressa em taxas de prenhez (SILVA et al., 1987; NUNES, 1988; GASTAL et al., 1991; JACOMINI et al., 1991; MACHADO, 1991; NADIR et al., 1993; SOUZA et al., 1994) como também testando-se novos agentes crioprotetores e protocolos de congelção (KORVALAN et al., 1986; FISER & FAIRFULL, 1990;

BRAUN et al., 1995; JOHNSON et al., 1995; MAXWELL et al., 1995; MORSHEDI et al., 1995; HEITLAND et al., 1996; WILHELM et al., 1996), uma vez que grande stress celular ocorre no choque de congelamento com a formação de cristais de gelo, e na dissolução destes no processo de descongelamento, causando um stress osmótico que prejudica a competência espermática (WATSON, 1995).

A avaliação “in vitro” da viabilidade espermática pós-descongelamento é realizada através de uma série de exames que determinam a motilidade espermática e morfologia do acrossomo (JOHNSON et al., 1981), concentração extracelular de enzimas e teste de termorresistência (LARSSON e ERSMAR, 1980), e teste de turgidez em condições hipo-osmóticas (TAKAHASHI et al., 1990; YAVETZ et al., 1995), entre outros.

A consequência mais grave da deterioração da qualidade espermática durante o armazenamento, é o decréscimo da fertilidade sem que necessariamente haja decréscimo da motilidade celular. Dentre as mudanças estruturais causadas pelo congelamento, há lesões de membrana plasmática e acrossomo espermático, bem como a liberação de enzimas pela célula, porém, diferentes estruturas celulares, embora menos sensíveis, podem ser afetadas, e lesões nucleares e mitocondriais podem ocorrer, determinando escoamento de fosfolipídios, proteínas intracelulares e mitocôndrias dos espermatozoides lesados (MANN e LUTWAK- MANN, 1981; LARSSON, 1985; BEORLEGUI et al., 1995; BRAUN et al. 1995).

A condensação do material nuclear é um importante evento na diferenciação nuclear durante a espermatogênese. Nos mamíferos o DNA nuclear que em células somáticas estaria ligado a proteínas nucleares básicas chamadas histonas, passa a formar complexos íntimos com outros tipos de proteínas nucleares básicas conhecidas como protaminas queratinosas ou “protamine-like” (BLOCH, 1969; OLIVA e DIXON, 1991).

Alterações no complexo DNA-proteína dos espermatozóides de touro vêm sendo sugeridas como importante causa de subfertilidade nesta espécie (GLEDHILL et al. , 1966; GLEDHILL, 1970; EVENSON et al. , 1980; MELLO, 1977 e 1982; BRITTO e MELLO, 1988; BARTH e OKO, 1989; BELETTI, 1992; BELETTI e MELLO, 1996). A cromatina difusa característica presente nas células mais jovens da linhagem germinativa torna-se altamente condensada e bioquimicamente inerte nos últimos estágios da espermiogênese (WAGNER e MINHAS, 1982). Concomitante a estas alterações, as histonas ricas em lisina são descomplexadas do DNA e substituídas ou acrescidas pelas protaminas queratinosas que são ricas em arginina mas também contêm muitos resíduos de cisteína, os quais formam pontes dissulfeto entre as moléculas protéicas adjacentes durante os estágios finais da maturação cromatinica, promovendo interações entre tais moléculas ao redor da hélice de DNA (BALHORN, 1982). Sendo assim, as cadeias de fosfodiéster são neutralizadas e a repulsão eletrostática normal entre segmentos de DNA vizinhos é eliminada, ocorrendo uma íntima compactação molecular (BALHORN, 1982). Existem evidências de que este processo de condensação do DNA possa ser parcial, resultando um complexo DNA-proteína menos estável e aumentando a susceptibilidade de desnaturação do mesmo (GLEDHILL et al. , 1966). Há ainda sugestão de que esta alteração possa ser causada por um defeito na ligação entre os grupos fosfato do DNA e as proteínas nucleares, ou por ocorrência de um tipo anormal de proteína ligada ao DNA (GLEDHILL et al., 1966; MELLO, 1982).

Complexos DNA-proteína anômalos não são detectados em exames rotineiros de esfregaços de sêmen sem coloração ao microscópio de luz, nem tampouco, através de análise morfológica realizada como rotina de exame espermático nas centrais de inseminação.

Várias metodologias vêm sendo apresentadas para a detecção deste tipo de anomalia como: microespectrofotometria com ultravioleta (GLEDHILL et al., 1966), coloração com a reação de Feulgen (GLEDHILL et al., 1966; BRITTO et al., 1988), utilização de corantes catiônicos como

alaranjado de acridina (GLEDHILL et al., 1966; EVENSON, 1989; DARZYNKIEWICZ, 1990), verde metila (GLEDHILL et al., 1966) e azul de toluidina (MELLO, 1977, 1982). Com a reação de Feulgen os espermatozóides possuidores de complexo DNA-proteína normal são corados homoganeamente em tom vermelho púrpuro. No entanto, as células com alteração no complexo DNA-proteína evidenciam um aumento localizado ou generalizado na coloração nuclear, atribuído à uma deficiência cromatínica ou defeitos na ligação de proteínas nucleares à grupos fosfatos do DNA, que afetariam a cinética de hidrólise do DNA, tornando-o mais rapidamente acessível à depurinação e, portanto, fazendo com que os núcleos aparecessem mais rapidamente “coráveis” do que os núcleos normais (GLEDHILL, 1970).

Em 1977, Mello desenvolveu um método denominado de “metacromasia induzida”, para identificar alterações no complexo DNA-proteína em espermatozóides de touro. Este método consta de coloração com azul de toluidina precedida por um tratamento ácido (HCl 4N a 25°C, 15 a 20 min.). Os espermatozóides normais se corariam em verde uma vez que poucos grupos fosfatos do DNA estariam disponíveis à ligação com o corante catiônico. Contudo aqueles com anomalias no complexo DNA-proteína se corariam em violeta (metacromasia) uma vez que muitos grupos fosfatos sequenciais estariam acessíveis no DNA, permitindo maior interação com as moléculas de corante (MELLO, 1982). A metacromasia induzida pode também ser exibida por complexos DNA-proteína anômalos de espermatozóides de touro, quando a coloração com azul de toluidina é precedida por outros tipos de tratamento como 2-mercaptoetanol-uréia, NaCl e solução SSC (BELETTI, 1992; BELETTI e MELLO, 1996). É também encontrada em espermatozóides de outros mamíferos, como coelhos (BELETTI e MELLO, 1995) e humanos (COSTA e BELETTI, 1995; COSTA et al. , 1996).

II - OBJETIVOS

O presente estudo visa avaliar se com o avanço do tempo a que o sêmen de touro é mantido congelado, com propósito de utilização em inseminação artificial, ocorreriam alterações nos espermatozoides, identificáveis em nível dos seus complexos DNA-proteína, bem como se outros parâmetros funcionais celulares como vigor e motilidade seriam afetados em tais circunstâncias.

III - MATERIAL e MÉTODOS

Foram utilizadas partidas de sêmen de touros férteis de diferentes procedências, congeladas para inseminação artificial segundo diferentes tempos e cedidas por diferentes empresas que comercializam tal material (Tabela 1).

Como método de descongelação, foi utilizado o sistema de imersão em água a 37° C por um minuto para sêmen congelado em palhetas (CASAGRANDE et al. , 1977). As partidas mais antigas, que estavam congeladas em ampolas de vidro, foram descongeladas em água com gelo fundente por 3 minutos (MIES FILHO, 1982). Os preparados foram efetuados no fim de 1995 e durante 1996.

A fixação e a coloração dos esfregaços de sêmen foram feitas de acordo com os procedimentos descritos em MELLO (1982) e BELETTI (1992), usando-se como fixador etanol-ácido acético glacial 3:1 (v/v) por 1 min. e como pré-tratamento indutor de metacromasia o HCl 4N a 25 °C por 20 minutos e a coloração sendo realizada com azul de toluidina a 0,025% em tampão McIlvaine por 15 minutos.

A incidência de complexos DNA-proteína anômalos que exibiam resposta metacromática após coloração com azul de toluidina foi estabelecida para mil células, escolhidas ao acaso. As observações ao microscópio foram efetuadas com um aumento de 400x.

Além desse procedimento foram avaliados os parâmetros vigor e motilidade espermática, que são práticas de rotina nas centrais de congelação de sêmen, sendo o material analisado em microscópio de contraste de fase entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37° C. O vigor foi estimado pela intensidade de movimentação dos espermatozóides e classificado em uma escala de zero a cinco, onde zero indica ausência total de movimento dos espermatozóides e cinco indica que todas ou quase todas as células vivas exibem enérgicos movimentos retilíneos progressivos. A motilidade foi estimada com base na relação entre a quantidade de espermatozóides vivos e mortos, e registrada em intervalos percentuais de 10%.

Não foi avaliado o parâmetro concentração, uma vez que este é alterado através da diluição do sêmen em função da legislação para congelação de sêmen bovino, que exige que cada dose apresente uma concentração padrão pré-estabelecida de no mínimo 10 milhões de células viáveis.

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando-se o programa Minitab 10.

IV - RESULTADOS

As imagens de resposta metacromática nos espermatozóides de touro, evidenciando complexos DNA-proteína anômalos como descritos em MELLO (1982), são mostradas nas Figuras 1 e 2.

Os resultados obtidos para os complexos DNA-proteína anômalos, vigor e motilidade dos espermatozóides de sêmen crio-estocado foram organizados em cinco grupos de idade de congelação conforme descrito na Tabela 1.

Os resultados de estatística descritiva para os dados referentes aos diferentes parâmetros acham-se relatados nas Tabelas 2 a 4. Gráficos “box-plots” foram construídos para uma análise exploratória dos dados referentes aos diferentes parâmetros (Figs. 3 a 5). Foi observada uma distribuição não simétrica dos valores, uma vez que as distâncias das medianas aos quartis foram variáveis, conforme o parâmetro e o grupo de amostras considerados (Figs. 3 a 5). Tal observação foi mais especialmente evidenciável para o parâmetro vigor (Fig. 4).

Para cada um dos parâmetros foi efetuada comparação entre si dos resultados obtidos em diferentes grupos de tempos de crio-estocagem. O sumário dessa análise é mostrado nas Tabelas 5 a 7.

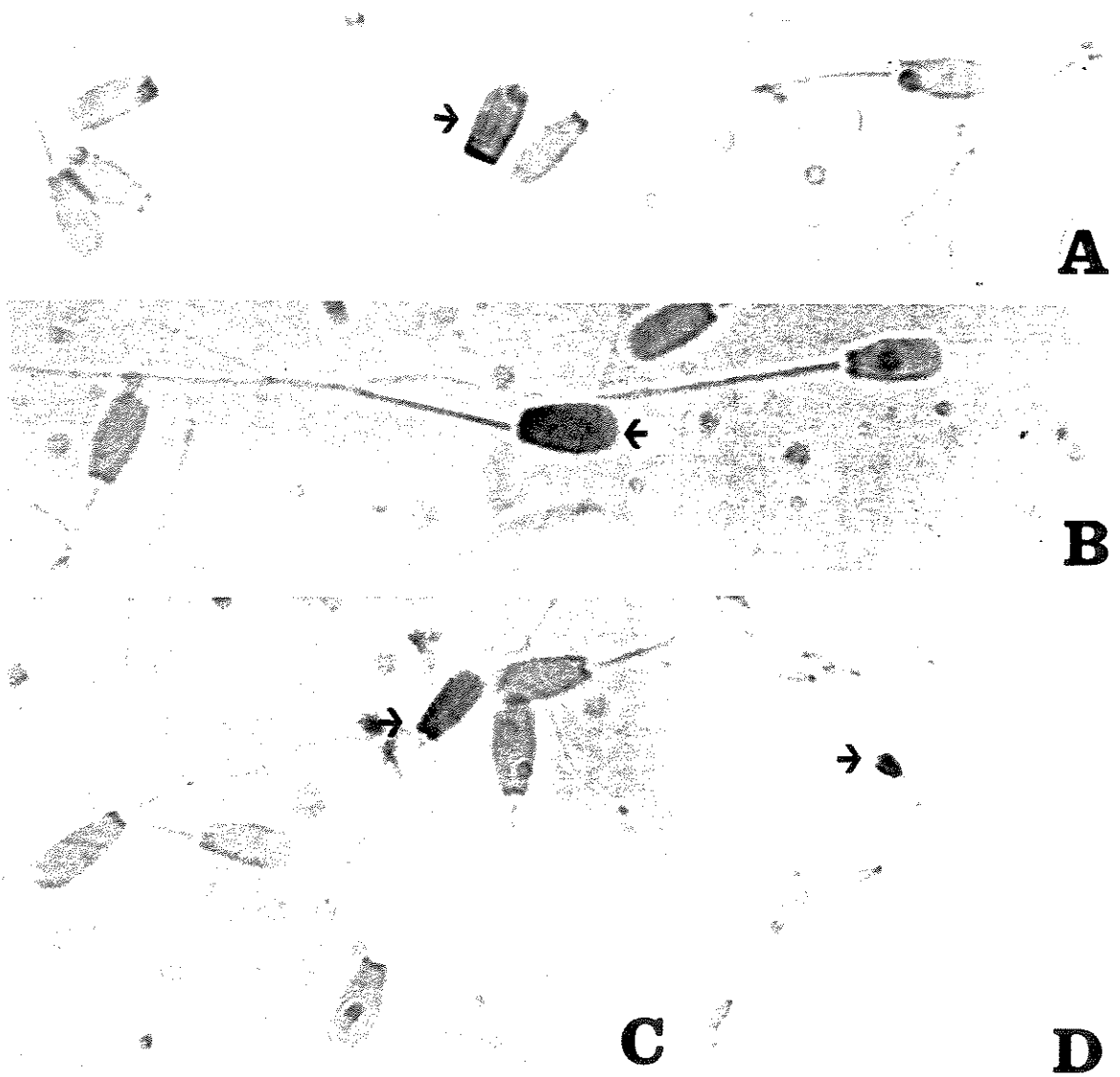


Fig. 1 A- D. Esfregaços de sêmen de touro submetidos à metacromasia induzida, evidenciando espermatozóides com anomalia química (metacromáticos) (seta). A- C. Aumento 1500X. D. Aumento 600X.

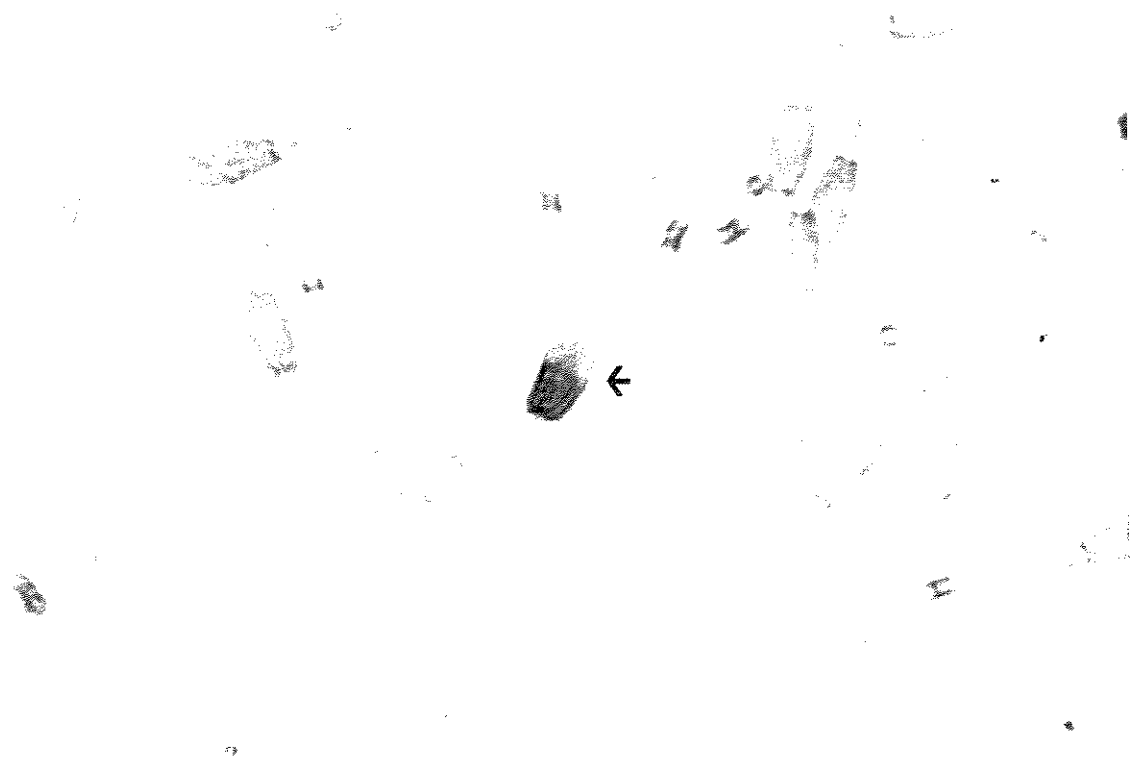


Fig. 2 . Esfregaço de sêmen de touro submetido à metacromasia induzida, evidenciando espermatozóide metacromático (seta). Aumento 1500X (sem filtro).

Tabela 1 - Características das amostras de sêmen de touro estocado

Grupos	Ano de criostocagem	Touro/Raça	Partida	Empresa	AN DNA-P(%)	Vigor	Mot.(%)
1	1973	*Thonyma Paclmar Amos / ?	10/09/73	ABS	4,2	3	40
	1974	*Diamond S Knight Son / ?	23/07/74	ABS	4,6	2	30
		*Diamond S Knight Son / ?	14/09/74	ABS	4	3	40
		*Diamond S Knight Son / ?	14/09/74	ABS	3,7	3	60
2	1978	R.W. Jasper Red / HoV	15/01/78	PECPLAN	2,2	3	60
		Lisble / HoPB	20/01/78	INTERSEL.	3,2	5	90
	1979	Sabagual / Guzerá	24/05/79	PECPLAN	1,4	3	70
		Whittier-Farms "Harvest" / ?	14/11/79	ABS	3,2	3	30
3	1981	R.W. Jasper Red / HoV	07/07/81	PECPLAN	3,2	4	70
		Popo / ?	15/10/81	LAGOA	2,2	4	70
	1982	Importante / Gir	03/03/82	PECPLAN	2,2	3	50
		Marechal / Guzerá	15/12/82	PECPLAN	1,6	3	60
	1983	Lemeuf A. Magnileo / HoPB	15/07/83	PECPLAN	2	3	80
	1984	SRM Júpiter Red / HoV	24/09/84	SEMBRA	2,8	4	80
		SRM Júpiter Red / HoV	24/09/84	SEMBRA	2	4	70
	1985	Importante / Gir	04/02/85	PECPLAN	1,6	2	20

*Partidas seminais congeladas em ampolas; ABS, American Breeders Service; AN DNA-P, complexos DNA-proteína anômalos, identificáveis por metacromasia induzida; HoPB, raça holandês preto e branco; HoV, raça holandês vermelho; INTERSEL., Interselection; Lagoa, Lagoa da serra; Mot., motilidade; PECPLAN, Pecuária Planejada Bradesco; SEMBRA, Sêmen do Brasil Ltda.

Grupos	Ano de criostocagem	Touro/Raça	Partida	Empresa	AN DNA-P (%)	Vigor	Mot. (%)
4	1986	Hércules / ?	24/11/86	PECPLAN	3,2	4	60
	1987	Milkman Valiant / HoPB	09/11/87	SEMBRA	3,8	4	70
		Lico M. Valiant / HoPB	08/12/87	SEMBRA	2,9	5	80
	1988	Tomil Gnemern/Aberdeen	13/06/88	AltaGenética	2,8	5	80
		Tablado / HoV	19/07/88	PECPLAN	2	3	80
		BanBan/Nelore	10/08/88	SEMBRA	2,6	4	80
		Tarup / ?	28/12/88	PECPLAN	3	5	80
	1989	Ysry / ?	04/05/89	PECPLAN	2,7	4	70
		Chris Bell / Gir	29/08/89	PECPLAN	2,8	5	80
	1990	Felício / Gir	13/11/90	PECPLAN	2,7	5	80
5	1991	085 da Tosana Ind. /InduBrasil	14/03/91	PECPLAN	1,8	3	60
		Major Motion / Pardo Suíço	30/09/91	PECPLAN	2,5	5	70
	1992	General Mest. / ?	20/02/92	PECPLAN	4,4	4	50
		Nimbus / HoPB	22/12/92	PECPLAN	3,3	4	70
	1993	LWR Argus SA/Charolês	28/04/93	AltaGenética	2,5	4	80
		Limolyn Venture/Limousin	29/04/93	AltaGenética	2,8	5	80
		Fraglos / Gelbieviah	27/05/93	PECPLAN	3,2	5	90
		Itaipu / Simmenthal	06/07/93	PECPLAN	2,4	2	40
	1994	Starline J. Fle/Pardo Suíço	20/01/94	AltaGenética	2,4	4	70
		Mor da YB / Nelore	11/02/94	PECPLAN	2,4	5	90
		Big Sky / Aberdeen	01/06/94	PECPLAN	4	4	60
		Grafitte Gil. / Gir	01/12/94	PECPLAN	4	4	70
		Butiá Brass / Jersey	16/12/94	PECPLAN	1,8	4	70
	1995	Bayville Enhanger Jake /?	17/01/95	PECPLAN	2,4	5	80
		Mr. Angus / Aberdeen	31/07/95	ABS	2,4	3	60
		Terremoto / Gir	13/12/95	SEMBRA	2,6	5	90

ABS, American Breeders Service; AN DNA-P, complexos DNA-proteína anômalos, identificáveis por metacromasia induzida; HoPB, raça holandês preto e branco; HoV, raça holandês vermelho; INTERSEL., Interselection; Lagoa, Lagoa da serra; Mot., motilidade; PECPLAN, Pecuária Planejada Bradesco; SEMBRA, Sêmen do Brasil Ltda.

Tabela 2 - Estatística descritiva para os dados de patologias do complexo DNA-proteína dos espermatozóides de grupos de sêmen crio-estocados por diferentes períodos, conforme mostrado na Tabela 1.

Grupos	n	média	desvio padrão	mediana
1	4	4,125	0,377	4,100
2	4	2,500	0,872	2,700
3	8	2,200	0,555	2,100
4	10	2,850	0,458	2,800
5	16	2,806	0,769	2,500

Tabela 3 - Estatística descritiva para os dados de vigor dos espermatozóides de grupos de sêmen crio-estocados por diferentes períodos, conforme mostrado na Tabela 1.

Grupos	n	média	desvio padrão	mediana
1	4	2,750	0,500	3,000
2	4	3,500	1,000	3,000
3	8	3,375	0,744	3,500
4	10	4,400	0,699	4,500
5	16	4,125	0,885	4,000

Tabela 4 - Estatística descritiva para os dados de motilidade dos espermatozóides de grupos de sêmen crio-estocados por diferentes períodos, conforme mostrado na Tabela 1.

Grupos	n	média	desvio padrão	mediana
1	4	42,50	12,58	40,00
2	4	62,50	25,00	65,00
3	8	62,50	19,82	70,00
4	10	76,00	6,99	80,00
5	16	70,62	14,36	70,00

Fig. 3 - " Box-plots " para os dados de patologias do complexo DNA-proteína (%) dos espermatozóides de grupos de sêmen crio-estocados por diferentes períodos, conforme destacado na Tabela 1 (1 a 5, aqui designados como D1 a D5). Traços inferiores e superiores = quartis inferiores e superiores das distribuições; traços medianos = mediana. Os traços verticais indicam quão distantes dos quartis alguns dados podem se distribuir.

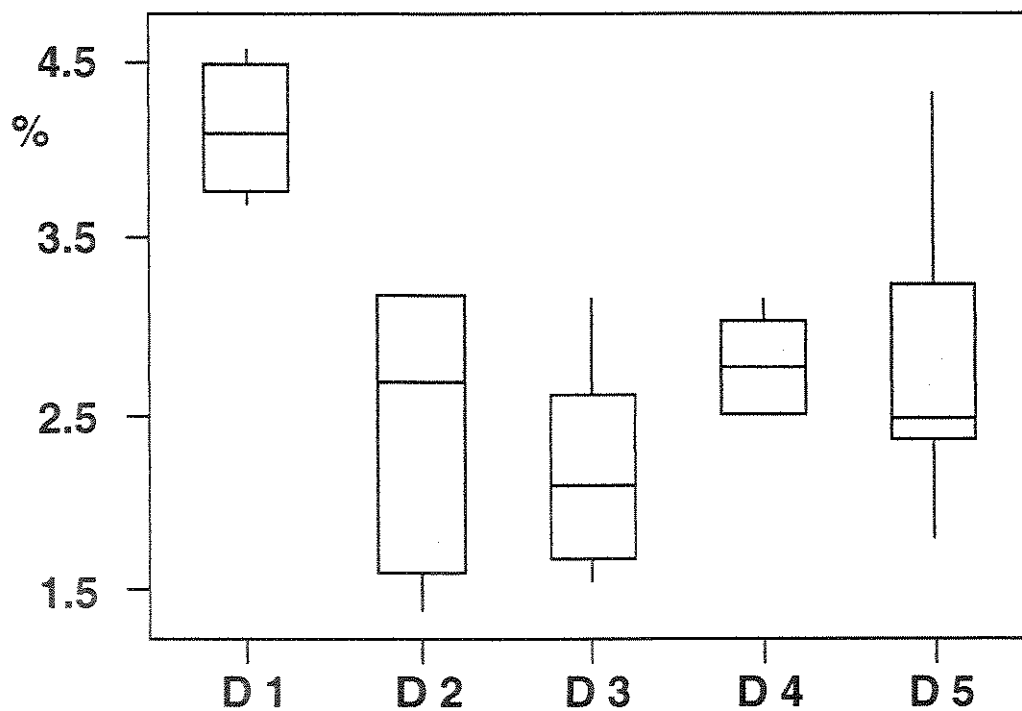


Fig. 4 - " Box-plots "para os dados de vigor (V) dos espermatozóides de grupos de sêmen crio-estocados por diferentes períodos, conforme destacado na Tabela 1 (1 a 5, aqui designados como V1 a V5). Traços inferiores e superiores = quartis inferiores e superiores das distribuições; traços medianos ou seta = mediana. Os traços verticais indicam quão distantes dos quartis alguns dados podem se distribuir.

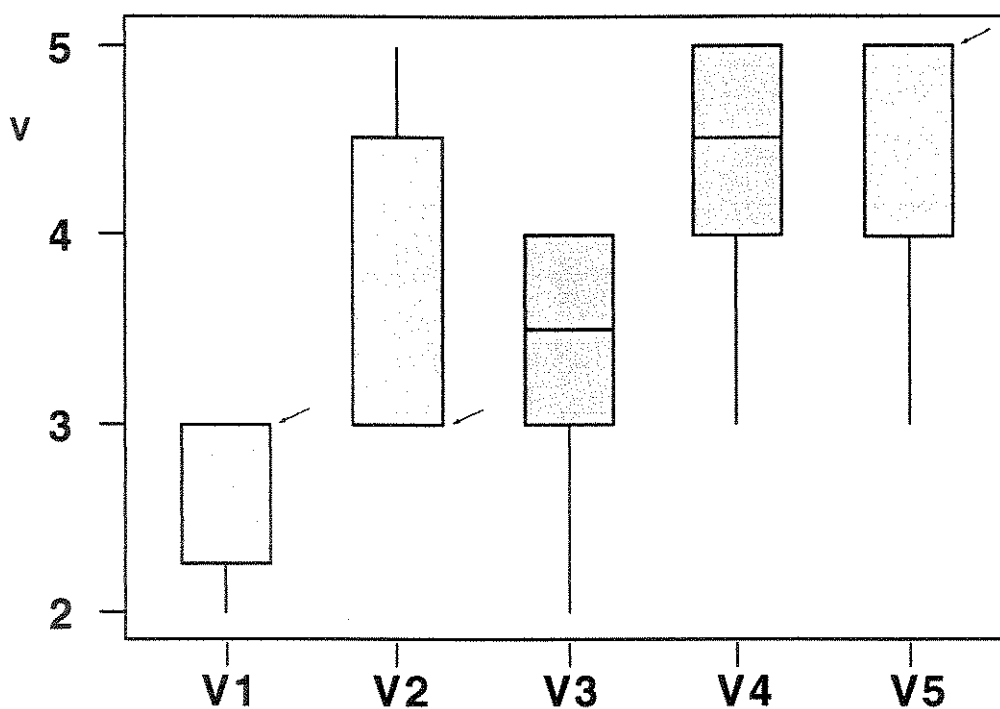
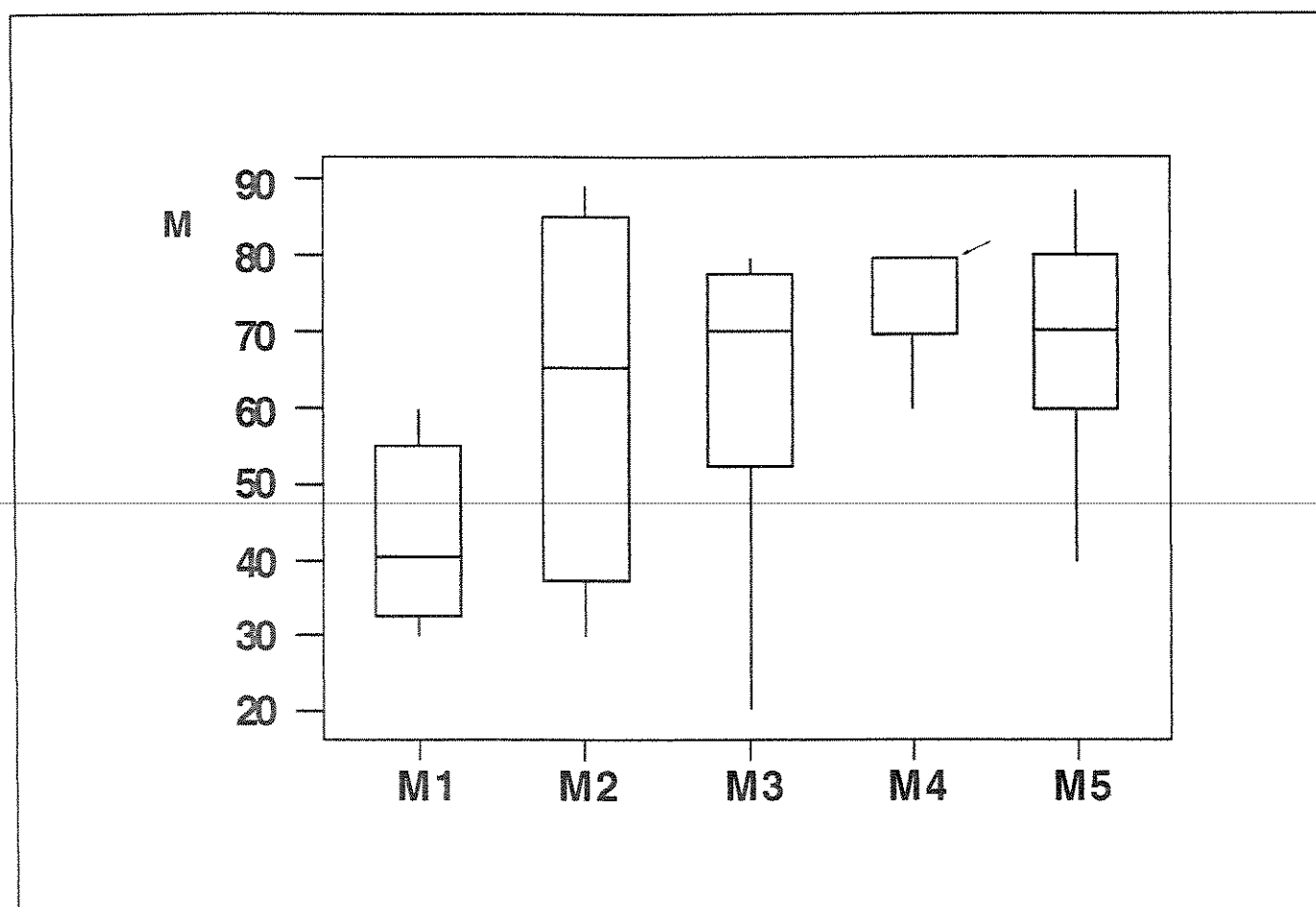


Fig. 5 - " Box-plots " para os dados de motilidade (M,%) dos espermatoz3ides de grupos de s3emen crio-estocados por diferentes per3iodos, conforme destacado na Tabela 1 (1 a 5, aqui designados como M1 a M5). Tra3os inferiores e superiores = quartis inferiores e superiores das distribu33es; tra3os medianos ou seta = mediana. Os tra3os verticais indicam qu33o distantes dos quartis alguns dados podem se distribuir.



Os dados das Tabelas 5 a 7 indicam que os parâmetros anomalias do complexo DNA-proteína determinadas por metacromasia induzida, vigor e motilidade dos espermatozóides diferem significativamente, quando se comparam os diferentes intervalos de tempo de estocagem do sêmen (grupos 1 a 5) entre si.

As anomalias dos complexos DNA-proteína do sêmen congelado mais antigo (1973 e 1974, grupo 1) diferiram significativamente em frequência do material de 1978 e 1979 (grupo 2) e do material de 1991 a 1995 (grupo 5). No entanto, a frequência de anomalias do complexo DNA-proteína dos materiais congelados a partir de 1978 até 1995 não diferiu estatisticamente entre si (Tabela 5). Houve, pois, comprovação estatística de que os valores de anomalias dos complexos DNA-proteína do material de procedência mais antiga fossem mais elevados do que os de materiais congelados a partir de 1978/1979.

Já com relação aos parâmetros vigor e motilidade dos espermatozóides, os valores do material mais antigo (grupo 1) não diferiram significativamente dos de material congelado em 1978 e 1979 (grupo 2), mas foram inferiores (diferença estatisticamente significante) aos de material mais recentemente congelado (grupo 5) (Tabelas 6 e 7).

Os valores de vigor para o material congelado a partir de 1978 diferiram significativamente entre si, para esta decisão tendo contribuído as diferenças significantes especialmente entre valores para os materiais congelados nos anos 1981 a 1985 (grupo 3) em relação aos de materiais congelados nos anos de 1987 a 1990 (grupo 4) (Tabela 6).

Quanto aos valores de motilidade, as diferenças significantes detectadas parecem ser marcantes para os materiais de procedência mais antiga (grupo 1) em relação aos de procedência mais recente (grupos 4 e 5) (Tabela 7).

Tabela 5 - ANOVA para os valores de anomalias dos complexos DNA-proteína dos espermatozóides criopreservados segundo os diferentes intervalos de tempo descritos na Tabela 1.

Grupos comparados	Conclusões
1, 2, 3, 4, 5	F=6.09 ; p=0.001**
1, 2	F=11.70 ; p=0.014*
1, 5	F=10.77 ; p=0.004**
2, 3, 4, 5	F=1.86 ; p=0.154

* = significante ; ** = altamente significante.

Tabela 6 - Comparação dos valores de vigor dos espermatozóides criopreservados segundo os diferentes intervalos de tempo descritos na Tabela 1.

Grupos comparados	Teste	Conclusões
1, 2, 3, 4, 5	Kruskal-Wallis	H=13.65 , d.f.=4 p=0.009**
1, 2	Mann-Whitney	p=0.2568
1, 5	Mann-Whitney	p=0.0136*
2, 3, 4, 5	Kruskal-Wallis	H=7.97 , d.f.=3 p=0.047*
2, 3	Mann-Whitney	p=1.000
3, 4	Mann-Whitney	p=0.0139*
4, 5	Mann-Whitney	p=0.4744

O cálculo de p pressupõe ajuste para valores empatados

* = significante , ** = altamente significante.

Tabela 7 - ANOVA para os valores de motilidade dos espermatozóides criopreservados segundo os diferentes intervalos de tempo descritos na Tabela 1.

Grupos comparados	Conclusões
1, 2, 3, 4, 5	F=3.93 ; p=0.009**
1, 2	F=2.04 ; p=0.203
1, 3	F=3.31 ; p=0.099
1, 4	F=42.05 ; p=0.000**
1, 5	F=12.77 ; p=0.002**
2, 3, 4, 5	F=1.43 ; p=0.251

* = significante ; ** = altamente significante.

V - DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo indicam que os parâmetros anomalias do complexo DNA-proteína, vigor e motilidade dos espermatozóides diferem para grupos de sêmen criopreservados por tempos diferentes.

As anomalias em complexos DNA-proteína identificáveis pelo método de metacromasia induzida são uma função do número e da proximidade de grupos fosfatos disponíveis no DNA desses complexos para ligação com as moléculas de azul de toluidina (MELLO, 1982). O achado de núcleos metacromáticos em espermatozóides de touro indica uma anormalidade constitutiva do complexo DNA-proteína dessas células, assumindo-se que as proteínas tenham algum erro em amino-ácido e/ou geometria que tornem mais frouxa sua ligação com o DNA (MELLO, 1982). Os resultados do presente trabalho podem, portanto, serem devidos ao perfil espermático dos touros considerados, que no preparo das partidas não pressupunha nenhuma medida de análise referente aos complexos DNA-proteína quando de sua seleção. Porém não se pode descartar o fator global de preservação de sêmen à baixa temperatura como tendo induzido afrouxamento de ligações entre proteínas e DNA e ocasionando aumento em frequência de núcleos metacromáticos.

O fato das anomalias dos complexos DNA-proteína das partidas de sêmen mais antigas (1973 e 1974) serem mais elevadas e diferirem de todas aquelas congeladas subsequentemente, embora estas não difiram entre si, fala em favor de que o tipo de técnica de preservação tenha alguma participação nos resultados. Somente nas partidas de 1973 e 1974 o sêmen foi envasado em ampolas de vidro passando posteriormente a ser envasado em palhetas de plástico. Experimentos comparativos de fecundação mostram que o emprego das palhetas permite a obtenção de taxas de fecundação geralmente superiores às obtidas com o emprego das ampolas, como revisado por PICKETT e colaboradores (1976) que

fizeram uma análise de vários ensaios comparando a influência do modo de acondicionamento do sêmen congelado sobre a porcentagem de fecundação. As palhetas permitem a utilização do total da dose prevista de sêmen para fecundação sem perdas, ao passo que segundo FOOTE (1964) quando se usam ampolas, a inseminação é feita com pipeta, e a perda de sêmen pode atingir ou mesmo ultrapassar 25% da dose. Além disso, as palhetas apresentam um volume menor de diluidor que as ampolas e considerando que o diluidor introduzido no útero da vaca age como um corpo estranho, é de interesse a diminuição de corpo estranho injetado para minimização de reação da mucosa uterina. Mesmo entre as palhetas vários volumes foram testados para a congelação, concluindo-se que as doses de 0,25 ml. apresentam melhores taxas de concepção (LINDSTROM et al., 1972). Outras vantagens são reletivas à própria estocagem do sêmen acondicionado em palhetas, permitindo conservar mais doses em menos espaço e também a identificação das palhetas facilitada por pequenas máquinas automáticas que a fazem legível e completa no material plástico.

Segundo ROYERE e colaboradores (1991), alterações na cromatina em espermatozóides humanos podem ser induzidas pelo processo de congelação e descongelação, que alteraria a relação entre o DNA e as proteínas nucleares prejudicando a habilidade de fertilização do sêmen. Nesses termos tais alterações poderiam ser facilitadas pelos procedimentos de estocagem realizados quando do envasamento das ampolas.

Com relação aos parâmetros vigor, estimado pela intensidade de movimentação retilínea progressiva dos espermatozóides, e motilidade, estimada na relação entre a quantidade de espermatozóides vivos e mortos, percebe-se que o processo de criopreservação não só eleva a concentração de células mortas, como também, influencia na qualidade de movimentação dos espermatozóides vivos devido a mudanças estruturais como lesões de membrana plasmática, acrossomo

e membranas intracelulares, causadas pela formação de cristais de gelo dentro da célula durante a congelação e o aumento destes pela recristalização durante o processo de descongelação.

De acordo com os resultados obtidos, há comprovação estatística de que os valores de vigor e motilidade diminuíam mais em função do aumento no tempo de criopreservação. O tipo de envasamento do sêmen sozinho não parece ter participação nos resultados. De fato vários autores confirmam que a diminuição tanto de vigor como de motilidade dos espermatozóides ocorra após a criopreservação de sêmen, seja ele bovino (SODERQUIST e STALHAMMAR, 1991; KJAESTAD, 1993; McLAUGHLIN, 1994), humano (BIRKS, 1994 ; BOSMAN, 1994) ou equino (SAMPER, 1991). Este acontecimento seria, pois, aumentado com o tempo de criopreservação.

Especialmente para o parâmetro vigor foi observada no presente estudo uma distribuição não simétrica de valores inclusive para tempos de criopreservação mais recentes, como 1991 a 1995. Considerando-se que as técnicas de congelação e descongelação utilizadas neste período são bastantes semelhantes, acredita-se que a existência de partidas seminais que apresentem vigor e motilidade muito abaixo da média do grupo possa também ter sido promovida por condições de manutenção da congelação fora do padrão ideal, como por exemplo, utilizando-se níveis insatisfatórios de nitrogênio líquido no botijão de armazenamento de sêmen ou por manipulação excessiva ou inadequada das partidas seminais durante o período de criopreservação, causando exposição das mesmas à temperatura ambiente por tempo excessivo.

Os dados aqui levantados sugerem que se deva ter cautela na utilização de sêmen criopreservado por tempos muito longos, especialmente quando além do fator tempo tenha sido utilizada técnica de preservação e envasamento mais antiga.

Entendemos ser de grande valia para a elucidação de alguns pontos ainda não esclarecidos no presente trabalho, a determinação do perfil espermático de touros sem influência da criopreservação,

analisando-se o sêmen a fresco, para somente então, acompanhá-lo a partir do mesmo ejaculado analisado, nos procedimentos de envasamento de algumas partidas, submetidas a várias condições de congelação por diferentes períodos de tempo pré-determinados, utilizando-se nível de nitrogênio ótimo, e 75% e 50% do nível ótimo no botijão de armazenamento. Desta maneira, haveria possibilidade de melhor julgamento dos efeitos da criopreservação e da qualidade desta, sobre um perfil espermático pré-estabelecido.

VI - CONCLUSÕES

1 - O processo de criopreservação exerce influência negativa sobre os índices de vigor e motilidade espermática, ocorrendo uma diminuição nos seus valores em função do aumento no tempo de criopreservação.

2 - Partidas seminais conservadas em ampolas apresentam maior incidência de patologias do complexo DNA-proteína, acreditando-se que os procedimentos utilizados nesta técnica exerçam influência nesses índices.

3 - Não constatou-se nenhuma correlação entre incidência de patologias do complexo DNA-proteína e tempo de criopreservação.

4 - Deve-se ter cautela na utilização de sêmen criopreservado por tempos muito longos, especialmente quando a técnica de preservação e envasamento forem antigas.

VII - RESUMO

A incidência de patologias do complexo DNA-proteína, medida pelo método de metacromasia induzida, bem como os parâmetros vigor e motilidade, foram estudados em espermatozóides de touro provenientes de 42 partidas seminais congeladas a partir de 1973 a 1995. Os resultados indicam que esses parâmetros diferem estatisticamente para grupos de sêmen criopreservados por tempos diferentes. As anomalias no complexo DNA-proteína foram mais elevadas para as partidas de 1973 e 1974, diferindo de todas as demais, que por sua vez não diferiram entre si. Admite-se que o tipo de envasamento e o diluidor do sêmen tenham alguma participação nesses resultados, pois apenas as partidas de 1973 e 1974 foram envasadas em ampolas. Quanto aos parâmetros vigor e motilidade, houve diminuição nos seus valores, em função do aumento no tempo de criopreservação, porém não diretamente correlacionada ao tipo de envasamento. Especialmente para o parâmetro vigor foi observada uma distribuição não simétrica de valores inclusive para tempos de criopreservação mais recentes, como 1991 a 1995. Considerando-se que as técnicas de congelação e descongelação utilizadas neste período são muito semelhantes entre si, acredita-se que a existência de partidas seminais que apresentem vigor e motilidade muito abaixo da média do grupo possa ocorrer devido a condições de manutenção da congelação fora do padrão ideal, como por exemplo, utilizando-se níveis insatisfatórios de nitrogênio líquido no botijão de armazenamento de sêmen ou por manipulação excessiva ou inadequada das partidas seminais durante o período de criopreservação, causando exposição das mesmas à temperatura ambiente por tempo excessivo.

Os dados levantados sugerem cautela na utilização de sêmen criopreservado por tempos muito longos, especialmente se associado a isto tiver sido utilizada a técnica de preservação e envasamento mais antiga. Cuidados adicionais de preservação deverão ser mantidos.

VIII - SUMMARY

The incidence of the DNA-protein complex pathologies, measured by induced metachromasy method, as well as vigor and motility patterns, were studied in bull sperm from 42 frozen batches from 1973 to 1995. Results indicate that these parameters differ statistically for cryopreserved semen groups in accord to different time. Complex DNA-protein anomalies were higher for 1973 and 1974 batches, differing from all the remaining, which in turn did not differ among themselves. It is acknowledged that storage type and semen dilutor have some participation in these results because only 1973 and 1974 batches were stored in ampules. Decrease was shown in the amounts of vigor and motility parameters, as a function of increase in cryopreservation time, however, not directly correlated to storage type. A non-symmetric distribution of amounts was observed especially for vigor parameter, including more recent cryopreservation time as 1991 to 1995. Considering that the freezing and thawing techniques used by both groups during this period are very similar it is assumed that the existence of seminal batches showing vigor and motility much below group's average could be due to not maintaining ideal freezing conditions, for instance , using unsatisfying levels of liquid nitrogen in the semen storage tank or due to excessive or inadequate manipulation of semen batches during cryopreservation period, causing their exposure to environmental temperature for excessive time.

Collected data suggest caution when using cryopreserved semen for very long periods of time, especially if the older preservation and storage technique has been utilized associated to it. Additional preservation measures need to be kept.

IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALHORN, R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J. Cell Biol.*, 93:298-305, 1982.
- BARNABE, V. H. Efeito do tempo de conservação de sêmen congelado de bovinos sobre a motilidade progressiva dos espermatozoides e a retenção do acrossomo. *Rev. Bras. de Reprod. Animal*, 4(3-4): 13-20, 1980.
- BARTH, A.D. and OKO, R.J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. *Iowa State Press, Ames Iowa*, 1: 152-56, 1989.
- BEAN, B.H. ; PICKETT, B.W. & MARTIG, R.C. Influence of freezing methods, extenders, and storage temperatures on motility and pH of frozen bovine semen. *J. Dairy Sci.*, 46:145-9, 1963.
- BELETTI, M.E. Anomalias em complexo DNA-proteína de espermatozoides de touro: contribuição metodológica. Campinas 1992. *Dissertação* (Mestrado em Biologia Celular)- Instituto de Biologia- UNICAMP, 84p., 1992.
- BELETTI, M.E. & MELLO, M.L.S. Influência da temperatura testicular sobre o complexo DNA-proteína em espermatozoides de coelho. *Rev. brasil. Genét.* (Supl.), 18:131, 1995.
- BELETTI, M.E. & MELLO, M.L.S. Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA-protein complexes in bull spermatozoa. *Brazilian Journal of Genetics*, 19(1): 97-103, 1996.
- BEORLEGUI, N.B. ; CORDOBA, M. & BECONI, M. T. Mitochondrial calcium uptake in bovine frozen sperm. *Biochem. Mol. Biol. Int.* , 35(4): 713-8, 1995.
- BIRKS, A.G. ; IZZARD, H. ; MORROLL, D.R. ; PRIOR, J.R. ; TROUP, S.A. ; LIEBERMAN, B.A. & MATSON, P.L. The routine assessment of sperm motility at room temperature and 37 degrees C. *Int. J. Androl.*, 17(6): 289-91, 1994.
- BLOCH, D.P. A catalog of sperm histones. *Genetics*, 61(Suppl.):93-111, 1969.
- BOSMAN, E. ; DU TOIT, D. ; WESSELS, P.H. ; BORNMAN, M.S. & DU PLESSIS, D.J. Sperm adenosine triphosphate concentrations before and after freezing as a marker of cryolysis. *Arch. Androl.*, 33(1): 7-10, 1994.
- BRATTON, R. W. ; FLOOD, J.C. ; FOOTE, R.H. ; WEARDEN, S. & DUNN, H.O. ; Fertility of bovine spermatozoa stored at minus 79 °C for one week and for seventeen weeks. *J. Dairy Sci.*, 40: 154-62, 1957.

- BRAUN, J. ; HOCHI, S. ; OGURI, N. ; SATO, K. & TORRES BOGGINO, F. Effect of different protein supplements on motility and plasma membrane integrity of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Cryobiology*, 32(5): 482-92, 1995.
- BRITTO, C.M.C.; MELLO, M.L.S.; CORDEIRO, J.A. Feulgen-DNA content and nuclear area in spermatozoa of "Pé-duro" cattle. *Rev. brasil. Genét.*, 11(1):73-88, 1988.
- BRITTO, C.M.C. & MELLO, M.L.S. Induced nuclear metachromasy evaluated in spermatozoa of "Pé-duro" bulls. *Rev. brasil. Genét.*, 11: 349-54, 1988.
- CASAGRANDE, J.F. ; SILVA, R.G. & ALMEIDA, C.A. Efeito do método de descongelação sobre a porcentagem de espermatozóides reativados em sêmen acondicionado em ampolas de vidro e em minitubos. *Rev. Bras. Repr. Animal*, 1(1): 27-30, 1977.
- CLEGG, E.D. & PICKETT, B.W. Effect of storage at -196° C on fertility. *A.I.Dig.*, 14: 12-3, 1966.
- COSTA, E.N. & BELETTI, M.E. Uso da metacromasia induzida na detecção de anomalias ao nível de complexo DNA-proteína em espermatozóides humanos. *Rev. brasil. Genét.*, (Supl.)18:567, 1995.
- COSTA, E.N. ; BELETTI, M.E. ; SOUSA, M.C.N. & RESENDE, E.V. The anomalous DNA protein complex in human spermatozoa of varicocele cases. *Braz. J. Genet.* (Suppl.),19(3):147, 1996.
- DARZYNKIEWICZ, Z. Differential staining of DNA and RNA in intact cells and isolated cell nuclei with acridine orange. *Meth. Cell Biol.*, 33:285-98, 1990.
- ERICKSON, W.E. & GRAHAM, E.F. Effects of storage on non-return rate of frozen spermatozoa. *A.I.Dig.* , 7:8-9, 1959.
- EVENSON, D.P. ; DARZYNKIEWICZ, Z. & MELAMED, M. R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*, 210: 1131-34, 1980.
- FISER, P.S. & FAIRFULL, R.W. Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5 ml straws. *Mol. Reprod. Dev.*, 25(2): 123-9, 1990.
- FOOTE, R.H. Sperm losses from semen collection to insemination. *Vè Cong. Inter. Reprod. Anim. Insém. Artif.* Trento, 2: 416-20, 1964.

- GASTAL, E.L. ; HENRY, M. ; GASTAL, M.O. & COUTINHO, A. Fertilidade do sêmen de dois garanhões com diferentes motilidades e concentrações espermáticas pós-descongelamento. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, 15(3-4): 179-89, 1991.
- GLEDHILL, B.L. Changes in nuclear stainability associated with spermateliosis, spermatozoal maturation, and male infertility. In: *Introduction to Quantitative Citochemistry- II* (WIED, G.L. & BAHR, G.F., eds.). Academic Press, New York & London, p.125-51, 1970.
- GLEDHILL, B.L. ; GLEDHILL, M.P. ; RIGLER Jr , R. & RINGERTZ, N.R. Atypical changes of desoxyribonucleoprotein during spermiogenesis associated with a case of infertility in the bull. *J. Reprod. Fert.*, 12: 575-8, 1966.
- GOFFAUX, M.; PAREZ, M.; THOMASSEY, M. & VUIDEPOT, R. Effects of two years storage on the motility and fertilizing ability of bull semen. *Élev. Insémin.* (92):3-7, 1966 apud *Anim. Breed. Abstr.* , 34:2983, 1966.
- GOFFAUX, M. ; TOURNEUS, J.C. ; MESSEIN, Y. ; TABARY, M. & THOMASSEY, M. Effect d'une conservation de six ans sur la qualité et le pouvoir fécondant du sperme de taureau. *Elév. Insémin.*, (145):3-12, 1975.
- GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet. Clin. North. Am. Equine Pract.* ,12(1): 131-47, 1996.
- HEITLAND, A.V. ; JASKO, D.J. ; SQUIRES, E.L. ; GRAHAM, J.K. ; PICKETT, B.W. & HAMILTON, C. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Equine Vet. J.* , 28(1): 47-53, 1996.
- HOWARD, J.G. ; BUSH, M. ; DE VOS, V. ; SCHIEWE, M.C. ; PURSEL, V.G. & WILDT, D.E. Influence of cryoprotective diluent on post-thaw viability and acrosomal integrity of spermatozoa of the African elephant (*Loxodonta africana*). *J. Reprod. Fertil.* , 78(1): 295-306, 1986.
- JACOMINI, J.O.; LARA, J.L.R.; CHOW, L.A.; ANDRADE, V.J. & MELO, P.S. Detecção do estro e inseminação artificial em búfalas (*Bubalus bubalis*). *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 15(1-2):19-24, 1991.
- JANUSKAUSKAS, A. & RODRIGUEZ MARTINEZ, H. Assessment of sperm viability by measurement of ATP, membrane integrity and motility in frozen/thawed bull semen. *Acta. Vet. Scand.* , 36(4): 571-4, 1995.
- JOHNSON, L.A., AALBERS, J.G., WILLENS, C.M.T. et al. Use of boar spermatozoa for artificial insemination. I. Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in cows on 36 farms. *J. Anim. Sci.* , 52: 1130-36, 1981.

- JOHNSON, M.S. ; SENGHER, P.L. ; ALLEN, C.H. ; HANCOCK, D.D. ;
ALEXANDER, B.M. & SASSER, R.G. Fertility of bull semen packaged in .25-
and .5-milliliter French straws. *J. Anim. Sci.*, 73(7): 1914-9, 1995.
- JOKINEN, L. & LINDSTROM, U.B. Non-return rates of pellets after 4 years
storage. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL
REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 8., Cracow.
Proceedings. 4:808-11, 1976.
- KJAESTAD, H. ; ROPSTAD, E. & BERG, K.A. Evaluation of spermatological
parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta. Vet. Scand.*,
34(3): 299-303, 1993.
- KORVALAN, P.; MARINOV, M.F.; VODAS, K. Survivability and penetration
capacity of bull spermatozoa frozen by 3 technics. *Vet. Med. Nauki.*, 23(9):77-
80, 1986.
- LARSON, K. Boar sperm viability after freezing and thawing. In:
INTERNATIONAL CONFERENCE ON DEEP FREEZING OF BOAR
SEMEN, 1, 1985, Uppsala. *Proceedings...* Uppsala: Swedish Univ. Agric. Sci.,
1985. p. 17-87.
- LARSON, K. & ERSMAR, M. Laboratory studies on frozen: thawed boar semen in
relation to contemporary fertility with liquid semen in AI boars. *Zuchthygiene*,
15: 111-7, 1980.
- LE LANNOU, D. ; GASTARD, E. ; GUITVARCH, A. ; LAURENT, M.C. &
POULAIN, P. Strategies in frozen donor semen procreation. *Hum. Reprod.*,
10(7): 1765-74, 1995.
- LINDSTROM, U. ; HOLMSTROM, B.G. & JOKINEN, L. Pellets: experiences and
results of storage over 3 years. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF
ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 7
Munich. *Proceedings*, 2:1427-35, 1972.
- MACHADO, R. Inseminação artificial com sêmen congelado em caprinos. *Rev.*
Bras. Reprod. Animal, 3: 265-76, 1991.
- MADDEN, D.H.L. An analysis of results obtained with frozen (bovine) semen. In:
INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTIVE, 3
Cambridge. *Papers. sec.3:33-6*, apud *Anim. Breed. Abstr.*, 24:1653, 1956.
- MANN, T. & LUTWAK-MANN, C. *Male reproductive function and semen*. Berlin:
Springer-Verlag , 1981. 495 p.

- MAXWELL, W.M. ; ROBINSON, S.J. ; ROCA, J. ; MOLINIA, F.C. ; SANCHEZ PARTIDA, L.G. & EVANS, G. Motility, acrosome integrity and fertility of frozen ram spermatozoa treated with caffeine, pentoxifylline, cAMP, 2-deoxyadenosine and kallikrein. *Reprod. Fertil. Dev.* , 7(5): 1081-7, 1995.
- MCLAUGHLIN, E.A. ; FORD, W.C. Effects of cryopreservation on the intracellular calcium concentration of human spermatozoa and its response to progesterone. *Mol. Reprod. Dev.*, 37(2): 241-6, 1994.
- MELLO, M.L.S. DNP variants in morphologically normal spermatozoa. III Congresso Latinoamericano de Genética, Montevideo 1977. Resumos, p.250, 1977.
- MELLO, M.L.S. Induced metachromasia in bull spermatozoa. *Histochemistry*, 74: 387-92, 1982.
- MIES FILHO, A. Reprodução dos animais e inseminação artificial. 5 ed., Porto Alegre, Sulina, c. 1982.
- MIXNER, J.P. Fertility of bull semen frozen for twelve years. In: CONGRESS INTERNATIONAL REPRODUCTION ANIMALE ET INSÉMINATION ARTIFICIELE, 6. , Paris 1968. *Proceedings*. v.2, p.1095-8, 1968.
- MIXNER, J.P. & WIGGIN, S.H. The effects of ageing on the motility and fertility of frozen bull semen . In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION , 5. , Trento, 1964. *Proceedings*. v. 4 , p. 264-8, 1964.
- MORSHEDI, M. ; OEHNINGER, S. ; BLACKMORE, P. ; BOCCA, S. ; CODDINGTON, C. & HODGEN, G. Investigation of some biochemical and functional effects of cryopreservation of human spermatozoa using an automated freezing-quick-thawing method. *Int. J. Androl.* , 18(6): 279-86, 1995.
- NADIR, S. ; SAACKKE, R.G. ; BAME, J. ; MULLINS, J. & DEGELOS, S. Effect of freezing semen and dosage of sperm on number of accessory sperm, fertility, and embryo quality in artificially inseminated cattle. *J. Anim. Sci.*, 71(1): 199-204, 1993.
- NUNES, J.F. A Inseminação artificial em caprinos no nordeste do Brasil. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, 12(2): 85-91, 1988.
- OLIVA, R. and DIXON, G.H. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, 40:25-94, 1991.

- PICKETT, B.W.; BERNDTSON, W.E. & SULLIVAN, J.J. Technique for processing and packaging bovine semen. *6^è Cong. Techn. Insem. Artif.* (NAAB, Columbia, Missouri), 34-50, 1976.
- POLGE, C. & ROWSON, L.E.A. Results with bull semen stored at -79°C. *RBRA VOL. IV n 3 e 4. Vet. Rec.*, 64: 851, 1952.
- ROTT, N.N. The creation of genetic cryobanks and the use of the methods of developmental biology as a means for preserving rare animal species. I. The cryopreservation of the sperm of wild mammals. *Ontogenez.*, 26(4): 270-81, 1995.
- ROWSON, L.E.A. & POLGE, C. Storage of bull semen at -79°C and fertility results up to 12 month. *Vet. Rec.*, 65: 677-9, 1953.
- ROYERE, D.; HAMAMAH, S.; NICOLLE, J.C. & LANSAC, J. Chromatin alterations induced by freeze-thawing influence the fertilizing ability of human sperm. *Int. J. Androl.*, 14(5): 328-32, 1991.
- SALISBURY, G.W. Effect of aging at -79°C on fertility of bovine semen. *J.Diary Sci.*, 46:637, 1963.
- SALISBURY, G.W. Fertilizing ability and biological aspects of sperm storage "in vitro". In: CONGRÈS INTERNATIONAL DE REPRODUCTION ANIMALE ET INSEMINATION ARTIFICIELLE, 6., Paris. *Proceedings.* 2:1189-204, 1968.
- SAMPER, J.C.; HELLANDER, J.C. & CRABO, B.G. Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 44: 107-14, 1991.
- SILVA, C.A.M.; FARIAS, N.D.; NOGUEIRA, C.E.W. & ALDA, I.L. Inseminação artificial em equinos com sêmen congelado. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, 11(2): 95-101, 1987.
- SMITH, A.U. & POLGE, C. Storage of bull spermatozoa at low temperatures. *Vet. Rec.*, 62: 115-6, 1950.
- SODERQUIST, L. & STALHAMMAR, E.M. Relationship between ATP content and motility in bovine spermatozoa with reference to the effects of the bull and the A.I. centre. *Acta. Vet. Scand.*, 32(3): 353-9, 1991.
- SOUZA, M.I.L.; NEVES, J.P.; LUZ, S.L.N.; GONÇALVES, P.B.D. & MORAES, C.N. Inseminação artificial ovina com sêmen congelado e fresco utilizando diferentes técnicas de aplicação. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, 18(3-4): 116-23, 1994.

- STEWART, D.L. Observations on the fertility of frozen semen stored at -79°C and -196 C. In : INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION , 5., Trento, 1964. *Proceedings*. v. 4 , p. 617-23, 1964.
- STROM, B Influence upon fertility of bull semen of storage time in liquid nitrogen. In: CONGRÈSS INTERNATINAL DE REPRODUCTION ANIMALE ET INSEMINATION ARTIFICIELLE, 6. , Paris 1968. *Proceedings*. 2:1171-4, 1968.
- SULLIVAN, J.J. & MIXNER, J.P. Effects of method of egg yolk addition and of glycerol equilibration time upon post thawing motility and metabolic activity of frozen bull semen. *J. Dairy Sci.* ,46:463-7, 1963.
- TAKAHASHI, K. ; UCHIDA, A. & KITAO. M. Hypoosmotic swelling test of sperm. *Arch. Androl.*, 25(3): 225-42, 1990.
- TAO, J. ; DU, J. ; KLEINHANS, F.W. ; CRITSER, E.S. ; MAZUR, P. & CRITSER, J.K. The effect of collection temperature, cooling rate and warming rate on chilling injury and cryopreservation of mouse spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 104(2): 231-6, 1995.
- THOMAS, C.A. & GARNER, D.L. Post-thaw bovine spermatozoal quality estimated from fresh samples *J. Androl.*, 15(5): 489-500, 1994.
- WAGNER, T.E. & MINHAS, B.S. Condensation and descondensation of spermatozoa DNA. In: Prospects for sexing mammalian sperm. Eds: Amman, R.P., Seidel, G.E. *Colorado Associated Press, Boulder, CO*, 49-60, 1982.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* ,7(4): 871-91, 1995.
- WILHELM, K.M. ; GRAHAM, J.K. & SQUIRES, E.L. Effects of phosphatidylserine and cholesterol liposomes on the viability, motility, and acrosomal integrity of stallion spermatozoa prior to and after cryopreservation. *Cryobiology* , 33(3): 320-9, 1996.
- YAVETZ, H. ; HAUSER, R. ; YOGEV, L. ; BOTCHAN, A. ; LESSING, J.B. ; HOMONNAI, Z.T. & PAZ, G. Advanced methods for evaluation of sperm quality. *Andrologia*, 27(1): 31-5, 1995.